



Russian-Armenian (Slavonic) University

*Printed by the decision of the
Academic Council of RAU*

V E S T N I K
OF RUSSIAN-ARMENIAN (SLAVONIC) UNIVERSITY
(SERIES: PHYSICAL-MATHEMATICAL
AND NATURAL SCIENCES)

RAU University Press
No. 2/2024

Российско-Армянский (Славянский) университет

*Печатается по решению
Ученого Совета РАУ*

В Е С Т Н И К
РОССИЙСКО-АРМЯНСКОГО (СЛАВЯНСКОГО)
УНИВЕРСИТЕТА
(СЕРИЯ: ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКИЕ
И ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ)

Издательство РАУ
№ 2/2024

Главный редактор: академик НАН РА, д.ф.-м.н., проф. **Казарян Э.М.**

Зам. главного редактора: к.ф.-м.н., д.филос.н., проф. **Аветисян П.С.**

Ответственный секретарь: к.х.н. **Шагинян Р.С.**

Редакционная коллегия:

Математика и информатика

Р.Г. Арамян – д.ф.-м.н., проф., Российско-Армянский университет (РАУ), Институт Математики НАН РА

Д.Г. Асатрян – д.т.н., проф., Институт проблем информатики и автоматизации НАН РА

Г.Г. Казарян – д.ф.-м.н., проф., Российско-Армянский университет (РАУ)

О.В. Бесов – член-корр.РАН, д.ф.-м.н., проф., Математический институт им. В.А. Стеклова РАН (Россия)

В.И. Буренков – д.ф.-м.н., проф., Математический институт им. В.А. Стеклова РАН (Россия)

А.Г. Сергеев – академик РАН, д.ф.-м.н., проф., Математический институт им. В.А. Стеклова РАН (Россия)

А.И. Аветисян – академик РАН, д.ф.-м.н., проф., Институт системного программирования им. В.П. Иванникова РАН (Россия)

В.Ш. Меликян – член-корр. НАН РА, д.т.н., проф., Российско-Армянский университет (РАУ), Synopsys

Биологические и химические науки

А.А. Аракелян – д.б.н., проф., Российско-Армянский университет (РАУ), Институт Молекулярной биологии НАН РА

В.И. Мурунец – д.б.н., проф., Московский государственный университет (МГУ) (Россия)

А.А. Оганесян – к.б.н., доц., Российско-Армянский университет (РАУ)

Р.В. Захарян – к.б.н., Российско-Армянский университет (РАУ)

Г.Г. Данагулян – член-корр. НАН РА, д.х.н., проф., Российско-Армянский университет (РАУ)

К.Б. Назарян – д.б.н., проф., Институт Молекулярной биологии НАН РА

Л.М. Епископосян – д.б.н., проф., Институт Молекулярной биологии НАН РА

А.Б. Киракосян – д.б.н., проф., Массачусетский технологический институт (США)

Физико-технические науки

Д.А. Фирсов – д.ф.-м.н., проф., СПбПУ им. Петра Великого (Россия)

А.В. Папоян – член-корр. НАН РА, д.ф.-м.н., проф., Институт физических исследований НАН РА

С.Г. Петросян – член-корр. НАНРА, д.ф.-м.н., проф., Российско-Армянский университет (РАУ)

А.А. Саркисян – д.ф.-м.н., проф., Российско-Армянский университет (РАУ)

Е.Ш. Мамасакхлисов – д.ф.-м.н., проф., Российско-Армянский университет (РАУ)

В.Г. Аветисян – д.т.н., проф., Российско-Армянский университет (РАУ)

Журнал основан в 2003 году и входит в перечень периодических изданий, зарегистрированных ВАК РА и РИНЦ

Editor-in-Chief: Academician of NAS RA, D.Sc. in Physics and Mathematics,
Prof. **Kazaryan E.M.**

Deputy Editor-in-chief: Ph.D. in Mathematics, D. Sc. in Philosophy, Prof. **Avetisyan P.S.**

Executive secretary: Ph.D. in Science (Chemistry) **Shaginyan R.S.**

Editorial team

Mathematics and Computer Science

R.G. Aramyan – D. Sc. (Mathematics), Prof., Russian-Armenian University (RAU), Institute of Mathematics NAS RA

D.G. Asatryan – D. Sc. (Technical Sciences), Prof., Institute of Informatics and Automation Problems of NAS RA

G.G. Kazaryan – D. Sc. (Mathematics), Prof., Russian-Armenian University (RAU)

O.V. Besov – corresponding member of RAS, D. Sc. (Mathematics), Prof., Mathematical Institute Named after V.A. Steklov RAS (Russia)

I.A. Burenkov – D. Sc., Prof., Mathematical Institute Named after V.A. Steklov RAS (Russia)

A.G. Sergeev – Academician of the Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Mathematics), Prof., Mathematical Institute Named after V.A. Steklov RAS (Russia)

A.I. Avetisyan – Academician of the Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Mathematics), Prof., Institute of System Programming Named after V.P. Ivannikov RAS (Russia)

V.Sh. Melikyan – corresponding member of NAS RA, D. Sc. (Technical Sciences), Prof., Russian-Armenian University (RAU), Synopsys

Biological and Chemical Sciences

A.A. Arakelyan – D. Sc. (Biology), Prof., Institute of Molecular Biology NAS RA

I.A. Muronets – D. Sc. (Biology), Prof., Moscow State University (Russia)

A.A. Hovhannisyanyan – Ph.D. in Science (Biology), Russian-Armenian University (RAU)

R.V. Zakharyan – Ph.D. in Science (Biology), Russian-Armenian University (RAU)

G.G. Danagulyan – corresponding member of NASRA, D. Sc. (Chemistry), Prof., Russian-Armenian University (RAU)

K.B. Nazaryan – D.Sc. (Biology), Prof., Institute of Molecular Biology NAS RA

L.M. Episkoposyan – D.Sc. (Biology), Prof., Institute of Molecular Biology NAS RA

A.B. Kirakosyan – D.Sc. (Biology), Prof., Massachusetts Institute of Technology (USA)

Physical and Technical Sciences

D.A. Firsov – D. Sc. (Physics), Prof., SPbPU Named after Peter the Great (Russia)

A.V. Papoyan – corresponding member of NAS RA, D.Sc. (Physics), Prof., Institute of Physical Research NAS RA

S.G. Petrosyan – corresponding member of NAS RA, D. Sc. (Physics), Prof., Russian-Armenian University (RAU)

A.A. Sargsyan – D.Sc. (Physics), Prof., Russian-Armenian University (RAU)

E.S. Mamasakhlisov – D.Sc. (Physics), Prof., Russian-Armenian University (RAU)

V.G. Avetisyan – D. Sc. (Technical Sciences), Prof., Russian-Armenian University (RAU)

The journal founded in 2003 is included in the list of periodicals registered by HAC RA and RSCI

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА

- Варданян Э.А.** Приближение второго порядка для моделей “Windy Gridworld”7
- Рушанян А.Ф.** Модель распознавания выражений лица “SEGAN-CNN”15

ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

- Мхитарян Н.Н.** Особенности Рамановского рассеяния кристаллов ниобата лития, легированных ионами тулия31

ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

- Карибян Я.А.** Зеленый синтез производных пиримидина на базе халконов и предварительная оценка их биологических свойств38
- Амбарцумян Е.Р., Манукян А.А., Тирацуйан С.Г.** Болезнь Альцгеймера: нейропатологии, современные представления, молекулярные механизмы, стратегии профилактики и лечения47
- Оганесян А.А., Оганян С.А., Казарян Ш.А.** Устойчивость к противомикробным препаратам: надвигающаяся тихая пандемия62
- Паронян А.** “De novo”-дизайн пептидов в качестве потенциальных модуляторов белка 14-3-380

CONTENTS

MATHEMATICS AND COMPUTER SCIENCE

- Vardanyan E.** Second order approximations for “Windy Gridworld” models7
- Rushanyan A.** Facial expression recognition model “SEGAN-CNN”15

PHYSICAL AND TECHNICAL SCIENCES

- Mkhitaryan N.** Features of Raman Scattering of Lithium Niobate Crystals Doped with Thulium Ions31

CHEMICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES

- Gharibyan Y.** Green Synthesis of Pyrimidine Derivatives based on Chalcones and preliminary evaluation of their biological properties38
- Hambardzumyan Y., Manukyan A., Tiratsuyan S.** Alzheimer's Disease: Neuropathologies, modern concepts, molecular mechanisms, prevention and treatment strategies47
- Oganesyanyan A., Oganyan S., Kazaryan Sh.** Antimicrobial resistance: the coming silent Pandemic62
- Paronyan A.** “De Novo” design of peptides as potential modulators for 14-3-3 protein80

МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА

DOI 10.24412/1829-0450-fm-2024-2-7-14
УДК 519.651

Поступила: 01.11.2024г.
Сдана на рецензию: 01.11.2024г.
Подписана к печати: 16.12.2024г.

SECOND ORDER APPROXIMATIONS FOR “WINDY GRIDWORLD” MODELS

E. Vardanyan

Russian-Armenian (Slavonic) University
edgarvardanyan1999@gmail.com
ORCID: 0009-0007-9702-3557

ABSTRACT

It has already been shown that moment closure approximation can be helpful for deriving analytical estimations for the distributions of parameters in different stochastic processes. In this paper we consider a stochastic process known as the “Windy Gridworld” model. In this model an agent moves in a grid and its policy is not deterministic, meaning it can slip and make a wrong step. Creating algorithms for navigation in such environments is often tackled using model-based Reinforcement Learning, where the modeling of the environment is a crucial step. In this work we derive closed-form equations that describe the dynamics of the mean and the variance of the robot's position in 1-dimensional and 2-dimensional “Windy Gridworld” models using moment closure approximation and compare the results with numerical values obtained with computer simulations.

Keywords: moment-closure approximation, stochastic process, mathematical modeling, robotics.

Introduction

“Windy Gridworld” models serve as fundamental benchmarks in robotics for understanding the effects of stochastic disturbances on autonomous agent navigation. In these models external factors, such as wind, are introduced for incorporating randomness into state transitions, thus mimicking real world scenarios where robots operate in some degree of uncertainty. Reinforcement learning is used to tackle these challenges by enabling robots to learn optimal policies. By using reinforcement learning algorithms, agents can refine their decision-making strategies to maximize cumulative rewards, effectively handling the unpredictability. In different reinforcement learning algorithms, modelling the environment is a crucial step (also known as model-based reinforcement learning). It is usually done by estimating state-transition probabilities and value functions [1]. In this work we will

try to find closed-form iterative equations that describe the dynamics of the robots position, thus proposing an approach that can be used for more accurate environment modelling. We will do this by applying moment closure approximation technique [2, 3, 4].

The concept of moment-closure approximation is useful when dealing with stochastic dynamical systems. These systems create a time-indexed series of random variables from a given state space $X : x = x(t) \in X$ for $t \geq 0$. It is assumed that the random variable x has a well-defined probability density function at any moment t . In this approximation, instead of estimating the entire PDF, we concentrate on different moments of this distribution. After establishing moment definition we need to establish a rule for the dynamics of those moments, which in general case can be infinite-dimensional and fully coupled. In order to make this system mathematically solvable, we can close the system by specifying the highest degree of the moment used [5].

In spite of the fact that moment-closure approximation appears across different scientific areas, a unified approach has not been established yet. In this paper we will derive moment relations with the help of master equation and will limit the calculations up to the second degree moment [2, 3]. This technique will be applied to both 1 dimensional and 2 dimensional gridworld models. The equations will be derived for general case (without specifying transition probabilities) and then will be tested for specific environment setups by being compared with the numerical results calculated by simulating the environment.

One dimensional model

In case of 1-dimensional model the robot can be in $N + 1$ different positions, all natural numbers satisfying $0 \leq x \leq N$. At each position, the robot will either go forward, back, or stay in the same position. Probabilities of going forward and backward will be denoted by $F = F(q)$ and $B = B(q)$ respectively, where $q = x/N$. Hereby we assume that F and B only depend on position, but the same technique could be applied if they depended on time t as well. In order to understand the rule by which the PDF of x changes we will use the master equation.

$$P(x, t + 1) = F \left(q - \frac{1}{N} \right) P(x - 1, t) + B \left(q + \frac{1}{N} \right) P(x + 1, t) + (1 - F(q) - B(q)) P(x, t)$$

We will denote by Q_t and $Q_{2,t}$ the expected values of q and q^2 at timestamp t respectively under the probability density function $P(x, t)$. We will use mean Q_t as our first moment and variance $V_t = Q_{2,t} - Q_t^2$ as our second moment. Under Gaussian ansatz, the expected value of any function $f(q)$ under distribution $P(x, t)$ can be approximated by

$$E[f(q)] \cong f(Q_t) + f''(Q_t) \frac{V_t}{2}$$

The equations for the dynamics of $E[q^\alpha]$ can be derived using the master equation.

$$\begin{aligned} & \sum_x P(x, t+1) \left(\frac{x}{N}\right)^\alpha \\ &= \sum_x \left(P(x, t) [q^\alpha (1 - F(q) - B(q))] + F(q) \left(q + \frac{1}{N}\right)^\alpha \right. \\ & \quad \left. + B(q) \left(q - \frac{1}{N}\right)^\alpha \right) \\ & \quad q = \frac{x}{N} \end{aligned}$$

As shown in the appendix of [2], from (2) and (3) can be derived the following iterative equations for Q_t and $Q_{2,t}$.

$$\begin{aligned} Q_{t+1} &= Q_t + \frac{F(Q_t) - B(Q_t)}{N} + (F''(Q_t) - B''(Q_t)) \frac{V_t}{2N} \\ Q_{2,t+1} &= Q_{2,t} + F(Q) \left(\frac{2Q_t}{N} + \frac{1}{N^2}\right) + B(Q_t) \left(-\frac{2Q_t}{N} + \frac{1}{N^2}\right) + (F''(Q_t) + B''(Q_t)) \frac{V_t}{2N^2} \\ & \quad + \left(2(F'(Q_t) - B(Q_t)) + Q_t(F''(Q_t) - B''(Q_t))\right) \frac{V_t}{N} \\ V_{t+1} &= Q_{2,t+1} - Q_{t+1}^2 \end{aligned}$$

This can be used for deriving specific equations for specific setups. For this, we will just need to plug F , B , and their corresponding first and second degree derivatives in (4).

One dimensional example

To validate equation (4), let's consider the following example. Suppose the robot starts its movement at time $t=0$ from position $x=0$ and for the rest of its motion tries to reach position $x=N$. As the robot moves further from the initial position, the probability of experiencing slippage increases. When slippage occurs, the robot stays in the same position instead of moving forward. We can represent this environment using specific formulas for F and B . These formulas describe the probabilities associated with moving forward or backward, considering the growing slippage risk as the robot progresses away from the origin. In our example we restrict the motion to only going forward or staying in the same position for the sake of simplicity.

$$F(q) = (1 - q^2)$$

$$B(q) = 0$$

Then, using (5) and (4) we can obtain the following equations for the mean-variance dynamics of a robot in this environment.

$$Q_{t+1} = Q_t + \frac{1 - Q_t^2}{N} + \frac{V_t}{N}$$

$$V_{t+1} = V_t + \frac{Q_t^2(1 - Q_t^2)}{N^2} - \frac{4Q_t V_t}{N}$$

These equations can be validated by estimating Q and V with computer simulations. More specifically, the above mentioned stochastic process has been launched 200000 times and the 200000 values of $q(t)$ have been used for estimating mean and variance at each timestamp. Then, those numerical estimations are compared with the analytical values obtained with (6). You can see numerical and analytical estimates on the same plot in Fig. 1.

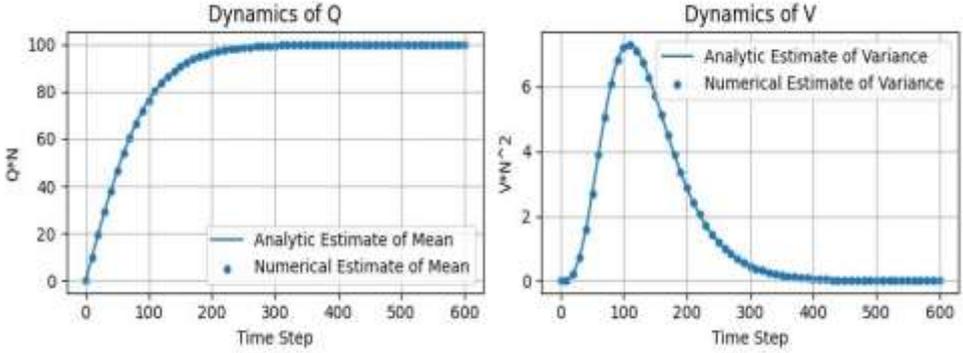


Figure 1: In this experiment the simulation has been launched according to (5) 200000 times with $N = 100$ and $x(0) = 0$. The numerical estimations are plotted by dots. The plotted line represents the analytical dynamics obtained with (6).

N	n_{steps}	1st degree approximation MAE	2nd degree approximation MAE
3	18	$6.79 \cdot 10^{-3}$	$4.01 \cdot 10^{-4}$
4	24	$7.67 \cdot 10^{-3}$	$5.11 \cdot 10^{-4}$
5	30	$7.43 \cdot 10^{-3}$	$4.05 \cdot 10^{-4}$
10	60	$8.41 \cdot 10^{-3}$	$4.74 \cdot 10^{-4}$
20	120	$8.30 \cdot 10^{-3}$	$8.08 \cdot 10^{-4}$
50	300	$8.59 \cdot 10^{-3}$	$1.11 \cdot 10^{-3}$
100	600	$9.00 \cdot 10^{-3}$	$9.11 \cdot 10^{-4}$

Table 1: Here for different values of N Mean Absolute Errors for first and second degree approximations are compared with one another. As can be seen, second degree approximation significantly outperforms the first degree approximation across different scales of N .

To further support our claim that the second-degree approximation provides a better estimate for Q compared to the first-degree approximation, we can conduct additional experiments. Specifically, we need to run simulations with various values of N and compute the Mean Absolute Error (MAE).

$$MAE = \frac{1}{n_{steps}} \sum_{i=1}^{n_{steps}} (NQ_i - \hat{X}_i)$$

$$\hat{X}_i = \frac{1}{n_{sim}} \sum_{j=1}^{n_{sim}} x^j_i$$

Here, Q_i refers to the analytical estimate of Q at the timestamp i , obtained either through the first or second-degree approximation, x^j_i is the value of x during the j -th simulation at timestamp i , n_{steps} is the number of steps simulated in this experiment and n_{sim} is the number of simulations used for obtaining the numerical results. By comparing these errors, we can assess the accuracy of each approximation method. As shown in Table 1, the second-degree approximation not only gives us the variance alongside the mean but also greatly enhances the precision of the mean estimate. Importantly, the results demonstrate consistent improvement across different scales of N , reinforcing the robustness of our approach.

Two dimensional model

Similar to the one dimensional model we can also construct a model for a two dimensional grid. In this case, the robot wants to get from $x=0$ to $x=N$ again, but in addition to x we have another coordinate y , which in some sense shows how much has the robot deviated from the shortest route. Similar to the one dimensional case, we will introduce auxiliary variables $q_x=x/N$ and $q_y=y/N$. Now, at each step the robot can move to 4 different directions (for simplicity we ignore the possibility of diagonal movement but they can be included in the calculations as well). The probability of moving forward or backward by x axis are denoted by $F_x(q_x, q_y)$ and $B_x(q_x, q_y)$. In similar fashion we define $F_y(q_x, q_y)$ and $B_y(q_x, q_y)$ for y axis. The master equation now will have the following form similar to (1).

$$P(x, y, t + 1) = F_x\left(q_x - \frac{1}{N}, q_y\right)P(x - 1, y, t) + F_y\left(q_x, q_y - \frac{1}{N}\right)P(x, y - 1, t)$$

$$+ B_x\left(q_x + \frac{1}{N}, q_y\right)P(x + 1, y, t) + B_y\left(q_x, q_y + \frac{1}{N}\right)P(x, y + 1, t)$$

$$+ \left(1 - F_x(q_x, q_y) - B_x(q_x, q_y) - F_y(q_x, q_y) - B_y(q_x, q_y)\right)P(x, y, t)$$

Similar to (3) we can derive the equations for the dynamics of $E[q^a q^b]$ by using (7).

$$\begin{aligned}
& \sum_x \sum_y P(x, y, t + 1) \left(\frac{x}{N}\right)^\alpha \left(\frac{y}{N}\right)^\beta \\
&= \sum_x \sum_y P(x, y, t) q_x^\alpha q_y^\beta \left(1 - F_x(q_x, q_y) - F_y(q_x, q_y) - B_x(q_x, q_y)\right. \\
&\quad \left. - B_y(q_x, q_y)\right) \\
&\quad + \sum_x \sum_y P(x, y, t) \left(\left(q_x + \frac{1}{N}\right)^\alpha q_y^\beta F_x(q_x, q_y)\right. \\
&\quad \left. + \left(q_x - \frac{1}{N}\right)^\alpha q_y^\beta B_x(q_x, q_y)\right) \\
&\quad + \sum_x \sum_y P(x, y, t) \left(q_x^\alpha \left(q_y + \frac{1}{N}\right)^\beta F_y(q_x, q_y)\right. \\
&\quad \left. + q_x^\alpha \left(q_y - \frac{1}{N}\right)^\beta B_y(q_x, q_y)\right) \\
&\qquad\qquad\qquad q_x = \frac{x}{N}, \quad q_y = \frac{y}{N}
\end{aligned}$$

Now we can define the moments to which we want to close our system of equations. We will denote $Q_a = E[q_a]$, $Q_{ab} = E[q_a q_b]$, $V_{ab} = \text{Cov}[q_a, q_b] = Q_{ab} - Q_a Q_b$, where $a, b \in \{x, y\}$. We can now derive the equations for the dynamics of Q_x , Q_{xx} and Q_{xy} (the equations for Q_y and Q_{yy} will be skipped for simplicity as they are identical to Q_x and Q_{xx} with the axes being reversed and Q_{yx} is equal to Q_{xy}). For simplicity we will also write F_a instead of $F_a(Q_x(t), Q_y(t))$ and B_a instead of $B_a(Q_x(t), Q_y(t))$.

$$\begin{aligned}
Q_x(t + 1) &= Q_x + \frac{F_x - B_x}{N} + \partial_{q_x q_x} (F_x - B_x) \frac{V_x}{2N} + \partial_{q_y q_y} (F_x - B_x) \frac{V_y}{2N} \\
&\quad + \partial_{q_x q_y} (F_x - B_x) \frac{V_{xy}}{N} \\
Q_{xx}(t + 1) &= Q_{xx} + \left(\frac{2Q_x}{N} + \frac{1}{N^2}\right) F_x + \left(-\frac{2Q_x}{N} + \frac{1}{N^2}\right) B_x + \partial_{q_x q_x} (F_x + B_x) \frac{V_x}{2N^2} \\
&\quad + \partial_{q_y q_y} (F_x + B_x) \frac{V_y}{2N^2} + \partial_{q_x q_y} (F_x + B_x) \frac{V_{xy}}{N^2} \\
&\quad + \left(2\partial_{q_x} (F_x - B_x) + Q_x \partial_{q_x q_x} (F_x - B_x)\right) \frac{V_x}{N} + Q_x \partial_{q_y q_y} (F_x - B_x) \frac{V_y}{N} \\
&\quad + \left(\partial_{q_y} (F_x - B_x) + Q_x \partial_{q_x q_y} (F_x - B_x)\right) \frac{2V_{xy}}{N}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
Q_{xy}(y+1) &= Q_{xy} + Q_y \frac{F_x - B_x}{N} + Q_x \frac{F_y - B_y}{N} + Q_y \partial_{q_x q_x} (F_x - B_x) \frac{V_x}{2N} \\
&+ \partial_{q_y} (F_x - B_x) \frac{V_y}{N} + \partial_{q_y q_y} (F_x - B_x) Q_y \frac{V_y}{2N} + \partial_{q_x} (F_x - B_x) \frac{V_{xy}}{N} \\
&+ Q_y \partial_{q_x q_y} (F_x - B_x) \frac{V_{xy}}{N} + Q_x \partial_{q_y q_y} (F_y - B_y) \frac{V_y}{2N} + \partial_{q_x} (F_y - B_y) \frac{V_x}{N} \\
&+ \partial_{q_x q_x} (F_y - B_y) Q_x \frac{V_x}{2N} + \partial_{q_y} (F_y - B_y) \frac{V_{xy}}{N} + Q_x \partial_{q_x q_y} (F_y - B_y) \frac{V_{xy}}{N}
\end{aligned}$$

Similar to the 1-dimensional model, these equations can also be used for calculating mean-variance dynamics in specific cases by using given F -s, B -s and their corresponding partial derivatives. This is the more general form of (4) and this generalization shows that the same approach can be extended to multidimensional models as well.

Conclusion

In this study, we developed and rigorously validated closed-form expressions for the mean and variance dynamics in both 1-dimensional and 2-dimensional «Windy Gridworld» models through the application of second-order moment closure approximation. Our work involved deriving comprehensive equations that model the intricate behavior of these stochastic systems and comparing them with data obtained from extensive numerical simulations. The findings underscore the significant advantage of second-order approximations over first-order approximations, particularly in estimating mean dynamics. By conducting a detailed comparison across a range of parameters in the 1-dimensional case, we highlighted the enhanced precision offered by our approach.

This framework provides a valuable tool for modeling stochastic disturbances in gridworld environments, which are crucial for developing robust algorithms in reinforcement learning and robotics. Accurate environmental modeling is a pivotal component of model-based reinforcement learning, and our method offers a systematic approach to handle uncertainties in dynamic settings. Furthermore, our work lays the groundwork for extending moment closure techniques to more intricate multidimensional environments, emphasizing the potential for future exploration. We envision that investigating higher-order approximations could yield even greater accuracy and broaden the applicability of this methodology to more complex and realistic navigation challenges, thereby enhancing the robustness of robotic systems in unpredictable environments.

REFERENCES

1. *RS Sutton and AG Barto*. Reinforcement learning: An introduction 1st edition. Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn, 30:1302–1321, 1998.
2. *Vardanyan E., Saakian D.B*. The analytical dynamics of the finite population evolution games. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications, 553:124233, 2020.

3. Vardanyan E., Koonin E. and Saakian D.B. Analysis of finite population evolution models using a moment closure approximation. Journal of the Physical Society of Japan, 90:014801, 2021.
4. Schnoerr D., Sanguinetti G. and Grima R. Validity conditions for moment closure approximations in stochastic chemical kinetics. The Journal of Chemical Physics, 141(8), 2014.
5. Kuehn Ch. Moment closure – a brief review. Control of self-organizing nonlinear systems. PP. 253–271, 2016.

ПРИБЛИЖЕНИЕ ВТОРОГО ПОРЯДКА ДЛЯ МОДЕЛЕЙ “WINDY GRIDWORLD”

Э.А. Варданын

Российско-Армянский (Славянский) университет

АННОТАЦИЯ

Показано, что приближение моментного замыкания может быть полезным для получения аналитических оценок распределений параметров в различных стохастических процессах. В данной работе мы рассматриваем стохастический процесс, известный как «модель ветреного мира сетки» (“Windy Gridworld”). В этой модели агент перемещается по сетке, и его политика не является детерминированной, то есть он может ошибиться и сделать неверный шаг. Создание алгоритмов навигации в таких условиях часто решается с помощью обучения с подкреплением, основанного на модели, где моделирование окружающей среды является важным этапом. В данной работе мы выводим замкнутые уравнения, описывающие динамику среднего и дисперсии положения робота в одномерных и двумерных моделях ветреного мира сетки, используя приближение моментного замыкания, и сравниваем результаты с численными значениями, полученными при компьютерном моделировании.

Ключевые слова: приближение моментного замыкания, стохастический процесс, математическое моделирование, робототехника.

DOI 10.24412/1829-0450-fm-2024-2-15-30
УДК 004.891

Поступила: 17.12.2024г.
Сдана на рецензию: 18.12.2024г.
Подписана к печати: 26.12.2024г.

МОДЕЛЬ РАСПОЗНАВАНИЯ ВЫРАЖЕНИЙ ЛИЦА “SEGAN-CNN”

А.Ф. Рушанян

*Национальный политехнический университет Армении
rushanyanaharon@gmail.com
ORCID: 0009-0007-3679-5609*

АННОТАЦИЯ

В данной статье предложена модель распознавания выражений лица (РВЛ) с целью функционирования системы взаимодействия человека и компьютера. Здесь представлена разработка и тестирование модели распознавания выражений лица “SEGAN-CNN”. В исследовании описываются: экспериментальная установка, процесс обучения и метрики производительности. Реализация модели включает в себя классическую методику ее построения, первый этап заключается в предварительной обработке изображения, то есть выделении области лица из входного изображения. На втором этапе для его улучшения за счет повышения разрешения и дорисовывания закрытых руками или аксессуарами его частей применена генеративно-сопоставительная сеть SEGAN, которая также генерирует синтетические данные с целью увеличения обучающей выборки. На третьем этапе множество сгенерированных изображений лиц с разными эмоциями передается нейронную сеть (CNN), после обучения которой осуществляется их классификация. Представлена архитектура как модели РВЛ, в целом, так и модели CNN.

Ключевые слова: предварительная обработка изображений, классификация, извлечение признаков, распознавание выражений лица.

Введение

Выражения лица являются важным способом общения для понимания эмоций человека. Человеческие эмоции идентифицируются по различным признакам – таким, как текст, электроэнцефалография, речь и лицо. Эмоции, реализуемые данными чертами, более заметны и наблюдаемы [1]. Существует широкий спектр применений эмоций в приложениях компьютерного зрения – таких, как анализ настроения с целью оценки уровня боли в человеческом теле, безопасность, криминалистика, медицина, общение, психологическое лечение и т.д. Эмоции на лице играют важную роль в различных эмоциональных состояниях, которые отражают поведение человека. По данным

Экмана и др. [2], на лице человека могут отражаться семь основных эмоциональных состояний – таких, как страх, нейтральность, печаль, отвращение, гнев, счастье и удивление. Распознавание данных состояний осуществляется на основе соответствующих выражений лица. Уловить данные выражения менее проблематично, чем другие эмоциональные черты в виду их более яркой выраженности.

Однако впоследствии, помимо выше предложенных эмоций, было замечено, что в основном преобладают смешанные эмоции [3], которые представляют собой комбинации из семи основных эмоций. Итак, за последние несколько лет распознавание эмоций с помощью выражений лица привлекло гораздо больше внимания к областям исследований в области аффективных вычислений и когнитивной науки. Существуют различные аспекты моделей РВЛ (распознавание выражения лица) во взаимодействии человека с компьютером, дополненной реальности, моделях помощников вождения и т.д. Во время реализации модели РВЛ категориальная модель субъекта выводит эмоции с точки зрения дискретных первичных эмоций [4].

Областями исследования выражения лица являются исследования аффективных вычислений [5], которые представляют собой применение проблем компьютерного зрения. В областях исследования аффективных вычислений распознавание выражений лица представляет собой категориальную модель. Анализ кодирования единиц лицевых действий представляет собой непрерывную модель. Модель РВЛ включает в себя как изображения, так и распознавание на основе видео [6]. Пространственная информация извлекается как представление признаков в модели РВЛ на основе изображений, тогда как в модели РВЛ на основе видео рассматриваются как пространственные, так и временные характеристики. Пространственные признаки обладают большей различимостью, чем временные признаки [6]. В частности, распознавание выражения лица формируется на основе глаз, рта и щек. Махмудхуджаев и др. [7] представили различные дескрипторы направления с выраженными локальными паттернами как особенности изображений лица. Данные модели и используемые методы соответствуют схемам представления локальных и глобальных функций, и большинство этих функций являются структурными и статистическими функциями.

В областях исследований компьютерного зрения вышеупомянутые функции успешно решают проблемы распознавания объектов, биометрической идентификации, распознавания лиц, распознавания на основе экземпляров и классификации текстур. Но из-за высокой ресурсозатратности вышеописанные модели имеют ограниченную производительность. В настоящее время подходы, основанные на глубоком обучении, добились большого успеха в решении проблем как в компьютерном зрении, так и в областях исследований делового мира. Подход, основанный на глубоком обучении, описывается как

нейронная сеть со многими слоями и параметрами. Этот подход определяет такие фундаментальные сетевые архитектуры, как неконтролируемые предварительно обученные сети, сверточные, рекуррентные и рекурсивные нейронные сети. Среди данных сетей для модели РВЛ чаще всего используются сверточные нейронные сети.

1.1 Анализ методики функционирования моделей РВЛ

Если, в целом, рассматривать методику функционирования системы РВЛ, то она включает в себя следующие шаги [8]:

1. Предварительная обработка изображения, которая состоит из: нахождения области лица, обрезки и масштабирования найденной области, выравнивания лица и регулировки контрастности;
2. Извлечение визуальных признаков;
3. Классификация эмоций.

В работе [8] по каждому шагу представлены различные решения других ученых в данной области, а также проведен сопоставительный анализ полученных результатов ими в ходе экспериментов на различных наборах тестовых данных. Анализируя сделанные авторами выводы, можно утверждать, что:

1. На шаге предварительной обработки лучший результат показал метод локализации Виолы-Джонса [13].
2. На втором и третьем шагах наиболее эффективно использование сверточных нейронных сетей CNN.

В ходе исследования был проведен анализ некоторых моделей РВЛ на основе CNN.

Модели распознавания выражений лица (РВЛ) достигли значительных успехов за эти годы, при этом широко используются такие методы, как метод Виолы-Джонса для обнаружения лиц и методы на основе GAN для улучшения изображений и шумоподавления. Однако эти традиционные подходы, хотя и эффективны в определенных задачах, часто сталкиваются с более тонкими проблемами в РВЛ – такими, как плохое качество изображения, тонкие выражения и потребности приложений в реальном времени. Напротив, модель “SEGAN-CNN” вносит существенные улучшения за счет интеграции генеративно-состязательных сетей (GAN) со сверточными нейронными сетями (CNN), устраняя присущие ограничения старых моделей и значительно повышая производительность РВЛ.

Ключевые преимущества “SEGAN-CNN”, по сравнению с моделями Виолы-Джонса и GAN следующие.

1. Улучшенная производительность за пределами обнаружения лиц (ограничение метода Виолы-Джонса).

Алгоритм метода Виолы-Джонса [13] является отличным инструментом обнаружения лиц, но не обрабатывает распознавание выражений лиц. Его основная функция заключается в быстром и эффективном обнаружении лиц на изображениях с помощью каскадного классификатора, но ему не хватает возможности захватывать и интерпретировать эмоциональные выражения обнаруженных лиц.

В отличие от этого, модель “SEGAN-CNN” объединяет возможности обнаружения лиц методом Виолы-Джонса с выразительной силой CNN для РВЛ. Используя экстрактор признаков на основе CNN для анализа обнаруженных лиц, модель “SEGAN-CNN” может классифицировать тонкие выражения лица – такие, как счастье, гнев, удивление или грусть, которые обычно сложно дифференцировать в стандартных алгоритмах обнаружения лиц. Интеграция SEGAN также повышает способность модели распознавать выражения даже на изображениях низкого качества, что делает ее гораздо более надежной в реальных приложениях, где качество изображений может варьироваться.

В отличие от метода Виолы-Джонса, который сосредоточен исключительно на распознавании лиц, “SEGAN-CNN” извлекает подробные черты из лиц и выполняет высокоточный РВЛ даже в сложных условиях (например, при слабом освещении, шуме или низком разрешении изображений). Эта двойная функциональность (распознавание лиц + РВЛ) предлагает комплексное решение задач РВЛ.

2. Превосходное шумоподавление и улучшение разрешения (улучшение по сравнению с традиционными GAN).

Хотя GAN, в частности, генеративные состязательные сети (GAN) и условные GAN (cGAN) показали успех в создании реалистичных изображений и улучшении изображений с низким разрешением, их применение в РВЛ часто ограничивалось улучшением изображений. Традиционные GAN – такие как те, которые используются в задачах перевода изображения в изображение, испытывают трудности с мелкозернистыми деталями лица, критически важными для РВЛ. Более того, с GAN часто требуют больших наборов данных и тонкой настройки обучения для достижения оптимальной производительности, что может привести к проблемам при работе с меньшими или несбалансированными наборами данных в РВЛ.

Однако модель “SEGAN-CNN” улучшает традиционные GAN, используя генеративную мощность SEGAN для шумоподавления и улучшения разрешения, специально адаптированную для изображений лица в контексте распознавания выражений. Благодаря инновационному дизайну, объединяющему CNN с SEGAN, модель не только снижает уровень шума на низкокачествен-

ных изображениях, но и повышает разрешение изображения, сохраняя важные черты лица (такие, как морщины, движения глаз и форма рта), которые имеют решающее значение для обнаружения тонких эмоций.

Подавление шума: SEGAN, используемые в модели “SEGAN-CNN”, учатся генерировать изображения без шума, различая черты лица и нежелательный шум. Этот состязательный процесс обучения приводит к более качественному входу для классификатора CNN, значительно повышая точность РВЛ.

Повышение разрешения: Масштабирование на основе SEGAN помогает модели генерировать изображения лица высокого разрешения из входов с низким разрешением, что, в свою очередь, позволяет лучше извлекать мелкие черты лица, которые могут быть упущены другими методами – такими как, традиционные GAN или даже базовые CNN.

Улучшение: благодаря объединению SEGAN с CNN модель “SEGAN-CNN” выходит за рамки простого улучшения изображения; она значительно повышает производительность РВЛ, особенно в шумных или низкоразрешающих средах. Такая двойная оптимизация шумоподавления и повышения разрешения напрямую устраняет ограничения, наблюдаемые в моделях на основе GAN для задач РВЛ.

3. Обработка в реальном времени для практических приложений.

Многие существующие модели РВЛ, включая основанные на методе Виолы-Джонса для обнаружения лиц и традиционные GAN для улучшения, часто требуют больших вычислительных затрат, что делает их непрacticalными для приложений в реальном времени – таких как, обнаружение эмоций в прямых видеопотоках или во время использования мобильных устройств. Вычислительная нагрузка GAN в реальном времени в сочетании с необходимостью в изображениях высокого разрешения и обширных данных обучения может затруднить развертывание этих моделей в средах с ограниченными ресурсами.

Модель “SEGAN-CNN” устраняет это ограничение, оптимизируя как скорость, так и точность системы РВЛ. Благодаря сочетанию эффективных архитектур на основе CNN и слоев улучшения SEGAN модель достигает хорошего баланса между производительностью в реальном времени и высокой точностью распознавания, даже в сценариях, включающих динамические видеопотоки или настройки с низкими ресурсами.

Модель “SEGAN-CNN” была разработана с учетом эффективности, что позволяет улучшить распознавание выражений лиц без больших вычислительных затрат, обычно связанных с моделями улучшения изображений на основе GAN. Это делает его хорошо подходящим для приложений реального времени – таких, как распознавание эмоций в видеоконференциях или в играх.

Модель “SEGAN-CNN”, интегрируя как GAN, так и CNN, достигает лучшего обобщения, фокусируясь не только на улучшении лица, но и на процессе извлечения признаков в CNN. Кроме того, шумоподавление и улучшение разрешения SEGAN повышают надежность модели в различных реальных условиях – таких, как различное освещение, углы или лицевые окклюзии.

Благодаря объединению SEGAN и CNN модель “SEGAN-CNN” демонстрирует превосходные возможности обобщения по сравнению с традиционными моделями РВЛ на основе GAN, что позволяет ей эффективно работать в более широком диапазоне приложений, настроек и наборов данных.

Следует отметить, что модель “SEGAN-CNN” не только превосходит модель распознавания лиц Виолы-Джонса и традиционные модели РВЛ на основе GAN, но и устанавливает новый стандарт надежного и высокоточного распознавания выражений лиц в различных средах и приложениях.

Для решения вышесказанных проблем в рамках работы предлагается после извлечения области лица и ее нормализации недостающие части лица дорисовывать с помощью генеративно-сопоставительной модели контроля эмоций SEGAN. Вместе с этим для данной модели не стоит задача классификация эмоций: пользователь может самостоятельно задать в качестве результата на исходном изображении требуемую эмоцию, после чего модель дорисует выражение лица в соответствии с требованием.

В исходном виде данную сеть можно использовать с целью увеличения данных для синтетического увеличения размера обучающих выборок в наборе данных. Данная техника позволяет увеличить точность и стабильность классификации эмоций. Вместе с этим рассмотренную ранее SEGAN можно использовать не только для увеличения объема обучающей выборки, но и для дорисовывания отдельных частей лица и увеличения разрешения изображения в целом, что впоследствии значительно увеличит точность классификации эмоции на нем.

Исходя из вышесказанного, была разработана категориальная модель РВЛ на основе изображений на основе синтеза архитектур CNN и SEGAN, позволяющая улучшить предварительную обработку изображения и классифицировать сложные эмоциональные выражения даже при условии отсутствия части данных или низком качестве изображения. В рамках классической методики РВЛ рассмотрим элементы предлагаемой модели.

1.2 Предварительная обработка изображения

Как говорилось ранее, главными проблемами, не позволяющими идентифицировать лицо и извлечь из него соответствующие эмоциональному состоянию признаки, являются шум, освещение, закрытие части лица руками, волосами или аксессуарами, загроможденный фон. Исходя из этого, исходное изображение I_{real} с целью выявления области лица передается на древовидную

модель [10], которая работает для всех вариантов поз лица. Данная модель вычисляет шестьдесят восемь ориентирных точек для фронтальной стороны лица и тридцать девять ориентирных точек для лица в профиль (Рис. 1).

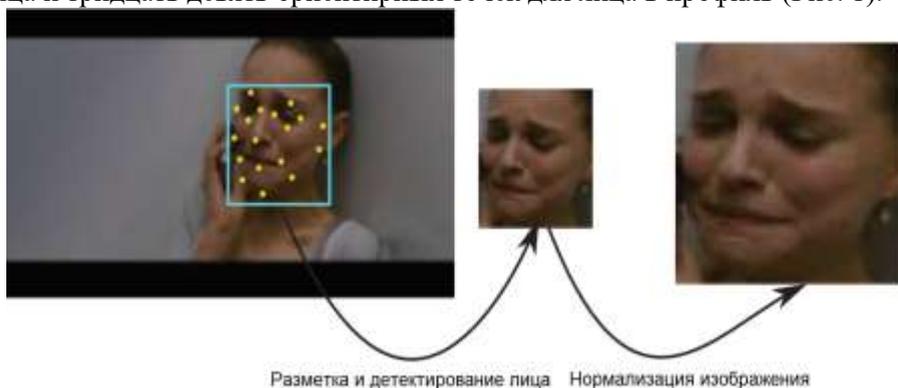


Рисунок. 1. Предварительная обработка изображения.

Затем данные ориентиры используются для расчета области лица на основе входного изображения. В целях нормализации обнаруженной области лица был применен метод интерполяции билинейного изображения. Сгенерированное изображение I_{gen} передается в сеть CNN с целью осуществления классификации эмоции на лице.

Разрешение сгенерированного изображения I_{gen} увеличено в 4 раза, при этом увеличена четкость линий лица и убрана правая рука от лица (Рис. 2).



Рисунок. 2. Сгенерированное изображение I_{gen} .

После этого для данного изображения формируется синтетическая обучающая выборка, которая смешивается с реальными изображениями и поступает в сверточную сеть CNN с целью ее обучения, по окончании которого

проводится оценка модели на тестовой выборке (Рис. 3). Рассмотрим функционирование CNN в рамках методики РВЛ в следующем подразделе.

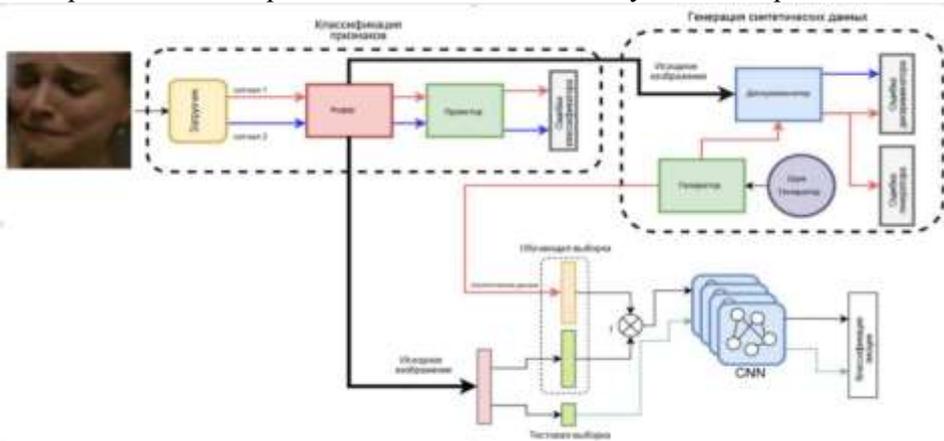


Рисунок. 3. Общая архитектура модели SEGAN-CNN.

1.3 Извлечение сетью CNN признаков с последующей классификацией

Функционирование сети CNN основано на таких блоках сверточных слоев, как слой пула, полносвязные слои и плотные слои [11]. Сверточный слой – это слой, где входными данными является изображение, свернутое с помощью нескольких отдельных фильтров (ядер). Далее свернутые изображения вычисляются как карты признаков ядер. Вычисление карт признаков увеличивает сложность сети CNN за счет увеличения размера изображения и количества ядер, используемых для этого сверточного уровня в сети.

Во время обучения функциям веса в ядре корректируются настройки параметров. Преимущества сверточного слоя заключаются в том, что:

1. Он обеспечивает локальную связность путем получения корреляций между соседними пикселями,
2. Распределение веса в одной и той же карте объектов снижает сложность сети.
3. Он поддерживает свойства, инвариантные к сдвигу при определении местонахождения объектов.

Таким образом, входные и выходные данные в слое свертки – это

$$F_{n \times n \times 3} \xrightarrow{w_{k \times l \times l}} F'_{n \times n \times k}, \quad (1)$$

где $F_{n \times n \times 3}$ – изображение трехцветного канала, $w_{k \times l \times l}$ – количество k ядер, каждое из которых имеет размер $l \times l$, $F'_{n \times n \times k}$ – производные карты объектов, при этом каждая карта объектов имеет размер $n \times n$.

Чтобы извлечь больше отличительных признаков из карт объектов, были использованы слои максимального пула. Техника слоя максимального пула уменьшает выборку матриц объектов до половины размера, если использовать размер фильтра 2×2 . В этом слое фильтр размером 2×2 перемещается по карте объектов, и сначала вычисляет в его области максимальное значение горизонтально, а затем вертикально для вычисления дискриминантных признаков в матричных картах на следующий слой. Преимущества использования слоев максимального пула заключаются в том, что:

1. Уменьшается количество параметров.
2. Снижаются вычислительные затраты на обучение.
3. Ускоряется процесс настройки параметров внутри сети, что позволяет избежать проблем переобучения.

Добавление полносвязного слоя осуществляется в конце сети для выполнения задачи классификации полученных данных из предыдущего слоя. Это гарантирует, что все нейроны предыдущих слоев полностью связаны со следующим слоем в виде одномерной карты объектов. В заключение строится плотный слой, который также является разновидностью полносвязного слоя.

Основные различия между полносвязными и плотными слоями заключаются в том, что:

1. В плотном слое выполняются линейные операции.
2. Плотный слой вычисляет оценки соответствия для каждой входной выборки.
3. Для получения результатов используется функция активации Softmax [12].

В дополнение к вышеупомянутым слоям в предлагаемой модели CNN были использованы такие слои, как пакетная нормализация и слои исключения. Уровень пакетной нормализации также снижает вычислительные затраты, сохраняя при этом однородность пакета данных для изучения параметров в сети. Слой исключения используется для игнорирования некоторых случайно выбранных нейронов в Сети при обучении, т.е. веса этих нейронов не будут обновляться во время обучения. Использование слоев исключения в Сети предотвращает проблемы переобучения и объединяет прогнозы различных нейронных сетей.

Схема архитектуры CNN показана на Рис. 4. На данном рисунке показаны шесть блоков, каждый из которых имеет последовательность слоев, т.е. сверточный + активации + макспулирования + пакетной нормализации. После шести блоков идут три полносвязных слоя. В качестве оптимизатора была использована функция активации Softmax.

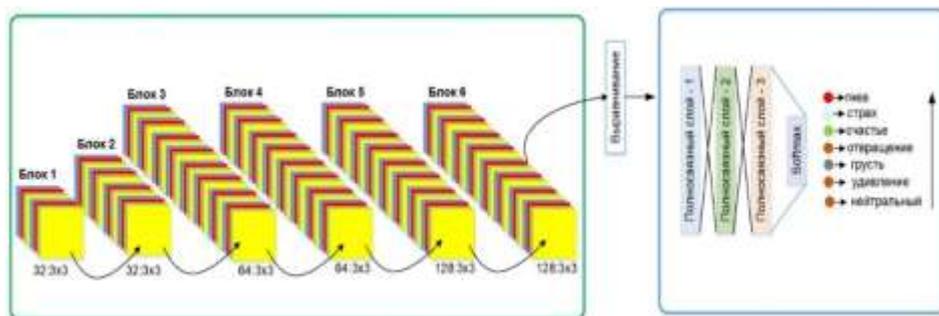


Рисунок 4. Предлагаемая архитектура CNN для модели РВЛ.

1.3.1 Выбор гиперпараметров, количество и структура слоев

В модели распознавания выражений лица “SEGAN-CNN” особое внимание уделялось выбору соответствующих гиперпараметров, определению количества и структуры слоев и оптимизации процесса обучения для обеспечения наилучшей производительности. Ниже мы обсудим каждый из этих аспектов:

1. Выбор гиперпараметров.

Для оптимизации производительности модели были выбраны различные гиперпараметры. К ним относятся:

- *Скорость обучения:* была выбрана скорость обучения 0,001, чтобы сбалансировать компромисс между скоростью сходимости и устойчивостью модели. Была предпочтительна меньшая скорость обучения, чтобы избежать переобучения и с целью повышения точности тонко настроенных признаков.
- *Размер пакета:* был использован размер пакета 32, чтобы обеспечить эффективные вычисления при сохранении достаточной стабильности градиента во время обратного распространения.
- *Частота выпадения:* чтобы предотвратить переобучение, после каждого полностью связанного слоя применялась частота выпадения 0,5, чтобы случайным образом установить подмножество единиц на ноль во время обучения.
- *Функции активации:* ReLU (Rectified Linear Unit) [9] была выбрана в качестве функции активации для скрытых слоев, чтобы ввести нелинейность и улучшить выразительность модели. Для выходного слоя использовалась функция активации Softmax [12] для многоклассовой классификации.

2. Количество и структура слоев.

Модель состоит из последовательной архитектуры, включающей сверточные слои, а затем слои пула, которые постепенно уменьшают пространственные размеры и извлекают признаки более высокого уровня.

- *Сверточные слои:* два сверточных слоя использовались для захвата пространственных признаков из изображений лиц. Каждый сверточный слой имеет фильтры размером 3×3 , а количество фильтров было установлено равным 64 и 128 соответственно.
- *Максимальные слои пула:* после каждого сверточного слоя использовались максимальные слои пула с окном 2×2 для понижения выборки карт признаков, уменьшая размерность при сохранении важной информации.
- *Полностью связанные слои:* после извлечения признаков были добавлены два полностью связанных слоя для изучения абстракций высокого уровня. Первый полностью связанный слой имел 512 нейронов, за которым следовал слой исключения для предотвращения переобучения. Второй полностью связанный слой имел ту же структуру, заканчиваясь выходным слоем Softmax [12] для классификации выражений лица по предопределенным категориям (например, счастливый, грустный, сердитый, нейтральный).

1.3.2 Процесс обучения, алгоритм оптимизации и генерация синтетических данных

1. Процесс обучения и алгоритм оптимизации.

Процесс обучения проводился партиями с использованием градиентного спуска мини-пакетов. Ранняя остановка использовалась для отслеживания потерь проверки, останавливая обучение, когда производительность модели больше не улучшалась. Использованным алгоритмом оптимизации был Adam [14], который сочетает в себе преимущества как RMSProp [15], так и стохастического градиентного спуска, адаптируя скорость обучения для каждого параметра.

Модель «обучалась» на наборе данных изображений лица, дополненных горизонтальными переворотами, случайными вращениями и корректировками яркости для повышения надежности. Этот процесс помог модели лучше обобщать невидимые данные.

2. Генерация синтетических данных.

Для улучшения обучающего набора модели были сгенерированы синтетические данные для устранения дисбаланса классов и обеспечения дополнительной вариативности. С помощью генеративно-состязательных сетей (GAN) изображений были сгенерированы синтетические изображения, которые воспроизводили реальные выражения лица.

Качество синтетических изображений тщательно оценивалось, чтобы убедиться, что они достаточно реалистичны для улучшения процесса обучения. Высококачественные синтетические данные помогают модели изучать более разнообразные представления выражений лица, что приводит к лучшему обобщению. С другой стороны, низкокачественные синтетические данные могут привести к переобучению или плохому обобщению, поскольку нереалистичные данные могут вносить шум и снижать способность модели обобщать реальные сценарии.

В результате, высококачественные синтетические данные были интегрированы в обучающий набор для балансировки исходного набора данных, что положительно повлияло как на скорость обучения, так и на окончательную эффективность классификации, уменьшая смещение в сторону доминирующих классов и повышая надежность модели.

1.4 Тестирование модели

Модель “SEGAN-CNN” была протестирована на стандартном наборе данных для распознавания выражений лиц, что гарантирует, что оценка отражает реальную производительность. В этом разделе описывается экспериментальная установка, метрики оценки и результаты.

Экспериментальная установка.

1. Набор данных:

- Модель была протестирована с использованием СК+ [17].
- Набор данных был предварительно обработан для нормализации размеров изображений и значений интенсивности оттенков серого.

2. Метрики оценки:

- Точность: для правильно классифицированных выражений.
- Четкость полнота и оценка F1: метрики для каждой категории выражений.
- Матрица путаницы: для подробной производительности по всем категориям.
- ROC-кривые: для оценки соотношения истинно положительных результатов и ложноположительных результатов для каждого выражения.

3. Конфигурация модели:

- Модель “SEGAN-CNN” использовала генератор для дополнения недостаточно представленных выражений и дискриминатор для обеспечения реалистичной аугментации. Классификатор CNN имел слои на основе ResNet[16] для извлечения признаков.

Результаты

1. Общая производительность:

- Точность: Модель достигла общей точности 91,2%.

Потери: Потеря проверки стабилизировалась на 0,23.

2. Метрики по категориям:

Производительность для отдельных выражений суммирована в таблице ниже (Табл. 1).

Таблица 1. Производительность для отдельных выражений.

Выражение	Точность (%)	Полнота (%)	F1-оценка (%)
Счастливый	92.4	91.8	92.1
Грустный	89.7	88.9	89.3
Злой	90.5	89.2	89.8
Удивление	94.1	93.7	93.9
Нейтральный	88.6	87.4	88.0

3. Матрица путаницы:

Матрица путаницы подчеркивает точность классификации для каждого выражения (Табл. 2).

Таблица 2. Классификации для каждого выражения.

Прогнозируемый\Фактический	Счастливый	Грустный	Злой	Удивление	Нейтральный
Счастливый	235	10	5	8	7
Грустный	12	221	9	7	15
Злой	6	8	228	5	13
Удивление	9	7	4	241	6
Нейтральный	8	14	11	9	218

4. Сравнение с существующими моделями:

“SEGAN-CNN” превзошла базовые модели – такие, как VGG-16 [18] и AlexNet [19], с улучшением точности на 5% по сравнению с самой эффективной базовой моделью. Например, в то время как VGG-16 достигла точности 86,2% на наборе данных CK+, “SEGAN-CNN” достигла 91,2%, продемонстрировав свою способность лучше обобщать различные выражения лица.

Включение фреймворка SEGAN увеличило разнообразие данных, особенно для недостаточно представленных выражений – таких, как «Удивление» и «Грусть», где традиционные модели часто испытывали трудности из-за дисбаланса классов.

В качественных оценках “SEGAN-CNN” продемонстрировала превосходную надежность в распознавании выражений в сложных условиях – таких

как, окклюзии и изменяющееся освещение, превзойдя ResNet-50 на 3% в этих сценариях.

5. Количественные метрики:

Для дополнительной проверки эффективности модели мы протестировали ее на подмножестве из 1200 изображений из набора данных СК+. Изображения были разделены на пять групп по 240 изображений в каждой, что обеспечило разнообразие по категориям выражений и условиям освещения. Метрики, полученные в результате оценки, суммированы в Табл. ниже. (Табл. 3)

Таблица 3. Метрики, полученные в ходе оценки.

Тестовая группа	Количество образцов	F1-оценка (%)	Точность (%)	ROC-кривые
Группа 1	240	90.6	91.2	0.92
Группа 2	240	91.1	91.5	0.93
Группа 3	240	89.8	90.4	0.91
Группа 4	240	91.5	92.0	0.96
Группа 5	240	90.2	90.8	0.94

Эффективность “SEGAN-CNN” оценивалась с использованием комплексного набора количественных метрик:

- Оценка F1: средневзвешенная оценка F1 по всем категориям составила 90,6%, что указывает на высокую производительность даже в несбалансированных классах.
- Кривые ROC: значения площади под кривой (AUC) для каждого выражения варьировались от 0,91 до 0,96, что подтверждает дискриминативную силу модели.
- Компромисс между точностью и полнотой: высокие значения точности и полноты по категориям указывают на надежность модели в различных сценариях.

Модель “SEGAN-CNN” демонстрирует надежную работу по распознаванию выражения лица, достигая самой высокой точности на наборе данных СК+.

Заключение

В рамках данной работы предложена новая модель распознавания выражений лица, сочетающая в себе архитектуры сверточных нейронных и генеративно-сопоставительных сетей. Функционирование данной модели основано на классической методике, при этом на каждом шаге модели реализованы улучшения с целью повышения точности распознавания. Применение

SEGAN позволило сформировать увеличенную обучающую выборку на основе генерации множества синтетических данных.

Кроме того, данная модель способна дорисовывать некачественные изображения, при этом не теряя его семантику. Предложенная модель CNN за счет полученных улучшений на предыдущем шаге более точно извлекает признаки и соответственно способна классифицировать эмоции на лице. Количественные метрики и анализ ошибок подчеркивают эффективность модели и области для будущего улучшения, предоставляя ценную информацию для продвижения технологий распознавания выражений лица.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jaimes, A., Sebe N.* (2007). Multimodal human–computer interaction: A survey. *Computer Vision and Image Understanding*, 108(1–2), 116–134. DOI 10.1016/j.cviu.2006.10.019.
2. *Ekman P., Matsumoto D., Friesen W.* (1997). Facial expression in affective disorders. In: *What the face reveals: Basic and applied studies of spontaneous expression using the facial action coding system (FACS)*, vol. 2. PP. 331–342.
3. *Tanaka J., Kaiser M., Butler S., Le Grand R.* (2012). Mixed emotions: Holistic and analytic perception of facial expressions. *Cognition & Emotion*, 26 (6), 961–977. DOI 10.1080/02699931.2011.630933.
4. *Hupont I., Cerezo E., Baldassarri S.* (2010). Sensing facial emotions in a continuous 2D affective space. 2010 IEEE International Conference on Systems, Man and Cybernetics, Istanbul, Turkey, IEEE.
5. *Cohn J. de la Torr F.* (2015). Automated face analysis for affective computing. In: *Calvo, R. A., D’Mello, S. K., Gratch, J., Kappas, A. (Eds.), The Oxford handbook of affective computing*. PP. 131–150.
6. *Chen J., Chen Z., Chi Z., Fu H.* (2016). Facial expression recognition in video with multiple feature fusion. *IEEE Transactions on Affective Computing*, 9(1), 38–50. DOI 10.1109/TAFFC.2016.2593719.
7. *Makhmudkhujaev F., Abdullah-Al-Wadud M., Iqbal M. T. B., Ryu B., Chae O.* (2019). Facial expression recognition with local prominent directional pattern. *Signal Processing: Image Communication*, 74. PP. 1–12.
8. *Рюмина Е.В., Карпов А.А.* Аналитический обзор методов распознавания эмоций по выражениям лица человека // «Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики», 2020. Т. 20. № 2. СС. 163–176. DOI: 10.17586/2226-1494-2020-20-2-163-176.
9. *Brownlee J.* (2020). A Gentle Introduction to the Rectified Linear Unit(ReLU).
10. *Sardar A., Umer S., Pero C., Nappi M.* (2020). A novel cancelable facehashing technique based on non-invertible transformation with encryption and decryption template. *IEEE Access*, 8, 105263–105277. DOI 10.1109/Access.6287639.
11. *Hossain S., Umer S., Asari V., Rout R.* (2021). A unified framework of deep learning-based facial expression recognition system for diversified applications. *Applied Sciences*, 11(19), 9174. DOI 10.3390/app11199174.
12. *Liang X., Wang X., Lei Z., Liao S., Li S.* (2017). Soft-margin softmax for deep classification. *International Conference on Neural Information Processing*. PP. 413–421. Long Beach, California, Springer.

13. *Viola P.M. Jones* (2001). Rapid Object Detection using a Boosted Cascade of Simple Features, DOI:10.1109/CVPR.2001.990517.
14. *Diederik P. Kingma, Jimmy Ba.* (2014). Adam: A Method for Stochastic Optimization. San Diego, 2015.
15. *Bushaev V.* (2018). Understanding RMSprop – faster neural network learning)
16. *Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren, Jian Sun* (2015). Deep Residual Learning for Image Recognition.
17. *James Ren Hou Lee, Linda Wang, Wong A.* (2020). EmotionNet Nano: An Efficient Deep Convolutional Neural Network Design for Real-time Facial Expression Recognition).
18. *Paras Varshney* (2020). VGGNet-16 Architecture: A Complete Guide
19. *Krizhevsky A., Sutskever I, Geoffrey E. Hinton* (2012). ImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks.

FACIAL EXPRESSION RECOGNITION MODEL “SEGAN-CNN”

A. Rushanyan

National Polytechnic University of Armenia

ABSTRACT

The model of facial expression recognition (FER) for the purpose of functioning of the human-computer interaction system is proposed. This article presents the development and testing of the “SEGAN-CNN” facial expression recognition model. The study describes the experimental setup, training process and performance metrics. The implementation of the model includes the classical methodology of its construction, the first step consists of image preprocessing, i.e. extraction of the face areas from the input image. At the second stage, the generative-adversarial network CEGAN, which also generates synthetic data in order to increase the training sample, is applied to improve it by increasing the resolution and to complete the parts of it covered by hands or accessories. In the third step, a set of generated images of faces with different emotions is fed to a neural network (CNN), after training it, classification is performed. The architecture of both the FER model as a whole and the CNN model is presented.

Keywords: Image preprocessing, classification, feature extraction, facial expression recognition.

ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

DOI 10.24412/1829-0450-fm-2024-2-31-37
УДК 535, 548

Поступила: 11.11.2024г.
Сдана на рецензию: 13.11.2024г.
Подписана к печати: 06.12.2024г.

ОСОБЕННОСТИ РАМАНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ КРИСТАЛЛОВ НИОБАТА ЛИТИЯ, ЛЕГИРОВАННЫХ ИОНАМИ ТУЛИЯ

Н.Н. Мхитарян^{1,2}

¹*Армянский государственный педагогический университет имени Х. Абовяна*

²*Институт физических исследований Национальной академии наук Армении*

nune.mkhitarian@gmail.com

ORCID: 0000-0003-1184-3399

АННОТАЦИЯ

В данной статье получены спектры Рамановского рассеяния монокристаллов ниобата лития легированных редкоземельными ионами тулия $\text{LiNbO}_3:\text{Tm}^{3+}$ при лазерном возбуждении на длинах волн 785нм и 532нм. Оценены изменения состава и структуры кристаллов вследствие легирования. Обсуждены механизмы появления в полученных спектрах при возбуждении лазером на 785нм широкополосных линий – наряду с разрешенными Рамановскими модами.

Ключевые слова: кристалл, ниобат лития, Рамановское рассеяние.

Введение

Кристаллы ниобата лития (LN) ввиду своих уникальных нелинейно оптических, электрооптических, пьезоэлектрических и фоторефрактивных свойств являются одними из наиболее широко используемых и исследуемых материалов.

Однако, помимо своих основных применений, в частности, в плане преобразователей частоты излучения лазерного излучения, электрооптических затворов и сред для голографической записи информации, кристаллы LN, легированные редкоземельными трехвалентными ионами, являются перспективным материалом для современных компактных устройств, в частности, в качестве рабочих элементов для лазеров в инфракрасной областях спектра. Прежде всего, они выделяются своей многофункциональностью, дающей возможность одновременного использования в одном элементе нескольких своих свойств, конкретно: лазерных, нелинейно оптических, электрооптических, пьезоэлектрических и т.д. [1–5].

Кроме того, исследования последних лет показывают, что кристаллы LN, легированные такими редкоземельными ионами, как Yb^{3+} , Er^{3+} , Ho^{3+} и Tm^{3+} , могут служить хорошим материалом для создания на их основе оптических сенсоров, оптических охлаждающих систем, лазерных систем с самоохлаждением и лазерных радиационно-балансированных систем [6–9].

Несмотря на большое число публикаций, в вышеуказанных направлениях исследования в области влияния указанных примесных ионов на состав и структуры LN отсутствуют. В данной работе приведены результаты исследования влияния ионов Tm^{3+} на состав и структуру кристаллов LN конгруэнтного состава посредством Рамановской спектроскопии.

Основная часть

1. Материалы и методы

Для приготовления исходных материалов для выращивания кристаллов LN использовались высокочистые соединения фирм “Johnson-Matthey” (Nb_2O_5) и “Merck” (Li_2CO_3) в виде порошка. Из указанных порошков по твердофазной реакции на воздухе была синтезирована порошкообразная матрица LN. Концентрация примесных ионов Tm^{3+} составляла 0.01 и 0.1 мол% при добавлении в исходный расплав в виде окиси тулия (чистота – 99,99%, Merck). Кристаллы LN: Tm^{3+} конгруэнтного состава выращивались методом Чохральского на воздухе в высокочастотной печи на модифицированной установке типа «Донец-3».

Рамановские спектры обратного рассеяния на указанных образцах при конфигурации измерений $\text{Y}(\text{ZZ})\text{Y}$ и $\text{Y}(\text{ZX})\text{Y}$ и лазерном излучении 785 нм и 532 нм зарегистрированы на Рамановском конфокальном микроскопе типа “Horiba XploRA PLUS”. Расчет состава полученных кристаллов, а конкретно: концентрации оксида лития (Li_2O) в кристалле на основе Рамановских спектров, проведен с использованием метода, предложенным в работе [10]. Для этого используется значение полной ширины на половине максимума (FWHM) фона $\text{A}_1(\text{TO}_1)$, полученного при конфигурации измерения $\text{Y}(\text{ZZ})\text{Y}$.

2. Результаты и их обсуждение

Полученные спектры Рамановского рассеяния при конфигурации измерений $\text{Y}(\text{ZZ})\text{Y}$ и $\text{Y}(\text{ZX})\text{Y}$ с использованием лазерного излучения длинной волны 532 нм для кристаллов LN: Tm^{3+} с концентрацией примесного иона 0.01 и 0.1 мол% приведены на Рис.1 (а,б). Как видно из рисунков, при конфигурации $\text{Y}(\text{ZZ})\text{Y}$ получены спектры рассеяния только разрешенных при данной конфигурации мод $\text{A}_1(\text{TO})$. То же самое можно сказать и для конфигурации $\text{Y}(\text{ZX})\text{Y}$, при которой получены спектры рассеяния только разрешенных при данной конфигурации мод $\text{E}(\text{TO})$ – Рис.2 (а,б).

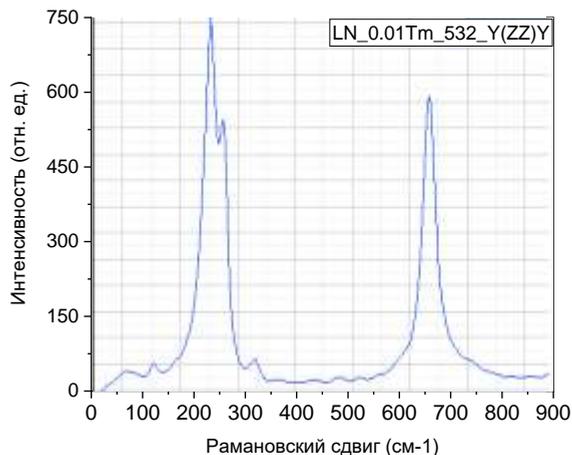


Рис.1. (а) Спектр Рамановского сдвига для кристаллов LN:0.01мол%Tm³⁺ при конфигурации измерений Y(ZZ)Y для лазерного излучения 532нм.

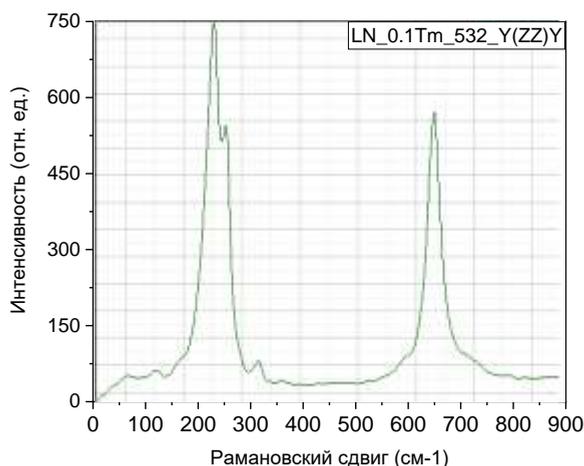


Рис.1. (б) Спектр Рамановского сдвига для кристаллов LN:0.1мол%Tm³⁺ при конфигурации измерений Y(ZZ)Y для лазерного излучения 532нм.

Однако при лазерном излучении 785нм, при тех же конфигурациях измерений, регистрируются широкие, очень интенсивные линии – помимо разрешенных Рамановских мод, которые полностью перекрывают Рамановские линии (Рис. 3).

Сравнительный анализ Рамановских спектров, полученных при лазерном излучении на 532нм для кристаллов LN:Tm³⁺ с концентрацией примесного иона 0.01 и 0.1мол% и спектра номинально чистых кристаллов LN показывают, что, вне зависимости от наличия и применимых в эксперименте концентрации примесных ионов, в структурах кристаллов изменений не наблюдаются.

На основании спектров Рамана был проведен расчет состава полученных кристаллов методом Занга [10], используя значение полной ширины на половине максимума (FWHM) для фонона A1(TO1), измеренного в конфигурации Y(ZZ)Y. Анализ проводился как для номинально чистых кристаллов LN, так и для кристаллов LN:Tm³⁺ с концентрацией ионов-примесей 0.01 и 0.1 мол%. Результаты показали, что во всех трех случаях концентрация Li₂O в кристаллах составила 48.45 ± 0.02 мол%, что соответствует конгруэнтному составу.

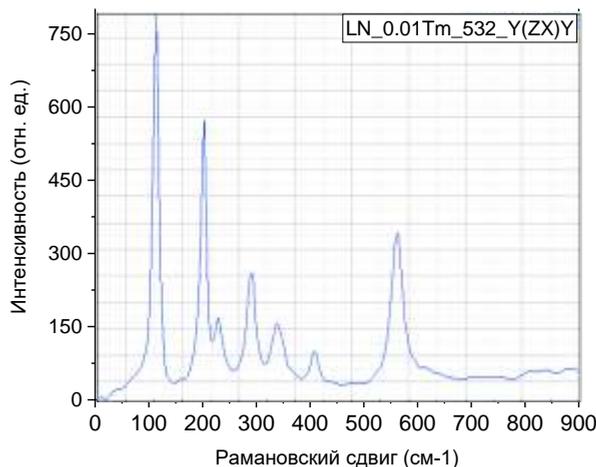


Рис.2. (а) Спектр Рамановского сдвига для кристаллов LN:0.01мол%Tm³⁺ при конфигурации измерений Y(ZX)Y для лазерного излучения 532нм.

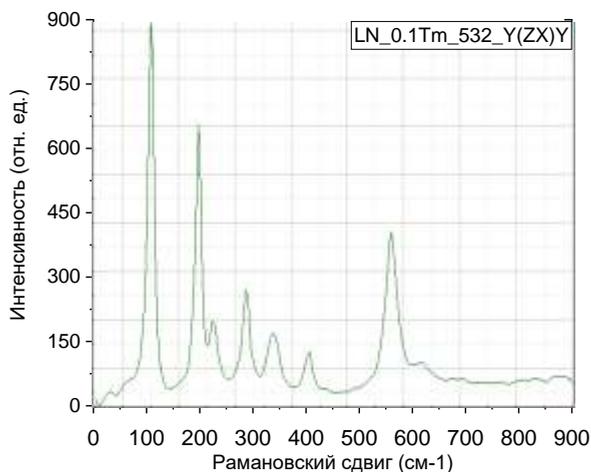


Рис.2. (б) Спектр Рамановского сдвига для кристаллов LN:0.1мол%Tm³⁺ при конфигурации измерений Y(ZX)Y для лазерного излучения 532нм.

В случае лазерного излучения на 785нм появление интенсивных линий, помимо разрешенных Рамановских мод, по всей вероятности, связано с появлением люминесценции примесного иона при возбуждении на длине волны используемого лазера, что согласуется с нашими результатами, полученными в работе [10], посвященной исследованию спектроскопических свойств указанных кристаллов, где наблюдается люминесценция при возбуждении кристалла вблизи 800нм.

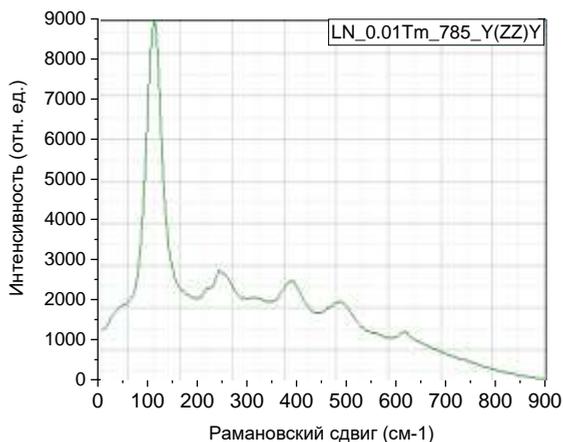


Рис.3. Спектр Рамановского сдвига для кристаллов LN:0.01мол%Тm³⁺ при конфигурации измерений Y(ZZ)Y для лазерного излучения 785нм.

В пользу указанного предположения свидетельствуют также аналогичные данные, полученные для кристаллов LN:Ho³⁺ [11], с той лишь разницей, что в этом случае дополнительные линии, связанные с люминесценцией примесного иона Ho³⁺, наблюдались при использовании лазера с длиной волны 532 нм.

Заключение

На основе результатов анализа Рамановских спектров кристаллов LN:0.01мол%Тm³⁺ и LN:0.1мол%Тm³⁺, полученных при конфигурациях измерений Y(ZZ)Y и Y(ZX)Y и лазерного возбуждения на 532нм, было показано, что структура и состав кристаллов (концентрация Li₂O) в пределах точности эксперимента остаются без изменений. Сравнение Рамановских спектров указанных кристаллов при возбуждении на 532нм и 785нм в обоих Y(ZZ)Y и Y(ZX)Y конфигурациях показал, что при возбуждении на 532нм получают только спектры разрешенных Рамановских линий, однако при возбуждении на 785нм в спектрах наблюдаются интенсивные линии, помимо разрешенных

Рамановских мод, что, по всей вероятности, связано с люминесценции ионов Tm^{3+} при указанном возбуждении.

Автор благодарит проф. Э. Коканян за полезные указания при постановке задачи и ценные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cordova-Plaza A., Digonnet M., Shaw H. Miniature CW and Active Internally Q-Switched Nd:MgO:LiNbO₃ Lasers/IEEE J. Quantum Electronics, vol. QE-23, 2, 1987. PP. 262–266.
2. Lallier E., Pocholle J., Papuchon M., Micheli de M. et al. Nd:MgO:LiNbO₃ waveguide laser and amplifier /Optics Letters, 15, 1990. PP. 682–684.
3. Jinhao W., Yueping Z., Haiping X. et al. Growth of Nd³⁺ doped LiNbO₃ crystals using Bridgman method and its spectral properties/ Bulletin of Materials Science, 32, №2, 2009. PP.183–186.
4. Montoya E., Sanz-Garcia J.A., Capmany J., Bausa L.E., Diening A., Kellner T., Huber G. Continuous wave infrared laser action, self-frequency doubling, and tunability of Yb³⁺:MgO:LiNbO₃/ J. Appl. Phys. 87, 2000. PP. 4056–4062.
5. Streque J., Aubert T., Kokanyan N., Bartoli F., Taguett A., Polewczyk V., Kokanyan E., Hage-Ali S., Boulet P., Elmazria O. Stoichiometric lithium niobate crystals: towards identifiable wireless surface acoustic wave sensors operable up to 600°C/IEEE Sensors Letters, 3, 2019. PP. 1–4.
6. Kokanyan N., Mkhitarayan N., Demirkhanyan G., Kumar A., Aillerie M., Sardar D., Kokanyan E. LiNbO₃-Tm³⁺ Crystal. Material for Optical Cooling /Crystals, 11, 50. 2021. PP. 1–8.
7. Demirkhanyan G., Kokanyan N., Aillerie M., Kokanyan E. Spectroscopic Properties of LiNbO₃-Er³⁺ Crystal in the wavelength of 1470–1635 nm /J. Contemp. Phys. 57, 4, 2022. PP. 352–357.
8. Demirkhanyan G., Kokanyan E., Demirkhanyan H., D. Sardar, Aillerie M. Crystal LiNbO₃-Ho³⁺: Material for optical cooling/J. of Contemp. Phys. (Arm. Acad. of Sci.), 51, 1, 2016. PP. 28–34.
9. Mkhitarayan N., Demirkhanyan G., Kokanyan N., Kokanyan E. LiNbO₃:Tm³⁺ Crystal: Material for radiation-balanced laser in the wavelength range of 1650-2000 nm/ Armenian Journal of Physics, vol. 16, issue 3, 2023. PP. 102–108.
10. Zhang Y., Guilbert L., Bourson P., Polgar K., Fontana M. Characterization of short-range heterogeneities in sub-congruent lithium niobate by micro-Raman spectroscopy/ J. Phys.: Condens. Matter vol 18, 2006. PP. 957–963.
11. Kokanyan N., Kokanyan E., Babajanyan N., Kauffmann T., Fontana M. Luminescence of Ho-doped lithium niobate crystals highlighted by Raman spectroscopy / SPIE Optical Engineering + Applications, v.10750, 2018. PP. 1–5.

FEATURES OF RAMAN SCATTERING OF LITHIUM NIOBATE CRYSTALS DOPED WITH THULIUM IONS

N. Mkhitaryan^{1,2}

¹*Armenian State Pedagogical University after Kh. Abovyan*

²*Institute for Physical Research NAS RA*

ABSTRACT

Raman scattering spectra of lithium niobate single crystals doped with rare earth thulium ions $\text{LiNbO}_3:\text{Tm}^{3+}$ were obtained under laser excitation at wavelengths of 785 nm and 532 nm. Changes in the composition and structure of crystals as a result of doping are assessed. The mechanisms of the appearance of broadband lines in the obtained spectra upon excitation by a 785 nm laser, beside the allowed Raman modes, are discussed.

Keywords: crystal, lithium niobate, Raman spectroscopy.

DOI 10.24412/1829-0450-fm-2024-2-38-46
УДК 547.853.1 + 547.38

Поступила: 17.10.2024г.
Сдана на рецензию: 18.10.2024г.
Подписана к печати: 28.10.2024г.

ЗЕЛЕНЬЙ СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА НА БАЗЕ ХАЛКОНОВ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Я.А. Карибян

*Российско-Армянский (Славянский) университет
Институт Биомедицины и Фармации (ИБФ)
e-mail yan.gharibyan@gmail.com
ORCID: 0000-0002-7180-1257*

АННОТАЦИЯ

В данной статье осуществлен синтез производных пиримидина как традиционными методами, так и под действием микроволнового облучения, соответствующего основным требованиям «Зеленой химии». Показано, что при микроволновой активации молекул реагентов повышается выход конечных продуктов, а время реакций и потребление электроэнергии резко сокращаются. При этом достигается общая экономия энергзатрат в 6–12 раз.

При проведении биологического скрининга синтезированные соединения проявили выраженное стимулирующее действие на рост растений.

Ключевые слова: халконы, циклизация, пиримидины, стимуляторы роста растений.

Введение

Химическая модификация функционально замещенных халконов имеет большие и еще не до конца раскрытые потенциальные перспективы и до сих пор привлекает повышенное внимание многочисленных исследователей, что отражается в ежегодно увеличивающемся количестве публикаций в авторитетных журналах [1, 2]. С использованием халконов синтезирован ряд производных с различными гетероциклами, в частности, пиримидином. Производные пиримидина обладают широким спектром биологической активности. Пиримидиновое кольцо является составной частью многих природных биомолекул. Пиримидиновые основания (тимин, урацил, цитозин) и пуриновые основания (аденин, гуанин) входят в состав нуклеиновых кислот, сильных ядов (тетродотоксин) и коэнзимов (уридинфосфатглюкоза). N-метильные производные ксантина являются составной частью природных алкалоидов (теофиллин, теобромин, кофеин). Оrotовая кислота, витамин В₁ (тиамин бро-

мид) и полученная на его основе кокарбоксилаза, рибофлавин, фолиевая кислота также содержат пиримидиновое кольцо. В медицинской практике широко применяются синтетические противоопухолевые препараты, препараты ряда барбитуратов, сульфаниламиды, а также антимикробные, антималярийные, антигипертензивные, противогельминтные, противогерпесные, противогрибковые, противовирусные, антипаркинсонические и анти-ВИЧ препараты. Некоторые лекарства применяются при инфекциях дыхательных и мочевыводящих путей периферической невропатии в качестве отхаркивающего и муколитического средства [3]. В результате продолжающихся исследований в ряду замещенных пиримидинов обнаружены соединения, обладающие антибактериальной и антимикробной [4–6], противогрибковой [7], противоопухолевой [8, 9], противовоспалительной и анестезирующей [10, 11], противосудорожной [12, 13], антиоксидантной [14], противовирусной [15], анти-ВИЧ [16, 17], противотуберкулезной [18], антималярийной [19], кардиотонической [20] активностью. Некоторые производные пиримидина являются ингибиторами ацетилхолинэстеразы [21].

В сельском хозяйстве производные пиримидина применяются в качестве фунгицидов инсектицидов и акарицидов [22]. Однако в основном производные пиримидина известны в качестве гербицидов различных химических групп: пиримидиндиаминов, пиримидиноксибензиламинов, пиримидинилокси- и пиримидинилтиопроизводных бензойной кислоты. Вместе с тем в настоящее время наибольшее распространение получили сульфуроновые производные пиримидина, в молекулах которых пиримидиновый цикл связан с другими гетероциклами или арильным остатком через сульфонилмочевинную группу [22]. В последние годы появились работы, в которых описаны новые производные пиримидина, проявившие в эксперименте стимулирующее действие на рост растений [23–25]. По этой причине органический синтез производных пиримидина привлекает внимание в течение многих десятилетий, и новые методы целенаправленного синтеза этих соединений, разработанные за последние два десятилетия, представляет особый интерес.

В связи с вышеизложенным целью данного исследования являлся синтез новых пиримидиновых производных на базе халконов.

Следует отметить, что препаративные синтезы, основанные на конденсации гуанидина с халконами и/или их гетероциклическими (тиенильными, фурильными) аналогами, как правило, приводят к дигидропиримидинам [26]. Полученные на этой стадии 4,6-диарильные производные 2-амино-1,2-дигидропиримидина должны быть окислены для образования ароматического цикла. Этот процесс протекает в реакционной смеси за счет кислорода воздуха [26]. Для облегчения дегидрирования дигидро-2-аминопиримидинов конденсацию α,β -ненасыщенных карбонильных соединений с гуанидинами

или их солями проводят в токе сухого воздуха в диметилсульфоксиде, обладающего окислительными свойствами, в присутствии цеолитов в качестве катализаторов и дегидратирующих агентов [27]. Однако образование ароматических продуктов в результате окисления интермедиатов протекает только при использовании реагентов в микроколичествах (1–10 ммоль), когда количество кислорода воздуха достаточно для этого процесса. В отличие от этого при взаимодействии больших количеств реагентов (нескольких сотен ммоль) основным продуктом реакции является дигидропиримидиновое производное [28]. По этой причине синтез (гет)арилзамещенных 2-аминопиримидинов, как правило, проводят с использованием окислителя (пероксида водорода) [29–31] и соединения получают с выходом 60%.

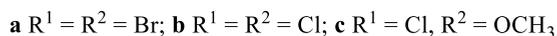
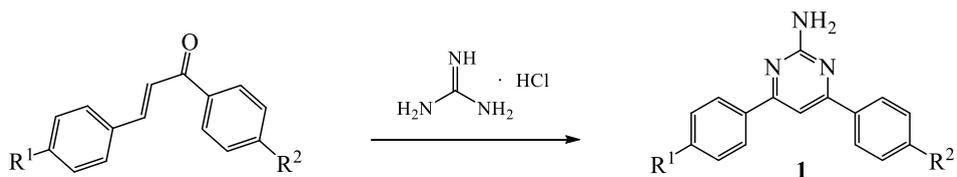
Вместе с тем, оказывается, что важную роль при этом играет очередность добавления реагентов. Так, при кипячении халкона и гуанидина в смеси этанола и 50% водного раствора КОН в течение 3 часов образуется дигидропиримидин. Далее к горячему раствору добавляли избыток 30% водного раствора перекиси водорода. При этом не только была завершена ароматизация, но и все нежелательные смолистые побочные продукты были окислительно деградированы, что привело к чистому раствору и позволило легко изолировать требуемые пиримидиновые продукты с выходом 40–70% без каких-либо трудностей в очистке. Другая картина наблюдается, когда изначально в реакционную среду добавляют реагенты и окислитель вместе в одной порции. В этом случае с достаточно хорошим выходом получают совершенно другие продукты – 2-амино-5,5-дизамещенные имидазолин-4-оны [28].

Необходимо отметить, что на механизм реакции между халконом и гуанидином оказывает влияние также природа заместителей в арильных циклах халкона. Например авторы работы [29] установили, что в случае галогензамещенных арильных радикалов халконов образуются конденсированные 2,4,6,8-тетраарил-1,6-дигидро-4Н-пиримидо[1,2-а]пиримидины.

Таким образом, из вышеизложенного следует, что в литературе имеются противоречивые данные о протекании реакции между халконами и гуанидином. По этой причине синтез 4,6-диарилпроизводных 2-аминопиримидина из халконов требует внимательного подхода и четкого доказательства структуры конечных продуктов.

Результаты и обсуждение

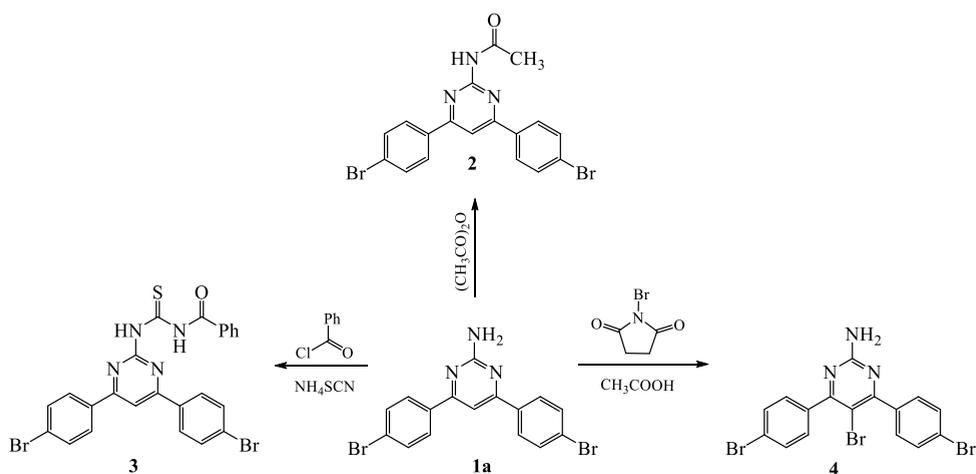
Исходные соединения 4,6-бис (4-замещенныхфенил)-2-аминопиримидины (1), были получены кипячением 1,3-бис (4-замещенныхфенил)поп-2-ен-1-онов с гидрохлоридом гуанидина.



Осуществлена модификация соединения **1a** за счет аминной группы пириимидинового цикла.

Реакцией исходного продукта **1a** с ангидридом уксусной кислоты получен соответствующий ацетамид **2**. Взаимодействием того же соединения (**1a**) с бензоилхлоридом и роданидом аммония приводит к образованию *N*-((4,6-бис(4-бромфенил)пириимидин-2-ил)карбамотиоил)бензамида (**3**). Осуществлено также бромирование исходного соединения (**1a**) под действием бромсукцинимида в среде уксусной кислоты, в результате чего получено бромпроизводное (**4**).

Синтез конечных продуктов **1–4** осуществлен как традиционными методами синтеза, так и под воздействием микроволнового облучения. Выходы продуктов, их температуры плавления и времена протекания реакций приведены в Табл. 1.



Данные Табл. 1 свидетельствуют о том, что при микроволновой активации реагирующих молекул выходы конечных продуктов повышаются. В то же время отмечается резкое сокращение времени протекания реакций, что приводит к уменьшению энергозатрат. Так, например, время реакции синтеза

соединения 1b традиционным методом составляет 8 часов, при этом для нагревания реакционной смеси используется электроплита мощностью 1000 Вт, и общие энергозатраты составляют 8000 Вт. При МВ облучении время реакции сокращается в 4 раза – до 2 часов, а применяемая мощность установки равна 600 Вт. Таким образом, используемая мощность составляет 1200 Вт. Из этих расчетов следует, что в данном случае, помимо ускорения реакции в 4 раза, потребление электроэнергии уменьшается более, чем в 6 раз.

Таблица 1. Сравнение времени реакций, выходов и температур плавления целевых продуктов.

№	Традиционный метод			Метод МВ облучения		
	Выход (%)	T _{пл} (°C)	Время реакции (ч.)	Выход (%)	T _{пл} (°C)	Время реакции (ч.)
1a	75	230	14	78	230	2
1b	64	210	8	70	210	2
1c	67	175	8	75	175	2
2	61	255	2	66	255	0.5
3	63	230	4	74	230	1
4	60	290	2	68	290	0.5

Биологические свойства синтезированных соединений

При проведении лабораторно-вегетационных испытаний практически все соединения продемонстрировали стимулирующее действие на рост растений. Эксперименты проводились на семенах и саженцах фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris L.*). Изучалось влияние водных суспензий соединений 1–4 в концентрациях 25 мг/л на жизнеспособность семян, прорастание и рост рассады. Эти данные сравнивались с аналогичным эффектом их водных растворов. Активность соединений колебалась в интервале 64–127% по сравнению с водными растворами (Табл. 2). Вещества 1a, 2 и 3, проявившие в эксперименте наибольшую активность, отобраны для более глубокого изучения и дальнейших полевых испытаний.

Таблица 2. Ростостимулирующая активность синтезированных соединений.

№	Ростостимулирующая активность (%)	№	Ростостимулирующая активность (%)
1a	126	3	113
1b	70	4	64
2	127		

Экспериментальная часть

Синтезы с использованием микроволнового излучения проводились на рабочей станции микроволнового синтеза MAS-II Plus ("SINEO") с максимальной мощностью облучения 1000 Вт. Во всех экспериментах использовалась мощность облучения 30% (300 Вт), или 60% (600 Вт).

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C сняты при 30 °С на спектрометре ЯМР Varian Mercury-300 (300 и 75 МГц, соответственно) в смеси растворителей $\text{DMCO-}d_6 + \text{CCl}_4$ (3:1) с применением стандартной импульсной последовательности, в качестве внутреннего стандарта использовался ТМС. Ход реакций и чистота полученных соединений проверялась методом ТСХ на пластинах "Silufol UV-254", в качестве элюента использовалась смесь ацетон/гексан (2:1). Температуры плавления определялись на приборе Stuart SMP10.

Синтез соединений 1-4 традиционными методами

2-Амино-4,6-бис(4-бромфенил)пиримидин (1a). Смесь 0.18 г (0.0018 моль) гидрохлорида гуанидина, 0.2 г (0.005 моль) гидроксида натрия в 10 мл абсолютного этилового спирта нагревают при 60–65°С 30 минут. К раствору добавляют 0.36 г (0.001 моль) 1,3-бис(4-бромфенил)проп-2-ен-1-она и кипятят на масляной бане 12 часов. Раствор охлаждают, осадок фильтруют, протирают водой. Выход 0.3 г (75%), т.пл. 230°С. Спектр ^1H ЯМР δ м.д., J (Гц): 6.28 (с, 2H, NH_2); 7.55 (с, 1H, СН-пиримидин); 7.44-8.10 (м, 8H, Ar). Спектр ^{13}C ЯМР δ м.д.: 101.5, 123.8, 128.5 131.0, 136.3, 163.54, 163.66.

2-Амино-4,6-бис(4-хлорфенил)пиримидин (1b). Смесь 0.18 г (0.0018 моль) гидрохлорида гуанидина, 0.2 г (0.005 моль) гидроксида натрия в 10 мл абсолютного этилового спирта нагревают при 60–65°С 30 минут. К раствору добавляют 0.27 г (0.001 моль) 1,3-бис(4-хлорфенил)проп-2-ен-1-она и кипятят на масляной бане 8 часов. 2/3 часть спирта упаривают, на остаток добавляют ледяную воду и суспензию подкисляют 15%-ой соляной кислотой до $\text{pH}=7$. Выпавший осадок фильтруют, обрабатывают холодным этанолом. Выход 0.2 г (67%), т.пл. 175°С. Спектр ^1H ЯМР δ м.д., J (Гц): 6.27 (с, 2H, NH_2); 7.56 (с, 1H, СН-пиримидин); 7.60-8.18 (м, 8H, Ar). Спектр ^{13}C ЯМР δ м.д.: 101.6, 128.0, 128.2, 135.3, 135.9, 163.5, 163.6.

2-Амино-4-(4-хлорфенил)-6-(4-метоксифенил)пиримидин (1c). Смесь 0.18 г (0.0018 моль) гидрохлорида гуанидина, 0.2 г (0.005 моль) гидроксида натрия в 10 мл абсолютного этилового спирта нагревают при 60–65°С 30 минут. К раствору добавляют 0.28 г (0.001 моль) 3-(4-хлорфенил)-1-(4-метоксифенил)проп-2-ен-1-она и кипятят на масляной бане 8 часов. 2/3 часть спирта упаривают на остаток добавляют ледяную воду и суспензию подкисляют 15% соляной кислотой до $\text{pH}=7$. Выпавший осадок фильтруют, обрабатывают холодным этанолом. Выход 0.2 г (71,4%), т.пл. 210 °С. Спектр ^1H ЯМР δ м.д., J (Гц): 3.86 (с, 3H, OCH_3); 6.16 (с, 2H, NH_2); 7.48 (с, 1H, СН-пиримидин); 6.95-

8.17 (m, 8H, 2×C₆H₄). Спектр¹³C ЯМР δ м.д.: 54.7, 100.9, 113.3, 128.0, 128.11, 128.13, 129.5, 135.0, 136.2, 160.9, 163.0, 163.4, 164.4:

N-(4,6-Бис(4-бромфенил)пиримидин-2-ил)ацетамид (2). Смесь 0.4 г (0.001 моль) вещества **1a** и 3 мл ангидрида уксусной кислоты кипятят 2 ч. Горячий раствор фильтруют от мути, после охлаждения фильтрата выпадает осадок продукта. Выход 0.27 г (61%), т.пл. 255°C. Спектр¹H ЯМР δ м.д., J (Гц): 2.42 (с, 3H, CH₃); 7.65-8.24 (м, 8H, Ar); 8.14 (с, 1H, СН-пиримидин); 10.10 (уш.с, 1H, NH). Спектр¹³C ЯМР δ м.д.: 24.8, 106.4, 124.7, 131.2, 135.3, 157.9, 163.9, 168.9.

N-((4,6-Бис(4-бромфенил)пиримидин-2-ил)карбамотиоил)бензамид (3). К раствору NH₄SCN (0.1 г) в 5 мл сухого ацетона добавляют 0.15 г (0.13 мл) бензоил хлорида и кипятят 15 минут, при кипячении добавляют 0.4 г (0.001 моль) вещества **1a**. Продолжают кипятить еще 4 ч. Осадок фильтруют, протирают эфиром. Выход 0.33 г (60%) т.пл. 230°C. Спектр¹H ЯМР δ м.д., J (Гц): 7.41-8.34 (м, 13H, Ar); 8.31 (с, 1H, СН-пиримидин); 11.90 (с, 1H, NH); 13.0 (с, 1H, NH). Спектр¹³C ЯМР δ м.д.: 108.1, 125.1, 127.9, 128.3, 129.2, 131.3, 132.4, 134.9, 157.4, 164.2, 166.7, 170.9, 177.6.

2-Амино-5-бром-4,6-бис(4-бромфенил)пиримидин (4). К суспензии 0.4 г (0.001 моль) вещества **1a** в 5 мл уксусной кислоты, добавляют 0.2 г (0.001 моль) бромсукцинимид и нагревают 2 ч. при 110°C. Кислоту упаривают, остаток промывают холодной водой и разбавленным раствором NH₄OH, остаток фильтруют. Перекристаллизуют из смеси гексан:бензол (1:1). Выход 0.3 г (62.5%) т.разл. 290°C. Спектр¹H ЯМР δ м.д., J (Гц): 7.08 (с, 2H, NH₂); 7.52-7.73 (м, 8H, Ar). Спектр¹³C ЯМР δ м.д.: 102.5, 122.7, 130.8, 130.9, 137.8, 161.7, 165.8.

Закключение

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что метод активации молекул реагирующих веществ под действием микроволнового облучения, соответствующего основным требованиям «Зеленой химии», является эффективным методом синтеза органических соединений. При этом происходит ускорение процесса синтеза, повышение выходов целевых продуктов, а также достигается резкое сокращение энергозатрат в 6–12 раз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mukhtara Sh., Morsya N. M., Hassana A., Hafeza T., Hassaneenb H., Salehb F. A Review of chalcones: synthesis, reactions, and biological importance // Egypt. J. Chem. 2022. V. 65 (8). PP. 379–395. DOI:10.21608/ejchem.2022.112735.5125.
2. Marotta L., Rossi S., Ibba Brogi R. S., Calderone V., Butini S., Campiani G., et al. The green chemistry of chalcones: Valuable sources of privileged core structures for drug discovery // Front. Chem. 2022. 10:988376. doi:10.3389/fchem.2022.988376.
3. Маишковский М.Д. Лекарственные средства, М.: Изд-во «Новая волна». Т. 1 и 2, 2019.

4. Kaur N., Aggarwal A. K., Sharma N., Choudhary B. Synthesis and in-vitro antimicrobial activity of pyrimidine derivatives // *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res. (IJPSDR)*, 2012. V. 4 (3). PP. 199–204.
5. David V. B., Babu V. H., Reddy V. M. Synthesis of novel 4,6-disubstituted- 2-amino pyrimidines as antibacterial agents // *Int. J. Pharm. Chem. Res.*, 2014. V. 3 (1). PP. 2278–2287.
6. Fandakli S., Kahrman N., Yucel T. B., Karaoglu S. A., Yayli N. Biological evaluation and synthesis of new pyrimidine-2(1H)-ol/-thiol derivatives derived from chalcones using the solid phase microwave metho // *Turk. J. Chem.*, 2018. V. 42. PP. 520–535.
7. Ingarsal N., Saravanan G., Amutha P., Nagarajan S. Synthesis, in vitro antibacterial and antifungal evaluations of 2-amino-4-(1-naphthyl)-6-arylpurimidines // *Eur. J. Med. Chem.*, 2007. V. 42 (4). PP. 517–520.
8. Gazivoda T., Kraljevic N., Stepanilic V. Synthesis and in vitro antiproliferative evaluation of novel N-alkylated 6-isobutyl and propyl pyrimidine derivatives // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014. V. 24 (13). PP. 2913–2917.
9. Orlov A. P., Trofimova T.P., Osipova E.Yu., Proshin A.N., Orlova M.A. Zinc containing 2-aminopyrimidine derivatives // *Russian chemical Bulletin*, 2017. V. 66 (10). PP. 1860–1866.
10. Kumaresan S., Chandrasekaran S., Sakhivel K., Guruvayoorappan C., Israel V. Synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of some novel pyrimidin-2-amines on Carrageenan-induced paw edema in back mice // *J. Chem. Pharm. Res.* 2014. V. 6 (10). P. 593.
11. Kumar N., Drabu S., Shalini K. Synthesis and pharmacological screening of 4,6-substituted di-(phenyl)pyrimidin-2-amines // *Arab. J. Chem.* 2011. V. 10. PP. 877–880.
12. Dalkara S., Karakurt A. Recent progress in anticonvulsant drug research: strategies for anticonvulsant drug development and applications of antiepileptic drugs for non-epileptic central nervous system disorders // *Curr. Top. Med. Chem.* 2012. V. 12. PP. 1033–1071.
13. Mohana K., Kumar B.N.P., Mallesha L. Synthesis and biological activity of some pyrimidine derivatives // *Drug Invent. Today*. 2013. V. 5. PP. 216–222.
14. Abu-Hashem A. A., Youssef M. M., Hussein H. A. R. Synthesis, antioxidant, antitumor activities of some new thiazolopyrimidines, pyrrolothiazolopyrimidines and triazolopyrrolothiazolopyrimidines derivative // *J. Chin. Chem. Soc.* 2011. V. 58 (1). PP. 41–48.
15. Holy A., Votruba I., Masojdkova M. 6-[2-(Phosphonomethoxy)alkoxy]pyrimidines with antiviral activity // *J. Med. Chem.* 2002. V. 45 (9). PP. 1918–1929.
16. Sakakibara N., Hamasaki T., Baba M. Synthesis and evaluation of novel 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil analogs as potential anti-HIV-1 agents // *Bioorg. Med. Chem.* 2013. V. 21 (18). PP. 5900–5906.
17. Tang J., Maddali K., Dries C. D. 6-Benzoyl-3-hydroxypyrimidine-2,4-diones as dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. V. 21 (8). PP. 2400–2402.
18. Siddiqui A. B., Trivedi A. R., Kataria V. B., Shah V. H. 4,5-Dihydro-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine containing phenothiazines as antitubercular agents // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014. V. 15 (24). PP. 1493–1495.
19. Maurya Sh., Khan Sh., Bahuguna A., Kumar D., Rawat D. Synthesis, antimalarial activity, heme binding and docking studies of N-substituted 4-aminoquinoline-pyrimidine molecular hybrids // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. V. 129. PP. 175–185.
20. Rana K., Kaur B., Kumar B. Synthesis and antihypertensive activity of some dihydropyrimidines // *Ind. J. Chem. B.* 2004. V. 43 (7). PP. 1553–1557.

21. Hui Zhi, Can Zhang, Zhixin Cheng, Zhe Jin, Erfang Huang, Shuo Li, Huangquan Lin, David Chicheong Wan, Chun Hu. 6-Acetyl-5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives as the novel acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and biological activity // *Med. Chem.* 2013. V. 9 (5). PP. 703–709.
22. Доступно на сайте: http://www.alanwood.net/pesticides/class_pesticides.html
23. Yengoyan A., Hambardzumyan E., Vorskanyan A., Shahbazyan L. Synthesis of 4,6-dimethylpyrimidine 2-thiosubstituted derivatives and their preliminary biological evaluation // *Lett. Org. Chem.* 2021. V. 18 (4). PP. 311–317.
24. Pivazyan V. A., Ghazaryan E. A., Shainova R. S., Yengoyan A. P. Synthesis of novel derivative on the basis of 4-hydrazinyl-6-methyl-2-(alkylthio)pyrimidines and their preliminary biological evaluation // *Am. Chem. Sci. J.* 2016. V. 16 (3). PP.1–10.
25. Pivazyan V., Ghazaryan E., Shainova R., Yengoyan A. Synthesis of novel 2-((6-methyl-2-(methylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)acetohydrazide derivatives and their growth stimulant properties // *J. Chem. Biol. Phys. Sci., Chem.Sci.* 2016. V. 6 (3). PP. 1025–1033.
26. Pathak V., Sareen V., Joshi K. C. Fluorinated 1, 3-diketones as reaction intermediates for synthesis of biologically active heterocycles // *J. Fluorine Chem.* 1985. V. 29 (1-2). P. 202.
27. Mamaev V., Vais A. Pyrimidines: XLVII. New method for the synthesis of 2-aminopyrimidines // *J. Heterocycl. Chem.* 1975. V. 11. PP. 1322–1326.
28. Varga L. Nagy, T., Kövesdi, I., Benet-Buchholz, J., Dormán, G., Üрге, L., & Darvas, F. Solution-phase parallel synthesis of 4, 6-diaryl-pyrimidine-2-ylamines and 2-amino-5, 5-disubstituted-3, 5-dihydro-imidazol-4-ones via a rearrangement // *Tetrahedron.* 2003. V. 59 (5). PP. 655–662.
29. Wendelin W., Kerbl H. Synthesis of arylsubstituted 2-pyrimidinamines, dihydro-2-pyrimidinamines and pyrimido [1, 2-a] pyrimidines by reaction of guanidine with chalcones (heterocyclic compounds, 77. commun.) Über Heterocyclen, 77. Mitteilung // *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly.* 1984. V. 115. PP. 309–325.
30. Simon D., Lafont O., Farnoux, C., Miocque M. Obtention d'hétérocycles par action de binucléophiles diazotés sur des chalcones: Influence du substituant en position 2 // *J. Heterocycl. Chem.* 1985. V. 22 (6). PP. 1551–1557.
31. Olugbade T., Usifoh, C., Oluwadiya J., & Reisch J. The reaction of amines with isoflavones. 2. Formation of phenolic sulphonamidopyrimidines // *J. Heterocycl. Chem.* 1990. V. 27 (6). PP. 1727–1728.

**GREEN SYNTHESIS OF PYRIMIDINE DERIVATIVES BASED
ON CHALCONES AND PRELIMINARY EVALUATION OF
THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES**

Y. Gharibyan

*Russian-Armenian (Slavonic) University
Institute of Biomedicine and Pharmacy (IBP)*

ABSTRACT

The synthesis of pyrimidine derivatives was carried out both by traditional methods and under the action of microwave irradiation, corresponding to the main requirements of “Green Chemistry”. It was shown that with microwave activation of reagent molecules, the yield of final products increases, and the reaction time and energy consumption are sharply reduced. In this case, a total saving of energy costs of 6-12 times is achieved.

Keywords: chalcones, cyclization, pyrimidines, plant growth stimulants.

DOI 10.24412/1829-0450-fm-2024-2-47-61
УДК 616.894-053.8

Поступила: 18.11.2024г.
Сдана на рецензию: 18.11.2024г.
Подписана к печати: 06.12.2024г.

БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА: НЕЙРОПАТОЛОГИИ, СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, СТРАТЕГИИ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ

Е.Р. Амбарцумян¹, А.А. Манукян¹, С.Г. Тирацумян²

*Российско-Армянский(Славянский) университет
Институт Биомедицины и Фармации (ИБФ)*

¹Кафедра Медицинской биохимии и биотехнологии

*²Кафедра Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии
yelena.hambarcutyuan@rau.am, anait_manukyuan_97@mail.ru*

susanna.tiratsuyan@rau.am

*ORCID:[0000-0002-7272-3932], [0009-0006-1204-1899],
[0009-0001-1093-5526]*

АННОТАЦИЯ

Болезнь Альцгеймера – необратимое хроническое прогрессирующее нейроде-генеративное заболевание мозга, которое медленно разрушает навыки памяти и мышления. Заболевание занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Болезнь Альцгеймера характеризуется накоплением бляшек бета-амилоида, нейрофибриллярных клубков гиперфосфорилированного белка Тау, связанного с микро-трубочками в нейронах головного мозга, вызывающих дезинтеграцию, синаптическую дисфункцию и гибель нейронов и приводящую к деменции [1]. Генетические, возрастные и экологические факторы способствуют метаболическому сдвигу, благоприятствующему амилоидогенному процессингу APP вместо физиологического.

Астроциты играют ключевую роль в «трипартитном» синапсе, где перисинаптические астроцитарные отростки охватывают пре- и постсинаптические элементы нейронов, и поддерживают нейрональный гомеостаз за счет поглощения избытка нейротрансмиттеров или высвобождения глиотрансмиттеров. Известно, что гиппокамп особенно уязвим к дегенеративным изменениям [2]. Усиление выработки цитокинов-интерлейкинов и фактора некроза опухоли-альфа приводит к нейровоспалению, чрезмерной продукции оксида азота и запуску апоптоза нейронов. К тому же, цитокины активируют фагоцитоз амилоидного пептида [3]. Наблюдается увеличение концентрации глутамата, что провоцирует развитие возбуждающей токсичности и гибели нейронов [4], компенсацию дефицита холинергической иннервации за счет глутаматергической, приостанавливает дальнейшее снижение когнитивных или познавательных функций [5]. Самая большая проблема, связанная с БА, состоит в том, что нет

эффективных методов снижения вероятности развития и оптимального лечения. Именно поэтому исследования точных механизмов развития и причин БА продолжают быть одними из самых актуальных в биомедицине.

Ключевые слова: Болезнь Альцгеймера, APP, A β -пептиды, белок тау, астроциты.

Основные причины и общая характеристика болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – самое распространенное на сегодняшний день нейродегенеративное заболевание с четко определенными патофизиологическими механизмами, в основном поражающее медиальную височную долю и ассоциативные неокортикальные структуры. БА – необратимое прогрессирующее заболевание мозга пожилых людей, по праву занимающее одно из первых мест после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [6–8]. В основном эта болезнь сопровождается деменцией. При БА происходит накопление амилоидных бляшек (нерастворимые отложения бета-амилоида) [9] и нейрофибриллярных клубков-агрегатов гиперфосфорилированного белка Тау, потеря нейронов и синапсов в коре головного мозга и подкорковом сером веществе в наиболее пораженной области мозга [10–14].

Различают генетические и спорадические факторы риска БА.

Генетические факторы. Развитие нейродегенерации в ряде случаев связано с генетическими мутациями ДНК. Образование таких мутаций могут контролировать эпигенетические факторы и наследственные изменения. Ряд генов повышают риск развития деменции (APOE-4), другие непосредственно могут привести к развитию деменции (пресенилин-1 (70%) и -2 (20%), предшественник β -амилоида (3%), Гентингин-ген) [15].

Негенетические факторы. Одним из важнейших факторов считается **возраст**. БА считается старческой болезнью, которая, в основном, развивается после 65 лет (90%), в то же время у 10% больных встречаются формы с ранним началом заболевания (до 65 лет). Распространенность БА по разным данным составляет от 200 до 1600 человек на 100 тыс. населения и напрямую зависит от средней продолжительности жизни людей в данном регионе. **Образ жизни.** Риск развития деменции повышается при сниженной умственной, физической и социальной активности, чрезмерном употреблении алкоголя, наркотических препаратов, при воздействии токсинов на организм человека, тяжелых металлов (алюминий, железо), выхлопных газов автомобилей. Рисковыми являются воздействие вирусов, прионов и травмы головы. Обсуждается связь между инфекциями и БА. Неадекватные воспалительные реакции могут привести к повреждению окружающих нормальных клеток [16–18]. Есть взаимосвязь между БА и сосудистыми причинами деменции, предлагаются будущие направления исследований и профилактики [19–22].

Нейропатология БА

При БА на клеточном уровне наблюдается потеря кортикальных нейронов, в особенности пирамидальных клеток, нормальная работа которых связана с осуществлением когнитивных функций. Патогенез БА связан с повреждением гиппокампа и других областей головного мозга, ответственных за формирование памяти. Важнейшим гистологическим признаком БА является внутриклеточное накопление нейрофибриллярных клубков, связанное с осаждением гиперфосфорилированного белка Тау, и образованием сенильных бляшек из-за внеклеточного отложения агрегатов различных бета-амилоидных пептидов (А β) (Рис.1). БА приводит к синаптической дисфункции в ранней стадии болезни, нарушая связь между нейронами, ответственных за выполнение когнитивных функций [23]. Дегенерация нейронов начинается в гиппокампе и энторинальной коре, и, в первую очередь, поражается медиальная височная доля. Далее дегенерирует область ассоциативной коры и тимуса. По мере развития болезни дегенерация начинает наблюдаться и в лобной доле, доходя до новой коры. Повреждаются также многие структуры лимбической системы, включая гиппокамп и нейронные пути. Нарушаются когнитивные функции (память, речь, зрительно-пространственное восприятие), возникают эмоциональные и психиатрические проблемы. Такие когнитивные нарушения, очевидно, находятся вне рамок возрастной нормы. При деменции возникают психические расстройства (снижение памяти, интеллекта, нарушение профессиональной деятельности, социальной адаптации пациента, повседневной жизненной активности, самообслуживания). На поздних стадиях возможно развитие галлюцинаций, «безучастности» [24]. Кроме типичного встречается и атипичное течение БА [25].

Молекулярные механизмы при БА

Гипотеза митохондриального каскада. Наличие А β в митохондриях приводит к дисфункции митохондрий и нейрональному апоптозу. А β изменяет ферментативную активность I, II и IV комплексов дыхательной цепи; влияет на динамику и биогенез новых митохондрий за счет нарушения баланса деления и слияния; вызывает образование мегапоров посредством взаимодействия с CypD; А β вызывает снижение митохондриального дыхания; А β способствуют уменьшению синтеза АТФ, оксидативному стрессу, дисбалансу электролита. Из-за этого нарушения высвобождается кальций, аномальное количество которого может привести к нейрональному стрессу. Эти процессы способствуют высвобождению цитохрома С, активирующего каспазный путь, и инициирует апоптоз [26]. Митохондриальный оксидативный стресс приводит к гиперфосфорилированию белков Тау из-за активации гликогенсинтазы киназы 3 β и ингибирования активности супероксиддисмутазы [27].

Метаболическая гипотеза. Согласно метаболической гипотезе, причиной болезни является ожирение, диабет второго типа, гиперхолестеринемия и т.д. Больные диабетом второго типа подвержены большому риску осложнений мозга (инсульт, когнитивные нарушения, деменция). Есть несколько процессов, предположительно связывающих диабет и деменцию; васкулярные поражения, воспаление, оксидативный стресс, усиленный гликолиз, устойчивость к инсулину, аномальный сигналинг рецептора инсулина, деградация инсулина, и связь последнего с накоплением А β . Метаболические нарушения связаны с инсулиноподобным фактором роста в мозгу, который регулирует устойчивость к инсулину [28]. Это приводит к снижению активности mTOR; ошибкам аутофагии, вызывающей накопление А β , стимуляцию аномальных путей роста, потере контроля трансляции и замедленный нейрогенез [29, 30]. Киназа S6 активируется mTOR для дальнейшего фосфорилирования и деградации субстрата инсулинового рецептора 1, что ведет к десенситизации инсулина. Сигналинг mTOR взаимодействует с А β -пептидами и Тау белками в агрегированных формах. У больных БА наблюдается повышенное количество провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6 and IL-1 β), что приводило к активации некоторых стресс-киназ, которые фосфорилируют субстрат инсулинового рецептора-1 и становятся помехой для сигналинга инсулина [31].

Васкулярная гипотеза основана на уменьшении потока крови в мозгу. Согласно этой гипотезе, процесс нейродегенерации инициируется хронической мозговой гипоперфузией, связанной со старением, оксидативным стрессом, атеросклерозом, гиперхолестеролиемией. Важной проблемой является нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), что приводит к накоплению нейротоксических сывороточных белков в мозгу, воспаления, синаптической и васкулярной дисфункции. Это становится причиной дефектов метаболизма А β и Тау, что, в свою очередь, вызывает васкулярные проблемы и нарушение транспорта глюкозы через ГЭБ и на его проницаемость [32]. При БА потеря нейронов сопровождается утолщением стенок мозговых сосудов, вовлечением макрофагов, и образованием накоплений А β вблизи мозговой сосудистой сети. Макрофаги начинают скапливаться между амилоидами и стенками сосудов. Все это может привести к деградации нейронов [33].

Амилоидная гипотеза. Центральную роль в БА играет белок-предшественник амилоида (APP), в частности, один из его основных протеолитических фрагментов, амилоид- β (А β): накопление А β и последующее образование олигомеров функционально нарушает синапсы. APP выполняет важные физиологические функции в развитии мозга и пластичности нейронов в процессе памяти [1]. APP подвергается сложному процессингу под воздействием канонических (α)-затем γ -секретаз (процесс, который не приводит к накоплению А β). Расщепление APP α -секретазой (+17) происходит, в большой сте-

пени, на поверхности клетки под воздействием ADAM (дезинтегрин и металлопротеиназа). Амилоидогенный путь осуществляется под воздействием и неканонических β - и потом γ -секретаз [1] (Рис. 1). Последнее приводит к продукции $A\beta$, который после рециркуляции пузырьков или деградациии в лизосомах выбрасывается во внеклеточное пространство.

Гипотеза Тау. Нейрофибрилярные клубки состоят из белка Тау, ассоциированного с микротрубочками, который функционирует как каркасный белок, обогащенный аксонами. При патологии агрегация Тау повреждает аксоны нейронов и дает начало нейродегенерации.

Холинергическая гипотеза. В течение многих лет холинергическая гипотеза была центральной в области изучения деменций и нейродегенеративных болезней. Ацетил-холин – нейротрансмиттер, который отвечает за проводимость электрических импульсов от одной нервной клетки к другой. При нейродегенеративных болезнях количество ацетилхолина уменьшается из-за быстрого гидролиза с участием ацетилхолинэстеразы, которая у больных БА способствует накоплению $A\beta$ и образованию NFTs в мозгу.

Инфламаторная гипотеза. Реактивный глиоз и нейровоспаление являются отличительными признаками БА. Пути, которые связаны с микроглией, считались доминантными для риска развития БА и патогенеза и подтверждаются новыми генетическими и транскриптомными исследованиями [34, 35].

Одним из ключевых типов клеток, которые модулируют нейровоспалительный ответ при БА, являются астроциты, наиболее распространенные глиальные клетки в головном мозге, поддерживаемые глиальным фибриллярным кислым белком (GFAP).

Астроциты играют ключевую роль в «трипартитном» синапсе, где перисинаптические астроцитарные отростки охватывают пре- и постсинаптические элементы нейронов, т.е. поддержание нейронального гомеостаза за счет поглощения избытка нейро-трансммиттеров или высвобождения глиотрансммиттеров – таких, как β -аминомасляная кислота (ГАМК), модулируя таким образом синаптическую передачу сигналов (36). Так, в «нормальных» физиологических условиях астроциты поглощают избыток глутамата, высвобождаемого нейронами из синапса через Na^+ -транспортеры возбуждающих аминокислот (EAAT1/EAAT2), а ингибирующие медиаторы ГАМК через специфичные транспортеры GAT3/4, в большом количестве обнаруженные в астроцитарных отростках, которые, как полагают, имеют решающее значение для установления уровня фонового тонического торможения [49]. При патологических состояниях механизмы, по-видимому, изменяются, что может привести к вытеснению ГАМК в синаптическое пространство, что, в конечном итоге, влияет на тонкую настройку тормозных синапсов (Рис. 2).

Показано, что бляшки А β локализуются и запускают активацию астроцитов, а длительное нейровоспаление, поддерживаемое ими, может иметь катастрофические последствия для нейрональной среды и потенцировать нейродегенерацию при БА. А β -индуцированная дисфункция сетей астроцитов может привести к нарушению регуляции нейрональных сетей и петле положительной обратной связи с образованием и отложением А β , что не наблюдается в здоровом стареющем мозге [36]. Считается, что гипертоническая возбудимость, связанная с БА, приводит к распространению патологии заболевания между субрегионами мозга из-за избирательного абберантного поведения интернейронов, содержащих ГАМК [37], и изменения роли астроцитов в их гомеостазе. Другие «вспомогательные» функции астроцитов включают их участие в развитии нервной системы, буферизацию внеклеточного калия и регуляцию кровотока.

Во время синаптической активности высвобождение нейромедиаторов приводит к изменению внутриклеточной активности кальция в астроцитах. Это происходит потому, что астроциты экспрессируют множество рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), которые реагируют на нейротрансмиттеры посредством активации рецепторов, опосредующих высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума. Результатом внутриклеточных изменений кальция в астроцитах является высвобождение «глиотрансмиттеров» – таких, как АТФ, глутамат, D-серин и ГАМК [36].

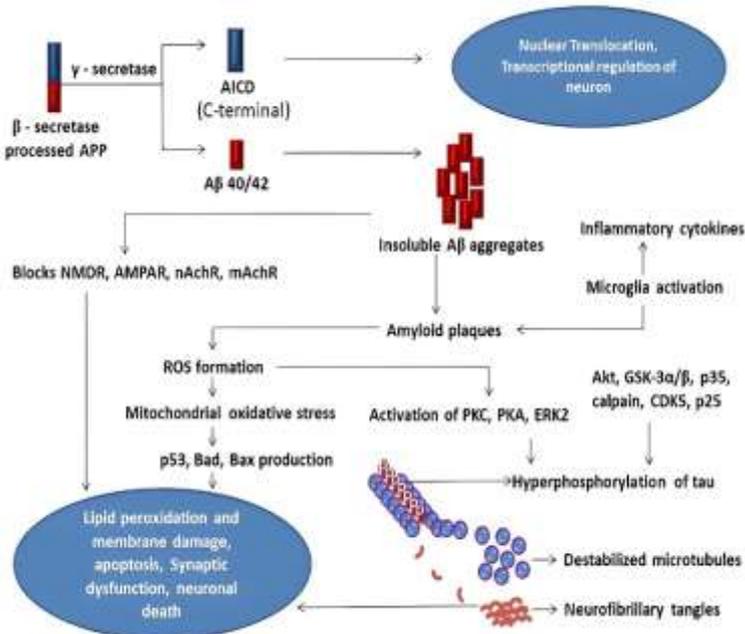


Рис. 1. Множественные молекулярные факторы, участвующие в гибели нейронов. После обработки β -секретазой оставшийся С-концевой трансмембранный белок APP распознается и расщепляется γ -секретазой [1].

Благодаря этому астроциты модулируют активность нейронов и синаптическую передачу в нескольких областях мозга, влияют на поведение животных. Этот двунаправленный обмен информацией между астроцитами и нейронами воплощен в концепции трехстороннего синапса, который включает астроциты как неотъемлемые элементы синаптической функции наряду с пре- и постсинаптическими процессами (Рис. 1).

Отличительным признаком нейродегенеративного заболевания является реактивный глиоз с астроцитарными морфологическими и функциональными изменениями. Наблюдается повышенная экспрессия белков промежуточных филаментов – таких, как глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) или виментин [1]. Важным следствием реактивности астроцитов при БА является аномальное высвобождение глиотрансмиттера. Усилению высвобождения глиотрансмиттеров (глутамата, АТФ, ГАМК) способствует повышение концентрации внутриклеточного кальция в астроцитах, что, в конечном итоге, вызывает нейротоксичность. Появление кальциевой гиперактивности в астроцитах может быть также связано с усилением экспрессии метаботропного глутаматного рецептора mGluR5 и повышением возбудимости нейронов и эксайтотоксичности.

Концентрация глутамата во внеклеточном пространстве поддерживается на низком уровне и строго контролируется несколькими механизмами в синапсе. Нарушения в этой регуляторной системе могут привести к избытку внеклеточного глутамата, который может вызвать гипервозбудимость постсинаптических нейронов до эксайтотоксичности и цитотоксичности. Считается, что перенос глутамата астроцитами является основным механизмом, ответственным за выведение внеклеточного глутамата из синапсов и осуществляется с помощью натрий-зависимого симпортера GLT-1, который отвечает за 90% поглощения астроцитами глутамата в мозге. Нарушение регуляции GLT-1 связано с гибелью нейронов и неврологическими расстройствами.

Астроциты участвуют как в поглощении, так и выделении глутамата как глиотрансмиттера. Последний связывается либо с пресинаптическими метаботропными глутаматными рецепторами, либо с внесинаптически расположенными постсинаптическими NMDA-рецепторами. Отдельные астроциты находятся вблизи большого количества (≈ 100) нейронов, способствуя синхронности нейронного действия. Повышенное высвобождение глутамата из астроцитов может лежать в основе изменений синаптической функции и пластичности, наблюдаемых в животных моделях БА. и способствовать когнитивным нарушениям, наблюдаемым в поведенческих тестах.

Важным нейротрансмиттером в центральной и периферической нервной системе является АТФ. АТФ высвобождается также из астроцитов как глиотрансмиттер. Есть много доказательств, указывающих на множественные механизмы

высвобождения АТФ из астроцитов, зависимым от кальция образом посредством экзоцитоза из синаптических везикул. Усиление высвобождения АТФ в срезах гиппокампа или культурах астроцитов наблюдается при наличии пептидов Аβ [36] как при БА (Рис. 2).

Недавно обнаружено, что при БА, помимо возбуждающих синапсов, тормозная ГАМКергическая система также претерпевает значительную перестройку и нарушает регуляцию нейронных путей, участвующих в процессах памяти и обучения. При БА показан астроцитарный выброс ГАМК как глиотрансммиттера [38]. В нормальных условиях астроциты гиппокампа содержат очень мало ГАМК. ГАМК, высвобождаемая из астроцитов, оказывает тоническое тормозящее влияние на мозжечковые гранулярные нейроны и стриарные средние шипиковые нейроны посредством активации рецепторов ГАМКа. В префронтальной коре, с другой стороны, астроцитарная ГАМК взаимодействует с ГАМКергическими интернейронами через свои рецепторы. Но у пациентов и мышинных моделей БА цитозольные уровни ГАМК в астроцитах необычно высоки [36]. Атипично, что астроциты, по-видимому, синтезируют ГАМК из путресцина в качестве субстрата посредством окисления моноаминов вместо использования [34]. Больные астроциты вокруг амилоидных бляшек становятся реактивными и аберрантно и обильно производят и высвобождают ГАМК через анионный канал бестрофина 1 (BEST1) [36, 39].

Профилактика и терапия БА

Здоровый образ жизни, физическая активность является одним из важнейших аспектов в профилактике БА [1]. **Питание.** Для профилактики назначается средиземноморская диета, так как в ее составе есть большое количество антиоксидантов (свежих фруктов и овощей), полиненасыщенных жирных кислот (рыба и другие морепродукты), а они, в свою очередь, связаны со снижением риска развития БА, и деменции [40], снижением уровня биологических маркеров воспаления [41].

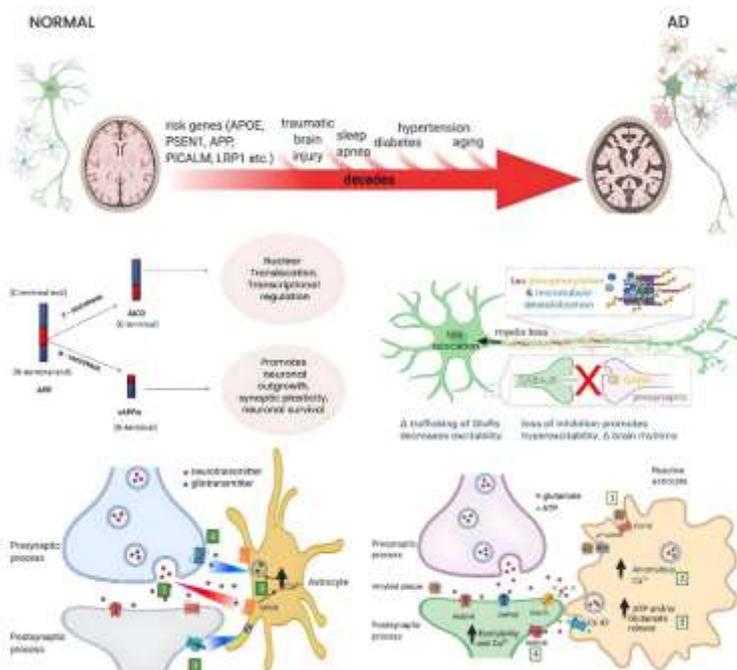


Рис.2. Схематическое изображение астроцитарной и нейронной сети в норме (слева) и во время патогенеза БА (справа). После обработки альфа-секретазой оставшийся С-концевой трансмембранный белок APP распознается и расщепляется γ -секретазой – неамилоидогенным способом; гиперфосфорилированный Тау распадается, приводя к диссоциации микротрубочек, образуя скопления NFT. Трехкомпонентный синапс в нормальном состоянии (слева) и при БА (справа). Образованные амилоидные бляшки блокируют NMDAR, AMPAR, nAChR, mAChR на нейрональной мембране и нарушают синаптическую передачу, высвобождение АТФ и глутамата из астроцитов при патологии БА. АТФ и глутамат действуют на P2X7R или NMDAR, повышая возбудимость и концентрацию кальция в нейронах.

Образование, умственная деятельность.

При постоянной умственной работе, высоком уровне образования замедляются симптоматические проявления поражения головного мозга, которые вызваны БА [42], снижается риск возникновения деменции.

Первоначальная гипотеза амилоидного каскада состояла в том, что «А β является возбудителем патологии БА, но все больше доказательств того, что А β является триггером в раннем процессе заболевания и, по-видимому, необходим, но недостаточен на поздней стадии. Пептиды А β за длительный период времени исследовались как потенциальные мишени для БА и доминировали в новых разработках лекарств в течение последних лет» [43]. Распространенным методом анти-А β -терапии является снижение продукции А β нацеливанием на β - и γ -секретазу. При нацеливании на γ -секретазу, из-за ее физиологических субстратов, например, сигнального белка Notch, который

необходим для нормального биологического процесса, бывают нежелательные побочные эффекты. Поэтому вопросы безопасности являются важнейшими. Точно так же нацеливание на β -секретазу имеет свои побочные эффекты – такие, как например, слепота [44]. Важно, что в спорадических случаях БА, не всегда имеется перепроизводимый белок-предшественник амилоида, а изоформы $A\beta$ могут также служить позитивными регуляторами высвобождения нейротрансмиттеров в синапсах гиппокампа. То есть при ингибировании продукции $A\beta$ возникают многие проблемы.

Альтернативным вариантом стал метод иммунотерапии. Но в этом случае также эксперименты приостановили из-за нежелательных побочных эффектов. Пассивная иммунотерапия ненамного лучше, чем активная, но есть неизбежные побочные эффекты. Несмотря на все проблемы и побочные эффекты, ученые все еще пытаются применить иммунотерапию для изменения степени нейродегенерации при БА [45].

Исследования агрегации амилоидных пептидов способствовали появлению многих подходов для ее ингибирования. Один из подходов основан на ингибировании агрегации с помощью молекул/лигандов, которые связываются, а далее – модифицируют или ингибируют агрегацию амилоида (покрытые полиэтилен-гликолем наночастицы, липидные наночастицы, содержащие фосфатидиновую кислоту и кардиолипин, молекулы малых размеров (куркумин, мелатонин), моноклональные антитела, направленные на $A\beta$ и другие ингибиторы агрегации пептидов, иммунотерапия или использование $A\beta$ вакцин). В связи с недостаточной безопасностью применения активных амилоидных вакцин их использование ограничено. Антитела против амилоидов (синтетические или нативные) приводят к усилению захвата и аутофагии амилоида, очищая от него мозг. Также возможно использовать другие механизмы, которые регулируют перенос амилоида из мозга. Тем не менее, не существует эффективной терапии АД, что делает разработку новых ингибиторов, основанной на гипотезе амилоидного каскада, весьма актуальной. Одним из современных подходов поиска возможных лекарственных препаратов является исследование взаимодействия вышеупомянутых метаболитов с β -амилоидом методами молекулярного моделирования [14].

Ряд работ свидетельствуют о некоторых химических модификациях известных молекул – таких, как куркумин и его производные (циклокуркумин, диметильный эфир куркумина и др.). Несмотря на существование известных молекул, которые связываются с $A\beta_{42}$ с высокой аффинностью (Congo-red, тиофлавин S и AZD2184 большая их часть не применяется для лечения БА, т.к. они не могут пересекать ГЭБ. Несколько работ показало важное значение производных пиперидина, деферипрона, третичных аминов в ингибировании агрегации $A\beta_{42}$.

После многочисленных неудач в разработке лекарств, нацеленных на Аβ, все больший интерес приобретает изучение терапевтического потенциала нацеливания на Тау, т.к. исследования биомаркеров показывают, что патология Тау более тесно связана с прогрессированием БА [12]. Нацеленная на Тау терапия остается сложной из-за неполного понимания БА, отсутствия эффективных и чувствительных биомаркеров для диагностики и мониторинга ответа, а также обструкции ГЭБ, Тау-терапия все еще остается не полностью разработанной [46]. В случае вакцинации, активные Тау-вакцины (АС135 и АADvac-1) и пассивные вакцины в настоящее время находятся в фазе I и II клинических испытаний [47]. Инфламаторный процесс играет важную роль в ранних стадиях нейродегенеративных болезней. Нестероидные противовоспалительные препараты не показали достаточных преимуществ в клинике [14]. Недавние успехи в понимании механизма, лежащего в основе дисфункции микроглии, регуляции пластичности и нейрогенеза, открывают новые возможности для терапевтических вмешательств и диагностики БА [47]. Ориентация на aberrantные функции микроглии и восстановление гомеостаза может привести к новым парадигмам в терапии БА. Но учитывая сложность и разнообразные функции микроглии у здоровых и больных, есть острая необходимость в новых биомаркерах [48].

ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar K. and Gopal S. (2021). Molecular mechanisms in Alzheimer's disease and the impact of physical exercise with advancements in therapeutic approaches AIMS Neuroscience, 8(3): 357–389. DOI: 10.3934/Neuroscience.
2. Halaby I. et al. (2004). Depolarization thresholds for hippocampal damage, ischemic preconditioning, and changes in gene expression after global ischemia in the rat // Neuroscience letters. Т. 372. № 1–2. СС. 12–16.
3. Kakimura J., Kitamura Y., Takata K. et al., Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. FASEB J. 2002 Apr; 16 (6): 601–3. DOI: 10.1096/fj.01-0530fje. PMID: 11919167].
4. Dong X., Wang Y., Qin Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacol Sin. 2009 (4): 379–87. DOI: 10.1038/aps.2009.24. PMID: 19343058; PMCID: PMC4002277.
5. Ferreira-Vieira T., Guimaraes I., Silva F., Ribeiro F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. Curr Neuropharmacol. 2016; 14 (1): 101–15. DOI: 10.2174/1570159x13666150716165726. PMID: 26813123; PMCID: PMC4787279.
6. Armstrong R. Risk factors for Alzheimer's disease. Folia Neuropathol. 2019, 57, 87–105.
7. Azam S., Haque M., Balakrishnan R. et al The Ageing Brain: Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration // Front. Cell Dev. Biol., 2021, 9: 683459.
8. Kumar A., Sidhu J., Goyal A. Disease A. In StatPearls; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.
9. Paroni G., Bisceglia P. & Seripa D. Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease // Journal of Alzheimer's disease: JAD, 2019, 68 (2), 493–510. <https://doi.org/10.3233/JAD-180802>].

10. Ricciarelli R., Fedele, E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: It's time to change our mind. *Curr. Neuropharmacol*, 2017, 15, 926–935.
11. Амбарцумян Е., Манукян А., Тирацумян С. Аттенуация гиперфосфорилирования белка Тау соединениями растительного происхождения // Пятнадцатая Годичная научная конференция: сборник статей, Ер.: Изд-во РАУ, 2021, 107–113.
12. Busche M., Hyman B. Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 2020, 23(10), 1183–1193. DOI: 10.1038/s41593-020-0687-6.
13. Bellenguez C., Küçükali F., Jansen I. et al. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat Genet* 54, 412–436 (2022): <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>.
14. Tiratsuyan S., Hambarzumyan Y., Poghosyan M, Danielyan M. and Hovhannisyan A. 2024, Neuroprotective Effect of Artemisinin in an Animal Model of Alzheimer's Disease In Press. Available online 18 October, 2024, DOI: 10.2174/0109298673312842241003111836.
15. Ganz T., Fainstein N. & Ben-Hur T. (2022). When the infectious environment meets the AD brain. *Mol Neurodegeneration* 17, 53: <https://DOI.org/10.1186/s13024-022-00559-3>.
16. Seaks C., Wilcock D. Infectious hypothesis of Alzheimer disease. *PLoS Pathogens*. 2020, 16 (11), e1008596.
17. Park A., Omura S., Fujita M. Helicobacter pylori and gut microbiota in multiple sclerosis versus Alzheimer's disease: 10 pitfalls of microbiome studies. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2017 Aug; 8 (3): 215–232. DOI: 10.1111/cen3.12401. Epub 2017, Jul 23. PMID: 29158778; PMCID.
18. Santos C., Snyder P., Wu W. et al. Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2017 Feb 9;7: 69–87. DOI: 10.1016/j.dadm.2017.01.005. PMID: 28275702; PMCID: PMC5328683.
19. Ding J., Davis-Plourde K., Sedaghat S. et al. Antihypertensive medications and risk for incident dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis of individual participant data from prospective cohort studies. *The Lancet. Neurology*. 2020,19 (1): 61–70.
20. Yiannopoulou K., Papageorgiou S. Current and future treatments in Alzheimer disease: An update. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis*. 2020.
21. Sachs B., Rapp S., Jung Y. et al. Associations among vascular risk factors, neuroimaging biomarkers, and cognition: Preliminary analyses from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Alzheimers Dement*, 2022, 18 (4), 551–560.
22. Емелин А.Ю., Лобзин В.Ю., Воробьев С.В. Когнитивные нарушения: руководство для врачей. М., 2019. Т. 416.
23. Picone P., Nuzzo D., Caruana L., Scafidi V., Di Carlo M. Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. *Oxid Med Cell Longev*.2014:780179. DOI: 10.1155/2014/780179. Epub 2014 PMID: 25221640; PMCID: PMC4158152.
24. Walls K., Coskun P., Gallegos-Perez J. et al. Swedish Alzheimer mutation induces mitochondrial dysfunction mediated by HSP60 mislocalization of amyloid precursor protein (APP) and β -amyloid // *The Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287 (36): 30317–30327. DOI: 10.1074/jbc.M112.365890 [DOI]:[PMC free article][PubMed][Google Scholar][Ref list].

25. Sandhir R., Gupta S. Molecular and biochemical trajectories from diabetes to Alzheimer's disease: A critical appraisal. *World J Diabetes* 2015; 6 (12): 1223–1242[PMID: 26464760 DOI: 10.4239/wjd.v6.i12.1223] 2015.
26. Litwiniuk A., Juszczyk G., Stankiewicz A. et al. The role of glial autophagy in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 28, 4528–4539 (2023).
27. Zhang Z., Yang X., YSong.-Q., Tu J. Autophagy in Alzheimer's disease pathogenesis: Therapeutic potential and future perspectives 2021: <https://www.sciencedirect.com/journal/aging-research-reviews/vol/72/suppl>.
28. Milstein J., Ferris H. The brain as an insulin-sensitive metabolic organ. *Mol Metab*. 2021;52:101234. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101234. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33845179; PMCID: PMC851314.
29. Davoody S., Asgari Taei A., Khodabakhsh P., Dargahi L. mTOR signaling and Alzheimer's disease: What we know and where we are? *CNS Neurosci Ther*. 2024 Apr; 30 (4): e14463. doi: 10.1111/cns.14463. Epub 2023 Sep 18. PMID: 37721413; PMCID: PMC11017461.
30. Li Y., Qin, Z. & Sheng R. The Multiple Roles of Autophagy in Neural Function and Diseases. *Neurosci. Bull.* 40, 363–382 (2024): <https://doi.org/10.1007/s12264-023-01120-y>.
31. Bolós M., Llorens-Martín M., Perea J. et al., Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Mol Ishibashi, M., Egawa, K., and Neurodegener*. 2017 Aug 15; 12(1):59. DOI: 10.1186/s13024-017-0200-1. PMID: 28810892; PMCID: PMC5558740 [Hong S. et al., 2016].
32. Che J., Sun Y., Deng Y. et al. (2024). Blood-brain barrier disruption: a culprit of cognitive decline? *Fluids Barriers CNS* 21,63: <https://doi.org/10.1186/s12987-024-00563-3>.
33. Fukuda A. (2019). Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (12), 2964. doi:10.3390/ijms20122964.
34. Nanclares C., Baraibar, A., Araque A. Kofuji P. Dysregulation of Astrocyte-Neuronal Communication in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7887. <https://doi.org/10.3390/ijms22157887>.
35. Gómez-Gonzalo M., Martín-Fernande M., Martínez-Murillo R. et al. (2017). Neuron-astrocyte Signaling Is Preserved in the Aging Brain. *Glia* 65, 569–580. DOI:10.1002/glia.23112.
36. Ishibashi M., Egawa K. and Fukuda A. (2019). Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (12), 2964. doi:10.3390/ijms20122964.
37. Jo S., Yarishkin O., Hwang Y., Chun Y., Park M., Woo D. et al. (2014). GABA from Reactive Astrocytes impairs Memory in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Nat. Med.* 20, 886–896. DOI:10.1038/nm.3639.
38. Lines J., Baraibar A., Fang, C. et al. (2022). Astrocyte-neuronal Network Interplay Is Disrupted in Alzheimer's Disease Mice. *Glia* 70 (2), 368–378. DOI:10.1002/glia.24112).
39. Perea G., Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 2007; 317:1083–1086. DOI: 10.1126/science.1144640.[DOI][PubMed].
40. Scarmeas N., Luchsinger J., Schupf N. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA*. 2009 Aug 12;302(6): 627–37. DOI: 10.1001/jama.2009.1144. PMID: 19671904; PMCID: PMC2765045.
41. Gu Y., Nieves J., Stern Y., Luchsinger J., Scarmeas N. Food combination and Alzheimer disease risk: a protective diet. *Arch Neurol*. 2010 Jun; 67 (6): 699–706. DOI: 10.1001/archneurol.2010.84. Epub 2010 Apr 12. PMID: 20385883; PMCID: PMC3029147.

42. Яхно Н.Н., Захаров В.В. Когнитивные и эмоционально-аффективные нарушения при дисциркуля торной энцефалопатии // «Русский медицинский журнал», 2013. СС. 539–542.
43. Cummings J., Aisen P., DuBois B. et al. Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025. *Alzheimers Res Ther.* 2016 Sep 20; 8: 39. DOI: 10.1186/s13195-016-0207-9. PMID: 27646601.
44. Satir, T., Nazir, F., Vizlin-Hodzic D. et al. (2020). Accelerated neuronal and synaptic maturation by BrainPhys medium increases A β secretion and alters A β peptide ratios from iPSC-derived cortical neurons. *Sci Rep* 10, 601. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57516-7>.
45. Barrera-Ocampo A., Lopera F. Amyloid-beta immunotherapy: the hope for Alzheimer disease? *Colomb Med (Cali)*. 2016 Dec. 30;47(4): 203–212. PMID: 28293044; PMCID: PMC5335861.
46. Gauthier S., Albert M., Fox N. Why has therapy development for dementia failed in the last two decades? *Alzheimers Dement.* 2016 Jan; 12.(1): 60–4. DOI: 10.1016/j.jalz.2015.12.003. Epub 2015 Dec 19. PMID: 26710325.
47. Novak I., Morgan C., Adde L. et al. (2017). Early, Accurate Diagnosis and Early Intervention in Cerebral Palsy: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA Pediatr.* Sep 1;171(9): 897–907. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2017.1689. Erratum in: *JAMA Pediatr.* 2017 Sep 1; 171(9): 919.
48. Salter M., Stevens B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23, 1018–1027: <https://doi.org/10.1038/nm.4397>.

**ALZHEIMER'S DISEASE: NEUROPATHOLOGIES, MODERN
CONCEPTS, MOLECULAR MECHANISMS, PREVENTION
AND TREATMENT STRATEGIES**

Y. Hambardzumyan¹, A. Manukyan¹, S. Tiratsuyan²

Russian-Armenian(Slavonic) University

Institute of Biomedicine and Pharmacy (IBF)

¹*Department of Medical Biochemistry and Biotechnology*

²*Department of Bioengineering, Bioinformatics and Molecular Biology
State Educational Institution of Higher Professional Education*

ABSTRACT

Alzheimer's disease is an irreversible, chronic, progressive neurodegenerative disease of the brain that slowly destroys memory and thinking skills. The disease ranks third after cardiovascular and oncological diseases. Alzheimer's disease is characterized by the accumulation of beta-amyloid plaques, neurofibrillary tangles, and hyperphosphorylation of the tau protein (τ) in neurons, which is associated with microtubules in the brain, causing neuronal disintegration, synaptic dysfunction, and neuronal death, leading to dementia [1]. Genetic, age-related, and environmental factors contribute to a metabolic shift that favors amyloidogenic processing of APP instead of the physiological. Astrocytes play a key role at the "tripartite" synapse, where perisynaptic astrocytic processes span pre- and postsynaptic elements of neurons; and maintain neuronal homeostasis by scavenging excess neurotransmitters or releasing gliotransmitters. The hippocampus is known to be particularly vulnerable to degenerative

changes [2]. Increased production of cytokines interleukins and TNF-alpha leads to neuroinflammation, excessive production of nitric oxide, and initiation of neuronal apoptosis. In addition, cytokines activate phagocytosis of amyloid peptide [3]. There is an increase in the concentration of the neurotransmitter glutamate, which, on the one hand, provokes the development of excitatory toxicity and neuronal death [4], on the other hand, compensation for the deficiency of cholinergic innervation by glutamatergic stops further decline in cognitive [5]. The biggest problem associated with AD is that there are no effective methods for reducing the likelihood of development and optimal treatment. This is why research into the exact mechanisms of development and causes of AD continues to be one of the most relevant in biomedicine.

Keywords: Alzheimer's disease, APP, A β -peptides, tau protein, astrocytes.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ПРОТИВОМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ: НАДВИГАЮЩАЯСЯ ТИХАЯ ПАНДЕМИЯ

А.А. Оганесян¹, С.А. Оганян¹, Ш.А. Казарян¹

¹*Российско-Армянский (Славянский) университет*

¹*Кафедра Медицинской биохимии и биотехнологии*

¹*Институт Биомедицины и Фармации*

ashkhen.hovhannisyann@rau.am

ORCID: 0000-0001-6828-0588

АННОТАЦИЯ

В данной статье речь идет о том, что одним из десяти основных глобальных рисков, определенных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), являлась устойчивость к противомикробным препаратам (УПП), также известная, как «тихая пандемия». Эта угроза является значимой для глобальной системы здравоохранения и представляет собой серьезную опасность для здоровья населения всего мира. По прогнозам ВОЗ, смертность, вызванная антибиотикорезистентностью (АБР), в ближайшем будущем может достичь 10 млн. случаев в год. Это подчеркивает необходимость непрерывных исследований и разработки новых стратегий для контроля и предотвращения распространения УПП бактерий.

Несмотря на рост числа антибактериальных средств, находящихся на стадии клинической разработки, существует острая необходимость в новых инновационных средствах для лечения тяжелых инфекций, а также в замене тех, которые утратили свою эффективность из-за широкого применения. В данном контексте проблема заключается не только в ограниченном числе антибактериальных препаратов, находящихся на стадии разработки, но и в недостаточной степени инновационности существующих подходов. Из 32 антибиотиков, разрабатываемых для лечения инфекций, вызванных бактериями (включенными в список приоритетных бактериальных патогенов (СПБП)), лишь 12-ть можно классифицировать как инновационные. Наибольшую обеспокоенность вызывает группа патогенов, относящихся к критической категории риска СПБП, по сравнению с патогенами, отнесенными к категориям «высокого» и «среднего» приоритета.

Нетрадиционные биологические агенты все чаще исследуются в качестве дополнений или замены традиционным антибиотикам. Нанотехнологии в данном случае могут помочь в разработке, совершенствовании и решении данной проблемы. Изучение и регулирование применения нетрадиционных

биологических агентов требуют системного и поэтапного подхода, обеспечивающего поддержку научных исследований и оценку их эффективности и безопасности. Для борьбы с инфекциями УПП необходимо внедрение инновационных методов и стратегий терапии, обеспечивающих высокую эффективность лечения. Для достижения противодействия этим угрозам необходим многопрофильный и комплексный подход, известный как концепция «Единого здоровья».

Особое внимание следует уделить совершенствованию медицинских образовательных программ путем интеграции в них принципов концепции «Единое здоровье».

В данном обзоре мы представили последние достижения в изучении ключевых молекулярных механизмов, лежащих в основе УПП, которые используются бактериями и другими микроорганизмами в борьбе с антимикробными препаратами, чтобы подчеркнуть необходимость и важность разработки подходов и механизмов мониторинга в соответствии с этой концепцией.

Ключевые слова: устойчивость к противомикробным препаратам, множественная лекарственная устойчивость, молекулярные механизмы устойчивости, нетрадиционные методы борьбы УПП.

Введение

7 мая 2024г. ВОЗ опубликовала обновленный список приоритетных бактериальных патогенов (СПБП/BRPL), включающий 15 семейств антибиотикорезистентных бактерий, выделенных в группы критического, высокого и среднего уровней приоритетности. Среди них следует отметить грамотрицательные бактерии, устойчивые к антибиотикам последнего резерва, лекарственно-устойчивые *Mycobacterium tuberculosis* и другие патогены с высокой резистентностью – такие, как *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Включение этих патогенов в список подчеркивает их глобальное воздействие с точки зрения бремени, а также проблемы, связанные с трансмиссивностью, излечимостью и вариантами профилактики. Он также отражает ход научно-исследовательских работ по разработке новых методов лечения и возникающие тенденции в области резистентности. ВОЗ СПБП выступает в качестве руководства по определению приоритетов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ (НИОКР/R&D) и инвестиций, подчеркивая необходимость региональных стратегий для эффективной борьбы с резистентностью. Он нацелен на разработчиков антибактериальных препаратов, академические и государственные исследовательские институты, спонсоров исследований и государ-

ственно-частные партнерства, инвестирующие в НИОКР в области антибиотикорезистентности (АБР), а также на политиков, ответственных за разработку и реализацию политики и программ, направленных на борьбу с АБР [1].

В июне 2024г. ВОЗ опубликовала свой последний отчет об антибактериальных средствах, включая антибиотики, находящихся на стадии клинической и доклинической разработки во всем мире. Как представляется, процесс перехода к созданию антибактериальных препаратов, направленных против одного патогенного микроорганизма, замедлился. Использование препаратов, предназначенных для борьбы с одним конкретным микроорганизмом, требует наличия широкодоступных и недорогих средств экспресс-диагностики, позволяющих определить конкретный тип возбудителя инфекции для подбора соответствующего препарата [1].

Появление и определение резистентности бактерий к антибактериальным препаратам

В начале эпохи антибиотиков, в середине XX-го века, большинство возбудителей инфекций были чувствительны к антибиотикам. Устойчивость к антибиотикам была обнаружена уже 1940-х гг., практически сразу после первого широкомасштабного клинического использования пенициллина – первого антибиотика [2].

Растущая потребность в эффективных антибиотиках истекает из распространения по всему миру микроорганизмов, обладающих МЛУ [3]. Термин «множественная лекарственная устойчивость» (МЛУ, (multidrug resistance (MDR)), определяется как «устойчивость к более чем одному классу антимикробных препаратов». По мере роста проблемы лекарственной устойчивости требуются стандарты для характеристики микроорганизмов, устойчивых к нескольким антимикробным препаратам [4]. МЛУ диагностируется на основе картины результатов теста на чувствительность к антибиотикам, показывающих устойчивость к различным антимикробным препаратам из классов или подклассов, доступных на рынке. Научная литература называет это «устойчивостью к трем или более классам антимикробных препаратов» у грамотрицательных бактерий [5–7].

Широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ, Extensive drug resistance (XDR)) – это термин, используемый для описания группы бактерий, которые имеют устойчивость к антимикробным препаратам. Эти бактерии являются эпидемиологически наиболее значимыми из-за их устойчивости ко всем или к большинству одобренных антимикробных препаратов на рынке. Поэтому медицинское сообщество использовало различные общие термины для описания уровня устойчивости – такие, как “extreme drug resistance”, “extensive drug resistance”, “extremely drug resistant”, “extensively drug resistant” [8–11].

Термин «пан-резистентность» (PDR) происходит от греческого слова “pan”, что означает «все». PDR обозначает бактериальные изоляты, которые проявляют «устойчивость ко всем антимикробным агентам» всех классов и их подклассов, доступных в медицинской практике. В различных исследованиях PDR определяется как «устойчивый ко всем коммерчески доступным антимикробным агентам», «устойчивый ко всем регулярно тестируемым антимикробным препаратам» и «устойчивый ко всем классам антибиотиков, доступных для эмпирического лечения» [4, 12].

Механизмы устойчивости бактерий к противомикробным препаратам

Механизмы формирования устойчивости бактерий к противомикробным препаратам (УПП) включают несколько основных процессов, которые позволяют бактериям выживать и размножаться даже в присутствии антимикробных препаратов. Ключевыми механизмами МЛУ являются изменения генетических и механистических основ (Рис. 1). Основные категории, используемые для описания устойчивости к антибиотикам, возникающей как в результате естественных, так и генетически обусловленных процессов, – это естественная, приобретенная, перекрестная, множественная и пан-лекарственная устойчивость. Внутренняя устойчивость бактерий характеризуется постоянным улучшением механизмов устойчивости через структуры клеточной стенки и другие компоненты клетки [13].

Снижение проницаемости

Одним из механизмов УПП является увеличение оттока препаратов из клетки или уменьшение их притока за счет подавления или мутации поринов.

Бактериальные выводящие (эффлюксные) насосы активно транспортируют многие антимикробные препараты путем снижения их внутриклеточной концентрации. Этот защитный барьер состоит из ряда транспортных белков, расположенных в мембране бактериальной клетки и периплазме, которые обеспечивают удаление различных посторонних субстратов, включая антимикробные препараты, органические растворители, токсичные тяжелые металлы и другие вещества из бактериальных клеток. Эффлюксные насосы не только работают как функциональные транспортеры, но и защищают от экологического стресса. Эти насосы – такие, как RND, MFS, MATE, SMR и ABC (АТФ-связывающая кассета), представляют различные семейства транспортеров [14]. ABC-насосы являются «первично-активными транспортерами», потребляющими энергию, вырабатываемую гидролизом АТФ. В то время как «вторично-активные транспортеры» (MATE, MFS, RND и SMR) используют движущую силу протонов (PMF) в качестве источника энергии путем откачивания натрия и водорода из мембраны [14].

При сверхэкспрессии эффлюксные насосы также могут способствовать развитию высокой устойчивости к ранее клинически эффективным антибиотикам [15,16]. Повышенная экспрессия эффлюксных насосов также может возникать в результате индукции в ответ на сигналы окружающей среды, а также в условиях, в которых их функция становится необходимой (Рис. 1.) [17–29].

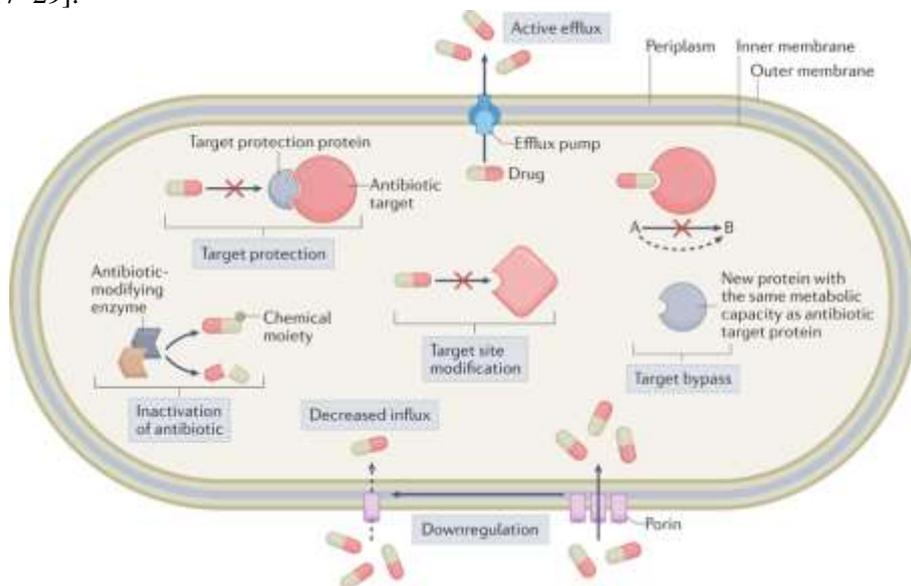


Рисунок 1. Механизмы формирования УПП у микроорганизмов [13].

Некоторые эффлюксные насосы имеют узкую субстратную специфичность (например, насосы тетрациклина (Tet)), но многие транспортируют широкий спектр структурно разнородных субстратов и известны как эффлюксные насосы с МЛУ [30–35]. Сверхэкспрессия эффлюксных насосов также влияет на патогенность бактерий, включая образование биопленок и регуляцию кворум-сенсинга (КС) [36, 37]. Эффлюксные насосы экспортируют не только противомикробные препараты, но и детерминанты вирулентности, включая адгезины, токсины или другие белки, которые играют ключевую роль в процессе колонизации клеток-хозяев [38].

По сравнению с грамположительными видами грамотрицательные бактерии по своей природе менее проницаемы для многих антибиотиков, поскольку их внешняя мембрана образует барьер непроницаемости [39–41]. Гидрофильные антибиотики проникают через внешнюю мембрану, диффундируя через белки порины внешней мембраны. У большинства представителей семейства *Enterobacteriaceae* основные порины – OmpF, OmpE и OmpC

функционируют как неспецифические каналы и ранее существующие предположения, что в этих каналах есть сайты, связанные с лекарствами, теперь считаются неверными [39–40, 42]. Следовательно, снижение проницаемости внешней мембраны и ограничение проникновения антибиотиков в бактериальную клетку достигается путем снижения регуляции поринов или замены поринов более селективными каналами. Этот хорошо известный механизм внутренней устойчивости к антибиотикам у грамотрицательных бактерий был рассмотрен ранее [43]. Однако недавние данные показали, что у *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* и *Acinetobacter spp.* снижение экспрессии порина в значительной степени способствует устойчивости к новым препаратам – таким, как карбапенемы и цефалоспорины, устойчивость к которым обычно опосредована ферментативной деградацией [44–47]. Например, клинически значимая устойчивость к карбапенемам у *Enterobacteriaceae* может возникать при отсутствии продукции карбапенемаз, если мутации снижают продукцию поринов или если присутствуют мутантные аллели порина [44, 47]. Структурные изменения или инактивация гена, кодирующего порин – такой, как OmpF, могут привести к повышенной устойчивости к определенным классам антибиотиков – таким, как β -лактамы и хинолоны [41].

Селективное давление, оказываемое карбапенемами способствует появлению мутаций в генах поринов, а также в генах, регулирующих их экспрессию. Это было показано быстрым накоплением мутаций в этих генах у штаммов *E. coli* и *Enterobacter spp.* [45, 48–49]. Кроме того, изоляты *Klebsiella pneumoniae*, которые экспрессируют варианты поринов, были связаны с клональными линиями, которые вызвали глобальные вспышки инфекции [50].

Изменение мишени антибактериальных препаратов

Бактерии могут изменять молекулы-мишени, с которыми связывается антибиотик. Модификация мишени посредством мутации или посттрансляционной модификации предотвращает связывание антибиотиков [51]. Наконец, сами антибиотики могут быть разрушены или модифицированы внутри клетки [52]. Одной из наиболее клинически значимых и распространенных групп ферментов устойчивости к антибиотикам являются гидролазы (β -лактамазы), которые инактивируют β -лактамные антибиотики – цефалоспорины, пенициллины и карбапенемы.

Ферментативная модификация молекулы антибиотика является самым распространенным механизмом клинически значимой резистентности к аминогликозидам. Ферменты, модифицирующие аминогликозиды (AMEs), опосредуют ацетилирование, фосфорилирование или аденилирование аминогликозидов, что приводит к снижению авидности модифицированного антибиотика к его мишени. Гены, кодирующие AMEs, обычно расположены в MGEs

(Mobile Genetic Elements) – мобильных генетических элементах, которые могут перемещаться внутри генома или между клетками различных организмов, что позволяет им эффективно распространяться среди бактерий. Вследствие этого механизма практически все значимые для медицины бактерии могут развивать резистентность к аминогликозидам. [53]. Ферментативное ацетилирование молекулы антибиотика является самым распространенным механизмом резистентности к хлорамфениколу. Множество хлорамфениколацетилтрансфераз (CATs) было описано у различных видов бактерий [54].

Активация нитрофурантоина бактериальными редуктазами, приводящая к образованию токсичных промежуточных соединений, является необходимым условием для его антимикробной активности. Мутации в генах нитроредуктазы *nfsA* и *nfsB* составляют основной механизм устойчивости к нитрофурантоину [55]. Мутации в гене *ribE* также участвовали в устойчивости к нитрофурантоину. Ген *ribE* кодирует люмазинсинтазу, фермент, необходимый для модификации антибиотиков, а ферменты, катализирующие модификацию лекарств – такие, как киназы, ацетилтрансферазы и нуклеотидилтрансферазы, также широко распространены и особенно связаны с аминогликозидными антибиотиками.

Другим новым классом ферментов, модифицирующих мишень, являются метилтрансферазы, которые модифицируют элементы рРНК на рибосоме, что приводит к устойчивости к аминогликозидным, линкозамидным, стрептограминным, макролидным и оксазолидиноновым антибиотикам. Метилирование стратегических нуклеотидов на сайте связывания антибиотика ослабляет его аффинность к мишени посредством стерических взаимодействий с модифицированным нуклеотидом. Поскольку некоторые антибиотики имеют частично перекрывающиеся сайты связывания, метилирование одного нуклеотида может привести к устойчивости к нескольким классам антибиотиков [56–57].

Все известные *pРНК* метилтрансферазы используют метильный донор *S*-аденозил-L-метионин (SAM) для метилирования азотистого основания или 2'-*O*-рибозы целевого нуклеотида и являются метилтрансферазами класса I [58]. Метилтрансферазы 16S рРНК являются *N*-метилтрансферазами, обычно метилирующими N7 гуанина и N1 аденина [59–60]. Растущее понимание молекулярных механизмов ферментов, модифицирующих мишени открывает возможности для разработки лекарств следующего поколения, способных преодолевать эти стратегии устойчивости [61].

В некоторых случаях устойчивость к антибиотикам может возникать из-за потери эндогенного метилирования. Антибиотики туберактиномицинового ряда капреомицин и виомицин связываются на границе субъединиц 30S и 50S в интактной рибосоме, а метилирование рибозы 16S *pРНК* C1409 и 23S *pРНК* C1920 требуется для их антимикробактериальной активности [62].

Инактивирующие мутации в гене *tlyA* приводят к потере обоих метилированных и формированию устойчивости к капреомицину у *Mycobacterium tuberculosis* [63].

Мутации или модификации на сайте-мишени могут нарушить это взаимодействие, влияя на эффективность антибиотиков. Частота спонтанных мутаций, приводящих к устойчивости к антибиотику, составляет около 10^{-8} – 10^{-9} . Мутации возникают случайным образом и часто наносят ущерб бактериям-хозяевам, но при приобретении эволюционного преимущества они могут стать доминирующими благодаря горизонтальной или вертикальной передаче генов [51]. Поскольку ферменты имеют отдельные связывающие карманы, понимание их структуры и молекулярных механизмов открывает возможности для рационального проектирования и оптимизации ингибиторов, которые могут выступать в роли адьювантов антибиотиков.

Изменение метаболизма

Некоторые бактерии могут переходить в состояние низкого метаболизма (например, «дремлющее» состояние), что делает их менее восприимчивыми к действию антибиотиков, так как многие препараты наиболее эффективны против активно делящихся клеток. Ауксотрофные бактерии лишены ключевых метаболических путей, необходимых для собственного синтеза важных молекул – таких как аминокислоты, нуклеотиды, витамины и жирные кислоты. Сульфаниламиды, блокируя активность ферментов, ответственных за образование фолиевой кислоты, мешают синтезу нуклеиновых кислот и, следовательно, росту бактерий [64]. Однако некоторые бактерии могут преодолеть это, активируя альтернативные метаболические пути или осуществляя внешний захват фолиевой кислоты [65]. Также было обнаружено, что ауксотрофия способствует сопротивляемости бактерий к антибиотикам, усиливая метаболические взаимодействия и уменьшая внутриклеточные концентрации антибиотиков, что позволяет им выживать даже при высоких дозах препаратов [14].

Внедрение систем самовосстановления

Оперон множественной устойчивости к антибиотикам у кишечных бактерий регулирует процессы репарации ДНК и целостности внешней мембраны, что способствует укреплению их устойчивости к антибиотикам [66]. Лocus множественной устойчивости к антибиотикам (*mar*) в *E. coli* играет решающую роль в кросс-устойчивости к различным классам антибиотиков – таким, как тетрациклины, хинолоны и β -лактамы [67]. Исследования подтверждают, что механизм активного оттока, который контролируется глобальным опероном, является одной из основных причин множественной устойчивости бактерий к антибиотикам. В этом контексте семейство белков

MarR играет важную роль, участвуя в регуляции транскрипции, синтезе токсических факторов и других физиологических процессах [14]. Например, белок *MarR* в *E. coli* действует как негативный регулятор оперона *MarRAB*, подавляя экспрессию генов, связанных с устойчивостью к лекарственным препаратам. Факторы транскрипции *MarR* и *MarA* способствуют множественной устойчивости к антибиотикам, регулируя экспрессию факторов эффлюкса и поринов [68]. Недавние исследования также показали, что активация *MarA* способствует экспрессии генов, связанных с транспортом липидов и репарацией ДНК, что снижает повреждение ДНК, вызванное антибиотиками [14]. Этот механизм позволяет бактериям снизить скорость проникновения антибиотиков в клетки и минимизировать их воздействие на клеточную структуру и метаболизм [69]. В результате, бактерии могут повысить свою толерантность к антибиотикам, что позволяет им выживать в условиях антибиотикотерапии.

Кооперативное сопротивление сообщества

В этом случае отдельные бактериальные клетки «сотрудничают» друг с другом, обмениваясь генетической информацией или вырабатывая сигнальные молекулы, чтобы координированно адаптироваться к антибиотикам [14]. Бактерии, образующие биопленки, могут лучше противостоять воздействию антибиотиков, т.к. в структуру биопленки антибиотики труднее проникают и могут становиться менее эффективными [70]. Биопленки представляют значительную опасность для здоровья из-за их способности к образованию лекарственной устойчивости, защите хозяина и сопротивлению стрессам. Это способствует развитию хронических бактериальных инфекций по всему миру [71]. Биопленки представляют собой интегрированную массу бактериальных клеток, окруженную экстраклеточной полисахаридной матрицей, которая прочно связана как с абиотическими, так и с биотическими поверхностями.

Инфекции, вызванные бактериями, проживающими внутри защищенных биопленочных сообществ, часто обладают устойчивостью к антибиотикам, что связано со структурными и функциональными особенностями биопленки [72].

Исследования свидетельствуют о том, что бактерии, обитающие в биопленках, обладают значительной устойчивостью к антибиотикам, что делает их трудными для лечения стандартными методами. Более того, такие бактерии обычно проявляют толерантность к действию иммунной системы хозяина и антисептиков, что способствует продолжительности инфекций [73].

Использование возможностей наноматериалов и технологий для устранения УПП бактерий

Наноматериалы открывают возможности доступа к антибактериальным модальностям, новым для бактерий, которые не входят в их естественный защитный арсенал. Терапевтический эффект наноматериалов в значительной степени обусловлен наномасштабным ограничением материалов, объединенных с мновалентными взаимодействиями и высоким отношением поверхности к объему. Наноразмерные металлы, оксиды металлов, органические наночастицы (НЧ) и нанокompозиты с мощным антибактериальным действием стратегически выгодны для безопасного контроля поверхностных инфекций и инфекционных заболеваний. Разнообразный химический состав и внутренние свойства этих антибактериальных наноматериалов (или нанобиотиков) обеспечивают многогранные способы действия против целевых бактерий. В частности, физиологические состояния бактерий, т.е. планктонная, биопленочная, стационарная, голодная и логарифмическая фаза роста, влияют на их чувствительность к определенным наноматериалам. Такие факторы, как аэрация, pH, температура и многие другие характеристики окружающей среды, в значительной степени влияют на антимикробную активность наноматериалов. Эти свойства нанобиотиков открывают возможности доступа к уникальному механизму действия, который избирательно и эффективно нацелен на бактериальные системы [74].

Наноматериалы выигрывают от своих контролируемых и наноразмерных структур по сравнению с бактериальными компонентами [75]. Высокое отношение площади поверхности к объему обеспечивает сильную химию поверхности с точки зрения мновалентных взаимодействий с бактериальными клетками или функционализации для определенного заряда или целевой доставки. Силы, которые в основном доминируют в нано-биоинтерфейсе – это силы Ван-дер-Вальса, электростатические силы, гидрофобные взаимодействия и взаимодействия рецептор-лиганд. Наноматериалы действуют по нескольким одновременным или коррелированным бактерицидным механизмам [76].

Молекулярная архитектура оболочки бактериальной клетки является основным физическим барьером для любого антимикробного препарата. Липотейхоевая/тейхоевая кислота делает диффузию высокогидрофобных антибиотических фрагментов через эту оболочку непостижимой. Материалы с положительным потенциалом могут избирательно связываться с бактериальными поверхностями с более высоким отрицательным потенциалом, чем клетки млекопитающих. Физический контакт наноматериалов, имеющих надлежащее равновесие между катионным зарядом и гидрофобностью (амфифильность), обеспечивает колоссальное антимикробное свойство с низким уровнем цитотоксичности и гемолиза [77].

Наноматериалы электростатически закрепляются на бактериальных оболочках и изменяют их мембранный потенциал, что приводит к деполяризации и потере целостности мембраны. Поскольку физическое ограждение разрушено, возникают транспортные несоответствия, нарушение дыхания и вторжение в метаболические пути, что приводит к гибели клетки.

Наноматериалы – такие, как углеродные нанотрубки (CNT), фуллерены, TiO_2 , ZnO , CeO_2 и наночастицы серебра (AgNPs), вызывают окислительный стресс как основной механизм их бактерицидного свойства. Основными причинами генерации АФК являются: прооксидантные функциональные группы на ультрареактивной поверхности; многовалентная поверхность НЧ из-за участия ионов переходных металлов в активном окислительно-восстановительном цикле и клеточная интернализация НЧ, приводящая к активации НАДФН-оксидазы или митохондриального дыхания [78]. Под влиянием внешних стимулов контролируемое высвобождение ионов металлов объясняется большой площадью поверхности НЧ. Эти ионы металлов абсорбируются в клеточной мембране, что приводит к прямому взаимодействию с функциональными группами основных белков и нуклеиновых кислот. Они проникают в бактериальную клетку с помощью ионных каналов и биологического насоса, накапливаются выше допустимого диапазона, вызывая гибель бактериальной клетки [79].

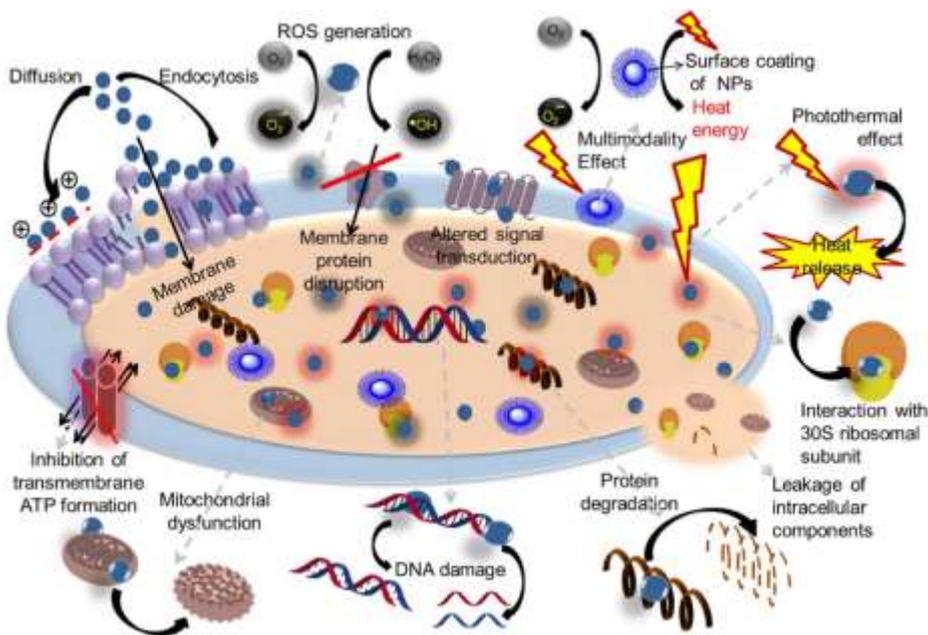


Рисунок 2. Механизмы антибактериальной активности наночастиц [76].

Наноматериалы останавливают рост бактерий и, в конечном итоге, убивают бактерии посредством подавления регуляции генов, нарушения синтеза белка и окислительного повреждения ДНК [80]. Транскриптомные и протеомные исследования для понимания механизма действия наночастиц золота выявили два основных механизма: первый препятствовал слиянию рибосомальной субъединицы с т-РНК, а второй – снижению уровня клеточного АТФ из-за нарушения целостности мембраны и потери активности АТФазы [81]. НЧ имеют сильное сродство к дисульфидной связи бактериальных белков, что влияет на метаболизм и окислительно-восстановительный гомеостаз клетки (Рис. 2.) [82].

Ионы Ag^+ интеркалируют нити ДНК с помощью кулоновских взаимодействий и разрыва водородных связей [83]. *AgNPs* проявляют генотоксический потенциал, препятствуя раскручиванию и транскрипции бактериальной ДНК, вызывая нестабильность ДНК [84]. *AgNPs* способствуют повышению экспрессии генов антиоксидантной систем и генов, кодирующих транспорт металлов, восстановление металлов и насосы АТФазы [85]. Кроме того, они активируют гены *gadB*, *metL* и *argC* цикла трикарбоновых кислот, отвечающих за метаболизм аминокислот [86].

Исследования показали, что крупные агрегированные *AgNPs* обладают лучшей проникающей способностью в инфицированные участки и более длительным удержанием в бактериальных биопленках, что нарушает их образование и эффективно уничтожает бактериальные популяции [87]. Кроме того, агрегированные *AgNPs* сохраняются в тканях дольше, а экзоцитоз из клеток происходит медленнее по сравнению с мелкими неагрегированными частицами, что усиливает их терапевтическое действие [87].

Наноматериалы открывают разнообразные и инновационные возможности для разработки новых и эффективных методов лечения инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам микроорганизмами, а также инфекций, связанных с биопленками. Наноматериалы обладают возможностью предотвращать развитие лекарственной устойчивости благодаря внедрению различных механизмов антибактериального действия.

Ожидается, что в будущем проблемы, связанные с УПП, будут решены с помощью инновационных стратегий и антимикробных нанофармацевтических препаратов, в контексте борьбы с «супербактериями» в «пост-антибиотиковую эру».

Особое внимание следует уделить на усовершенствование образовательных программ в области медицины, интегрируя в них принципы концепции «Единого здоровья».

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization Ten Threats to Global Health in 2019. 2019. [(accessed on 2 September 2024)]. Available online: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>.
2. Morier D. “Antibiotic resistance”. *Encyclopedia Britannica*, 29 OcV.2024, <https://www.britannica.com/science/antibiotic-resistance>. Accessed 11 November 2024.
3. Estany-Gestal A. et al. Antibiotic Use and Antimicrobial Resistance: A Global Public Health Crisis // “Antibiotics”, 2024. V.13, № 9. C. 900.
4. Magiorakos A. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance // “Clinical Microbiology and Infection”, 2012. V.18, № 3. PP. 268–281.
5. Cohen A. et al. Recommendations for metrics for multidrug-resistant organisms in healthcare settings: SHEA/HICPAC position paper // “Infection Control & Hospital Epidemiology”, 2008. V.29, № 10. PP. 901–913.
6. Hidron A. et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with health care-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007 // “Infection Control & Hospital Epidemiology”, 2008. V.29, № 11. PP. 996–1011.
7. Gould I. The epidemiology of antibiotic resistance // “International Journal of Antimicrobial Agents”, 2008. V.32, № 1. PP. 2–9.
8. Sharmila N. et al. Overview of antimicrobial resistance and mechanisms: The relative status of the past and current // “The Microbe”, 2024. V.3. C. 100083.
9. Tseng Y. et al. Prognosis of adult patients with bacteremia caused by extensively resistant *Acinetobacter baumannii* // “Diagnostic Microbiology and Infectious Disease”, 2007. V.59, № 2. PP.181–190.
10. Karageorgopoulos D. et al. Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections // “Lancet Infectious Diseases”, 2008. V.8, № 12. PP. 751–762.
11. Park Y. et al. Extreme drug resistance in *Acinetobacter baumannii* Infections in intensive care units, South Korea // “Emerging Infectious Diseases”, 2009. V.15, № 8. PP. 1325–1327.
12. Kuo L. et al. Dissemination of a clone of unusual phenotype of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* at a university hospital in Taiwan // “Journal of Clinical Microbiology”, 2004. V.42, № 4. PP. 1759–1763.
13. Darby E. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited // “Nature Reviews Microbiology”, 2023. V.21. PP. 280–295.
14. Zhang F. et al. The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies // “Antibiotics”, 2022. V.11, № 9. C. 1215.
15. Hernando-Amado S. et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials // “Drug Resistance Updates”, 2016. V.28. PP.13–27.
16. Blair J.M. et al. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps // “mBio”, 2016. V.7, № 4 P.e00840-16.
17. Baucheron S. et al. Bile-mediated activation of the *acrAB* and *tolC* multidrug efflux genes occurs mainly through transcriptional derepression of *ramA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // “Journal of Antimicrobial Chemotherapy”, 2014. V.69 PP. 2400–2406.
18. Schindler B. et al. Functional consequences of substitution mutations in *MepR*, a repressor of the *Staphylococcus aureus* *mepA* multidrug efflux pump gene // “Journal of Bacteriology”, 2013. V.195. PP. 3651–3662.

19. Pomposiello P. et al. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate // "Journal of Bacteriology", 2001. V.183. PP. 3890–3902.
20. Kaatz G. et al. Effect of promoter region mutations and mgrA overexpression on transcription of norA, which encodes a *Staphylococcus aureus* multidrug efflux transporter // "Antimicrobial Agents Chemotherapy", 2005. V.49. PP.161–169.
21. Kaczmarek F. et al. Genetic and molecular characterization of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin // "Antimicrobial Agents Chemotherapy", 2004. V.48. PP.1630–1639.
22. Olliver A. et al. Role of an acrR mutation in multidrug resistance of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // "FEMS Microbiology Letters", 2004. V.238, № 1. PP. 267–272.
23. Tahar van der Straaten et al. *Salmonella* gene rma (ramA) and multiple drug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium // "Antimicrobial Agents Chemotherapy", 2004. V.48, № 6. PP. 2292–2294.
24. Warner D. et al. Clinically relevant mutations that cause derepression of the *Neisseria gonorrhoeae* MtrC-MtrD-MtrE efflux pump system confer different levels of antimicrobial resistance and in vivo fitness // "Molecular Microbiology", 2008. V.70. PP. 462–478.
25. Webber, M. & Piddock L.J.V. Absence of mutations in marRAB or soxRS in acrB-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli* // "Antimicrobial Agents Chemotherapy", 2001. V.45. PP. 1550–1552.
26. Webber M. et al. Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to acrB expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* Isolates // "Antimicrobial Agents Chemotherapy", 2005. V.49. PP. 4390–4392.
27. Hirakawa H. et al. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli* // "Molecular Microbiology", 2005. V. 55. PP.1113–1126.
28. Nikaido E. et al. Effects of indole on drug resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium revealed by genome-wide analyses // "Gut Pathogens", 2012. V.4, № 5.
29. Nikaido E. et al. Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to indole and paraquat // "Microbiology", 2011. V.157. PP. 648–655.
30. Deng W., Li C., Xie J. The underlying mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors // "Cellular Signaling", 2013. V.25, № 7. PP. 1608–1613.
31. Deng X. et al. Expression of multidrug resistance efflux pump gene norA is iron responsive in *Staphylococcus aureus* // "J. Bacteriol", 2012. V.194. PP. 1753–1762.
32. Mercante A. et al. MpeR regulates the mtr efflux locus in *Neisseria gonorrhoeae* and modulates antimicrobial resistance by an iron-responsive mechanism // "Antimicrobial Agents Chemotherapy", 2012. V.56. PP. 1491–1501.
33. Wang K. et al. The expression of ABC efflux pump, Rv1217c–Rv1218c, and its association with multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in China // "Current Microbiology", 2013. V. 66. PP. 222–226.
34. Kumar N. et al. Crystal structure of the transcriptional regulator Rv1219c of *Mycobacterium tuberculosis* // "Protein Science", 2014. V. 23. PP. 423–432.
35. Huang L. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview // "Antibiotics (Basel)", 2022. V. 11, № 4. C. 520.

36. Kong E. et al. Modulation of *Staphylococcus aureus* Response to Antimicrobials by the Candida albicans Quorum Sensing Molecule Farnesol // “Antimicrobial Agents Chemotherapy”, 2017. V.61. C. e01573-17.
37. Alcalde-Rico M. et al. Multidrug Efflux Pumps at the Crossroad between Antibiotic Resistance and Bacterial Virulence // “Frontiers in Microbiology”, 2016 V.7. C. 1483.
38. Piddock L.J. Multidrug-resistance efflux pumps_Not just for resistance // “Nature Reviews Microbiology”, 2006. V.4. PP. 629–636.
39. Kojima S. & Nikaido H. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels // “Proceedings of the National Academy of Science USA”, 2013. V.110. P.E2629–E2634
40. Vargiu A. & Nikaido H. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations // “Proceedings of the National Academy of Science USA”, 2012. V.109. PP. 20637–20642.
41. Bafna J. et al. Kanamycin Uptake into *Escherichia coli* Is Facilitated by OmpF and OmpC Porin Channels Located in the Outer Membrane // “ACS Infectious Diseases Journal”, 2020. V.6. PP.1855–1865.
42. Tran Q. et al. The translocation kinetics of antibiotics through porin OmpC: insights from structure-based solvation mapping using WaterMap // “Proteins”, 2013. V.81. PP. 291–299.
43. Tamber S. & Hancock R. On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas* // “Frontiers in Bioscience”, 2003. V.8. P.s472–s483.
44. Baroud M. et al. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases // “International Journal of Antimicrobial Agents”, 2013. V.41. PP. 75–79.
45. Lavigne J. et al. An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates // “International Journal of Antimicrobial Agents”, 2013. V.41. PP.130–136.
46. Poulou A. et al. Outbreak caused by an ertapenem-resistant, CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 clone carrying an OmpK36 porin variant // “Journal of Clinical Microbiology”, 2013. V.51. PP. 3176–3182.
47. Wozniak R. & Waldor M. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow // “Nature Rev. Microbiology”, 2010. V.8. PP. 552–563.
48. Novais Á. et al. Spread of an OmpK36-modified ST15 *Klebsiella pneumoniae* variant during an outbreak involving multiple carbapenem-resistant Enterobacteriaceae species and clones // “European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases”, 2012. V.31. PP. 3057–3063.
49. Tangden V. et al. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an in vitro pharmacokinetic model // “Antimicrobial Agents Chemotherapy”, 2013. V.68. PP. 1319–1326.
50. Papagiannitsis C. et al. OmpK35 and OmpK36 porin variants associated with specific sequence types of *Klebsiella pneumoniae* // “Journal of Chemotherapy”, 2013. V.25. PP. 250–254.
51. Nadeem S. et al. Antimicrobial resistance: More than 70 years of war between humans and bacteria // “Critical Reviews in Microbiology”, 2020. V.46. PP. 578–599.
52. De Pascale G., Wright G.D. Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions // “ChemBioChem”, 2010. V.11. PP.1325–1334.

53. Ramirez M., Tolmasky M. Aminoglycoside modifying enzymes // “Drug Resist Updates”, 2010. V.13, № 6. CC. 151–171.
54. Schwarz S. et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol // “FEMS Microbiol Rev”, 2004.
55. Osei Sekyere J. Genomic insights into nitrofurantoin resistance mechanisms and epidemiology in clinical Enterobacteriaceae // “Future Science OA”, 2018. V.4, № 5. C. 293.
56. Lin J. et al. Ribosome-targeting antibiotics: modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design // “Annual Review of Biochemistry”, 2018. V.87. PP. 451-478
57. Long K. et al. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics // “Antimicrobial Agents Chemotherapy”, 2006. V.50. PP. 2500–2505.
58. Morić I. et al. rRNA methyltransferases and their role in resistance to antibiotics // “Journal of Medical Biochemistry”, 2010. V.29. PP.165–174.
59. Schmitt E. et al. Structural bases for 16 S rRNA methylation catalyzed by ArmA and RmtB methyltransferases // “Journal of Molecular Biology”, 2009. V. 388. PP. 570–582.
60. Dunkle J. et al. Molecular recognition and modification of the 30S ribosome by the aminoglycoside-resistance methyltransferase NpmA // “Proceedings of the National Academy of Science USA”, 2014. V.111. PP. 6275–6280.
61. Schaenzer A., Wright G. Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets // “Trends in Molecular Medicine”, 2020. V.26, № 8. CC. 768–782.
62. Johansen S. et al. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs // “Molecular Cell”, 2006. V.23. PP. 173–182.
63. Maus C. et al. Mutation of tlyA confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // “Antimicrobial Agents Chemotherapy”, 2005. V.49. PP. 571–577.
64. Zampieri M. The genetic underground of antibiotic resistance // “Science”, 2021. V.371. PP. 783–784.
65. Yu J.S.L. et al. Microbial communities form rich extracellular metabolomes that foster metabolic interactions and promote drug tolerance // “Nature Microbiology”, 2022. V.7. PP. 542–555.
66. Hao Z. et al. The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli* // “Nature Chemical Biology”, 2014. V.10. PP. 21–28.
67. Sharma P. et al. The multiple antibiotic resistance operon of enteric bacteria controls DNA repair and outer membrane integrity // *NaV. Commun*, 2017, V 8. P.1444.
68. Ariza R.R. et al. Repressor mutations in the marRAB operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli* // “Journal of Bacteriology”, 1994. V. 176. CC. 143–148.
69. Banerjee S. et al. Mechanical feedback promotes bacterial adaptation to antibiotics // “Nature Physics”, 2021. V.17. PP. 403–409.
70. Chegini Z. Antibacterial and antibiofilm activity of silver nanoparticles stabilized with C-phycoerythrin against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* // *FronV.Bioeng. Biotechnol.*, 22 October 2024. Sec. Nanobiotechnology V. 12, 2024: | <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1455385>.
71. Srinivasan R. et al. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections // *FronV.Microbiol.*, 11 May 2021, V. 12: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676458>.

72. *Sivaranjani M., et al.* Inhibitory effect of α -mangostin on *Acinetobacter baumannii* biofilms-an in vitro study // *Biofouling* 2018, V. 34. PP. 579–593. DOI: 10.1080/08927014.2018.1473387.
73. *Vasiliev G. et al.* Synergistic antibacterial effect of copper and silver nanoparticles and their mechanism of action // *Sci. Rep.* 2023, V. 13(1), 9202. doi:10.1038/s41598-023-36460-2.
74. *Zhu X. et al.* Antibiotic resistance and nanotechnology: A narrative review // “*Microbial Pathogenesis*”, 2024. V.193. C. 106741.
75. *Gupta K. et al.* Characteristics investigation on biofilm formation and biodegradation activities of *Pseudomonas aeruginosa* strain ISJ14 colonizing low density polyethylene (LDPE) surface. // 2020, V. 6 (7): <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04398>.
76. *Chakraborty N. et al.* Nanobiotics against antimicrobial resistance: harnessing the power of nanoscale materials and technologies // “*Journal of Nanobiotechnology*”, 2022. V. 20. C. 375.
77. *Huo S. et al.* Fully Zwitterionic nanoparticle antimicrobial agents through tuning of core size and ligand structure // “*ACS Nano*”, 2016. V.10. PP. 8732–7.
78. *Hamal DB. et al.* A multifunctional biocide/sporicide and photocatalyst based on titanium dioxide (TiO₂) codoped with silver, carbon, and sulfur // “*Langmuir*”, 2010. V.26. PP. 2805–10.
79. *Chang YN. et al.* The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles // “*Materials*”, 2012. V.5. PP. 2850–71.
80. *Chatterjee A., Chakraborty R., Basu V.* Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles // “*Nanotechnology*”, 2014. V.25. C. 135101.
81. *Cui Y. et al.* The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli* // “*Biomaterials*”, 2012. V.33. PP. 2327–33.
82. *Niemirowicz K. et al.* Gold-functionalized magnetic nanoparticles restrict growth of *Pseudomonas aeruginosa* // “*Int J Nanomed*”, 2014. V.9. PP. 2217–24.
83. *Monteiro D. et al.* Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles // “*Journal of Prosthodontics*”, 2012. V.21. PP. 7–15.
84. *Lee S., Jun B.* Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine // “*International Journal of Molecular Sciences*”, 2019. V.20. P. 865.
85. *Nagy A. et al.* Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action // “*Int J Nanomed*”, 2011. V.6. PP.1833–52.
86. *Ashmore D. et al.* Evaluation of *E. coli* inhibition by plain and polymer-coated silver nanoparticles // “*Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*”, 2018. V.60. P. e18.
87. *Cheng X. et al.* pH-triggered size-tunable silver nanoparticles: targeted aggregation for effective bacterial infection therapy // “*Small.*”, 2022. V.18 (22). P. e2200915.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE: THE COMING SILENT PANDEMIC

A. Oganessian¹, S. Oganyan¹, Sh. Kazaryan¹

¹*Russian-Armenian (Slavonic) University*

¹*Department of Medical Biochemistry and Biotechnology*

¹*Institute of Biomedicine and Pharmacy*

ABSTRACT

One of the top 10 global risks identified by the World Health Organization (WHO) was antimicrobial resistance (AMR), also known as the “silent pandemic”. This threat is significant for the global health system and poses a serious threat to public health worldwide. According to WHO projections, mortality due to antibiotic resistance (AMR) may reach 10 mil-

lion cases per year in the near future. This highlights the need for continuous research and development of new strategies to control and prevent the spread of AMR bacteria.

Despite the increasing number of antibacterial agents in clinical development, there is an urgent need for new innovative agents to treat severe infections, as well as to replace those that have lost their effectiveness due to widespread use. In this context, the problem lies not only in the limited number of antibacterial drugs in development, but also in the insufficient degree of innovation of existing approaches. Of the 32 antibiotics in development for the treatment of infections caused by bacteria (listed as priority bacterial pathogens (PBPs)), only 12 can be classified as innovative. Of greatest concern are the group of pathogens classified as critical risk PBPs, compared to pathogens classified as “high” and “medium” priority. Unconventional biological agents are increasingly being explored as complements or replacements to traditional antibiotics. Nanotechnology can help develop, improve and address this issue. The study and regulation of the use of unconventional biological agents require a systematic and stepwise approach that supports research and assesses their efficacy and safety. In order to combat infections caused by AMR, innovative methods and therapeutic strategies must be implemented to ensure high treatment efficacy. A multidisciplinary and integrated approach, known as the “One Health” concept, is needed to counter these threats. Particular attention should be paid to improving medical educational programs by integrating the principles of the One Health concept into them.

In this review, we present the latest advances in the study of key molecular mechanisms underlying AMR, which are used by bacteria and other microorganisms in the fight against antimicrobials, in order to emphasize the need and importance of developing approaches and monitoring mechanisms in accordance with this concept.

Keywords: Antimicrobial resistance, multidrug resistance, molecular mechanisms of resistance, non-traditional methods of combating AMR.

DOI 10.24412/1829-0450-fm-2024-2-80-93
УДК 575.112

Поступила: 05.11.2024г.
Сдана на рецензию: 05.11.2024г.
Подписана к печати: 12.11.2024г.

“DE NOVO”-ДИЗАЙН ПЕПТИДОВ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МОДУЛЯТОРОВ БЕЛКА 14-3-3

А. Паронян^{1,2}

¹*Российско-Армянский (Славянский) университет*

²*Институт молекулярной биологии НАН РА*

ORCID:0009-0005-9315-6606

adrine.paronyan@rau.am

АННОТАЦИЯ

А данной статье говорится о том, что белок-белковые взаимодействия являются ключевыми факторами во множестве клеточных процессов, включая передачу сигналов, экспрессию генов, иммунный ответ, апоптоз и в других важных клеточных процессах. На сегодняшний день было обнаружено, что более полумиллиона нарушений регуляции ББВ связаны с патологическими процессами. Пептиды стали многообещающими модуляторами ББВ благодаря их способности избирательно связываться со специфическими областями белков. В данном исследовании в качестве мишени был выбран белок 14-3-3ε, являющийся адапторным белком, который участвует в передаче клеточных сигналов, регуляции развития клеточного цикла, нейродегенеративных процессах, апоптозе, канцерогенезе, аутофагии, а также в процессе репликации вирусов [1]. Был осуществлен “de novo”-дизайн 34 пептидов (длиной 7–40 аминокислотных остатка) для белка 14-3-3ε, используя в качестве сайта связывания аминокислотные остатки, которые являются ключевыми для взаимодействия белка 14-3-3 с фосфорилированными белками партнерами. Использование коротких пептидов в качестве модуляторов является актуальным методом дизайна потенциальных терапевтических препаратов благодаря их относительно высокой специфичности, стабильности и низкой токсичности.

Ключевые слова: моделирование пептидов, *in silico*, AfDesign, молекулярная динамика, белок-белковые взаимодействия.

Введение

Белок-белковые взаимодействия связаны с различными биологическими процессами – такими, как передача сигналов и метаболизм, и играют фундаментальную роль во многих клеточных процессах. По данным на 2024г., было идентифицировано более 810 000 белок-белковых взаимодействий (ББВ) человека [2]. На данный момент уже имеются разработанные несколько успешные низкомолекулярные препараты, где мишенью является именно ББВ, в

том числе одобренный FDA-венетоклакс, являющимся противоопухолевым средством [3].

Исходя из исследований принято выделять физико-химические свойства лекарств-мишеней, нацеленные на белок-белковые взаимодействия, которые значительно отличаются от свойств обычных лекарств-мишеней, и поиск лекарств, нацеленных на ББВ, имеет ряд сопутствующих проблем. Сайты связывания малых молекул расположены относительно глубоко и имеют площадь всего около 500Å, в то время, как интерфейсы связывания белок-белковых взаимодействий обычно плоские и широкие, с площадью поверхности примерно 1000–4000Å, то есть низкомолекулярные препараты связываются с глубокими складчатыми карманами белков, а не с большой, но плоской и в то же время гидрофобной поверхностью связывания ББВ [45].

Исследования терапевтических пептидов начались с естественных человеческих гормонов – таких, как инсулин, вазопрессин, окситоцин и гонадотропин-высвобождающий гормон. На сегодняшний день одобрено около 80 пептидных препаратов, из них примерно 30 неинсулиновых пептидных препарата одобрены с 2000 года. Более 170 пептидов находятся в стадии клинической разработки [6].

Длина пептидов может варьироваться от нескольких до сотен аминокислот, но большинство пептидов, используемых для модулирования ББВ, имеют длину от 7 до 40 аминокислот. По данным FDA, в качестве потенциального терапевтического средства допустимой длины для пептида считаются в диапазоне 20–40 [7], но имеются также данные, когда рассматривают короткие пептиды длиной 7–17 [8].

Белки 14-3-3 представляют собой экспрессируемые адаптерные белки, которые взаимодействуют с большим количеством белков, в частности, чтобы регулировать их клеточную локализацию и функции [9]. Белки 14-3-3 представлены 7 изоформами: бета (β), эpsilon (ε), эта (η), гамма (γ), тау (τ), сигма (σ) и дзета (ζ), каждая из которых кодируется отдельным геном [10].

Изоформа 14-3-3ε является наиболее консервативным членом семейства 14-3-3, чья аномальная экспрессия была обнаружена при некоторых типах рака. 14-3-3ε сильно экспрессируется в головном мозге и взаимодействует с множеством белков, которые могут играть критическую роль, включая передачу нейронных сигналов, развитие нейронов и, общепризнано, что 14-3-3ε связан с множеством неврологических заболеваний [11]. На Рис. 1 представлены взаимодействующие с 14-3-3ε белки.

Для моделирования структуры белка 14-3-3ε был использован алгоритм “AlphaFold” [12] и была получена структура мономера, которая была сравнена с структурой из базы данных PDB (<https://www.rcsb.org/>) с использованием программы “PyMol”, которая также была использована для визуализации структур [13].

Для расчета физическо-химических свойств пептидов был использован онлайн-сервер “PepDraw” (<https://www.pepdraw.com/>), который дает возможность предсказать свойства биомолекул, исходя из аминокислотной последовательности [14]. Предсказание токсичности является одним из параметров при рассмотрении допустимости лекарственных препаратов, что было рассчитано с помощью ToxinPred 3.0 [15].

МД-моделирование проводилось с использованием программного пакета “Amber20”, реализованного в графическом процессоре (GPU) с использованием силового поля ff19SB18. Все исходные структуры и полученные модели белка и пептида были сольватированы в усеченном октаэдрическом боксе с моделью воды TIP3P и ионами Na⁺, Cl⁻ при концентрации 150мМ. Для моделирования МД выбранное время шага составляло 2фс. Общее время МД-моделирования составило 10нс с температурой 309,75К и давлением в 1бар [16]. Анализ RMSD проводился для каждого моделирования МД с использованием программы CPPTRAJ из программного пакета “AmberTools” [17]. Для каждой системы моделирования МД были рассчитаны свободные энергии взаимодействия с использованием метода Пуассона-Больцмана или обобщенного метода Борна (ММ/PBSA и ММ/GBSA) с помощью программы MMPBSA.py из пакета “AmberTools” [18].

Результаты

В качестве модели белка была взята ранее нами полученная полноразмерная третичная модель 14-3-3ε, полученная с помощью “AlphaFold,” которая представлена на Рис. 2, где отмечены важные для взаимодействия с другими фосфорилированными белками аминокислоты.

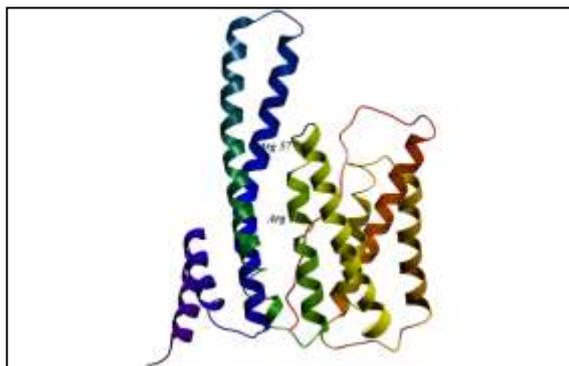


Рисунок 2. Полноразмерная третичная структура 14-3-3ε.

В данном исследовании мы смоделировали структуру мономера, т.к. для использования “AfDesign” в качестве целевого белка при дизайне пептидов допустимо использовать лишь мономерную структуру. Учитывая наличие в базе данных PDB структуры, полученной с помощью X-RAY 8Q1S, мы сравнили полученную нами и данную структуру. 8Q1S представлен димером с ионами Br, Na, а также пептидом и GATA домен цинкового пальчика. Белок 14-3-3 относительно невелик и имеет длину в 255 аминокислотных остатка, но содержит в себе неструктурированные регионы, из-за чего даже данная структура не считается полной, в отличие от нашей смоделированной. На Рис. 3 приведено сравнение 8Q1S и полученной нами мономером 14-3-3ε. Структуры были суперимпозированы и выделен неструктурированный регион, который в 8Q1S отсутствует. С помощью PyMol был сделан сравнительный анализ данных двух структур, в ходе которого RMSD составило 0.636Å.

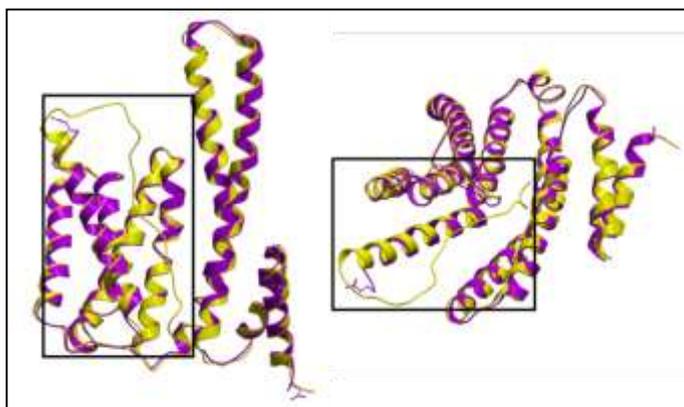
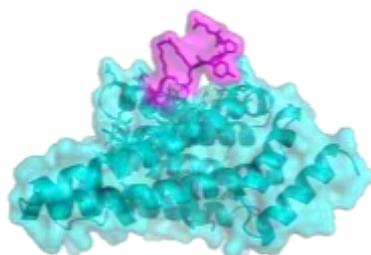


Рисунок 3. структура 8q1s представлена фиолетовым, смоделированная нами структура представлена желтым. выделенная область является неструктурированным регионом.

На Рис. 4 указаны полученные данные после генерации “AfDesign” пептида на примере длины в 7 аминокислотных остатка, остальные полученные структуры представлены в дополнительных материалах (Табл. 1).



А.

Последовательность:

EPYRCKI

Масса: 907.4572

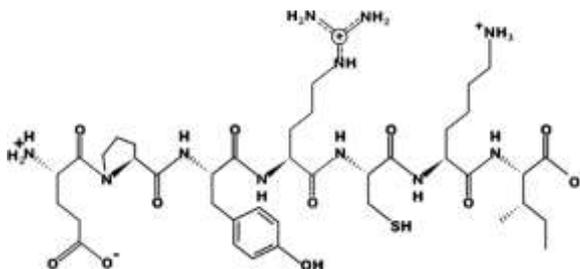
Изоэлектрическая точка(pI):

8.80

Заряд: +1

Гидрофобность: +14.43

Kcal*mol⁻¹



Б.

Рисунок 4. А: взаимодействие 14-3-3 с пептидом длиной 7 а.о.,
Б: структура пептида и его свойства.

В качестве физико-химических свойств пептидов были рассмотрены масса, изоэлектрическая точка, заряд и гидрофобность, полученные с помощью онлайн-ресурса “PerDraw”. Масса влияет на биодоступность и на то, насколько легко пептид может проникать в ткани или мембраны. Изоэлектрическая точка (pI), в свою очередь, влияет на растворимость пептида и взаимодействие с белком при различных уровнях pH [19]. Суммарный заряд имеет решающее значение для связывающей способности, поскольку влияет на электростатические взаимодействия с отрицательно заряженной поверхностью белка 14-3-3 [20]. Гидрофобность же определяет способность пептида взаимодействовать с гидрофобными карманами в 14-3-3, влияя на прочность связывания и специфичность [21]. Такие физико-химические параметры различий в массе, pI, заряде и гидрофобности в значительной степени влияют на поведение и биологические функции, проявляемые пептидами. В то время, как масса увеличивается примерно от 900Да для пептидов с 7 остатками до более чем 4700Да для пептидов с 40 остатками, структурная сложность и стабильность пептидов, соответственно, увеличиваются. Из этого следует, что короткие пептиды будут более гибкими, динамичными, подходящими для быстрых взаимодействий и сигнализации, тогда как более длинные пептиды будут строить более стабильные структуры, лучше подходящие для более сложной белок-белковой модуляции. Самое главное, что различные pI, варьирующиеся от 2,81 до 9,97, также применимы, причем более кислые пептиды с более низкими значениями pI имеют тенденцию связываться с положительно заряженными областями белков, а более основные пептиды с более высокими значениями pI нацелены на отрицательно заряженные области. Аналогично, заряд пептидов, между -6 и +4, влияет на их специфические взаимодействия. Положительно заряженные пептиды гораздо более склонны взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами – такими, как ДНК, клеточные мембраны и кислотные области белка, в то время, как отри-

цательно заряженные пептиды взаимодействуют с основными доменами белков, которые, в свою очередь, принимают участие в воздействии на клеточные пути и белковые комплексы. Аналогично, гидрофобность, которая находится в диапазоне от +10,30 до +59,40 ккал/моль, определяет взаимодействие пептида с гидрофобной средой. Таким образом, более низкая гидрофобность будет соответствовать предпочтению водной среды – такой, как цитозоль, в то время, как более высокая гидрофобность будет предполагать сродство либо к липидным мембранам, либо к гидрофобным белковым карманам, взаимодействующим решающим образом в стабилизации белковых комплексов. Таким образом, эти два параметра вместе дают основу для проектирования пептидов со специфическим взаимодействием и биологической функцией.

Результаты из сервера “ToxinPred” показали, что 21 из 34 пептидов являются нетоксичными. В ходе данного анализа были получены такие показатели, как гибридная оценка и PPV. Гибридной оценкой считается суммарная оценка ML и MERCI, где ML является оценкой, полученная с помощью модели машинного обучения и указывающая на вероятность токсичности, а MERCI+/- – это показатель токсичных и нетоксичных мотивов. Если гибридная оценка высока, это приводит к прогнозу токсичному, если низка и стремится к 0, то пептид считается нетоксичным. PPV представляет собой положительную прогностическую ценность, указывающую на уровень достоверности. Ниже представлен график, на котором указаны оба значения токсичности, а в дополнительных материалах представлена таблица результатов с значениями MERCI+/-, ML и прогноз токсичности.



График 1. Оценки токсичности пептидов.

На Графике 1 отображаются два основных значения для каждой последовательности пептида: гибридная оценка и положительная прогностическая ценность PPV. Гибридная оценка и PPV, в целом, имеют схожую тенденцию, указывая на то, что более высокая гибридная оценка коррелирует с более высоким PPV, что отражает достоверность в прогнозировании токсичности пептида. Однако есть точки, где PPV значительно ниже гибридной оценки, что указывает на расхождения, где уверенность может быть слабее, несмотря на относительно высокую гибридную оценку.

Для валидации и стабилизации комплексов белка-пептид необходимо проведение молекулярной динамики: в данном случае нами была проведена динамика с использованием программного пакета “Amber” [22]. “Amber” позволяет проводить моделирование динамики взаимодействия между белками и лигандами на атомном уровне, моделируя естественные флуктуации и конформационные изменения как в белке, так и в пептиде. “Amber” помогает понять, как эти молекулы взаимодействуют с течением времени, предоставляя информацию о стабильности и связывающей способности комплекса. Силовые поля “Amber” позволяют точно минимизировать энергию комплекса белок-пептид.

Исходя из того, что структура исследованного белка сравнительно мала (255 аминокислотных остатка) и является консервативной, мы провели симуляцию в 10нс, с шагом моделирования в 2фс. Ниже на Рис. 5 представлен график RMSD на протяжении всей динамики для структуры комплекса белок-пептид длиной в 7 аминокислотных остатка (остальные представлены в дополнительных материалах «Графики моделирования комплексов 14-3-3ε-пептид»):

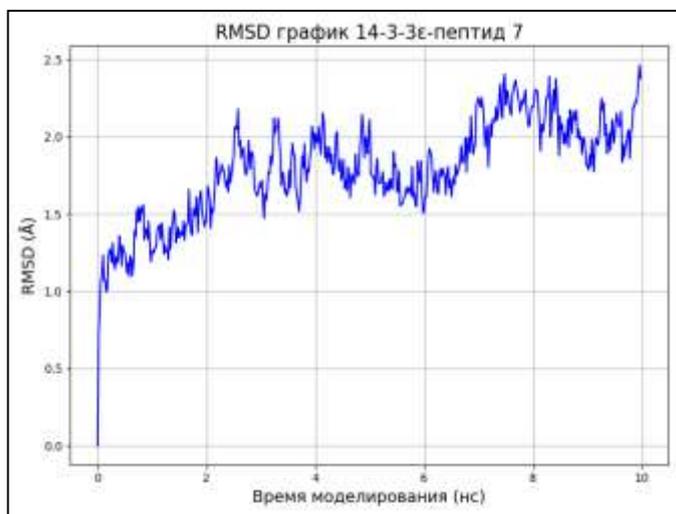


Рисунок 5. RMSD график на протяжении динамики 10 нс.

Среднеквадратичное отклонение (RMSD) – ключевой показатель, используемый в моделировании молекулярной динамики для оценки стабильности и конформационных изменений молекулярной системы – такой, как комплекс белок-пептид с течением времени. В большинстве случаев моделирования МД колебания RMSD в пределах 1–3 Å считаются приемлемыми для стабильного комплекса белок-пептид, поскольку белки естественным образом претерпевают незначительные конформационные изменения [23]. Большинство пептидов демонстрируют начальную фазу уравнивания в течение первых 2 наносекунд, после чего они достигают относительно стабильных конформаций, при этом значения RMSD стабилизируются между от 1 до 2,5Å. Такие пептиды, как 8, 19, 20, 38 и 40, демонстрируют стабильные взаимодействия, сохраняя низкие колебания на протяжении всего моделирования, что указывает на сильную аффинность связывания. И только пептиды 13, 17, 34 и 37, в свою очередь, показывают большие флуктуации, при котором колебания RMSD достигают более 3Å, что указывает на более слабые взаимодействия.

Одной из ключевых особенностей Amber является его способность рассчитывать свободные энергии связывания с использованием таких методов, как MMPBSA (площадь поверхности Пуассона-Больцмана в молекулярной механике) или MMGBSA (площадь поверхности обобщенного Борна в молекулярной механике). Эти расчеты имеют важное значение для количественной оценки прочности и стабильности взаимодействия белок-пептид [24].

Таблица 1. Результаты MMPBSA/MMGBSA для каждого комплекса.

Комплекс 14-3-3ε-пептид (длина)	MMPBSA (kcal/mol)	MMGBSA (kcal/mol)
14-3-3ε-пептид 7	-10.3213	-5.9568
14-3-3ε-пептид 8	-4.3575	-5.7163
14-3-3ε-пептид 9	-1.4736	-6.7473
14-3-3ε-пептид 10	-5.0154	-5.9435
14-3-3ε-пептид 11	-21.1005	-18.9734
14-3-3ε-пептид 12	-3.7284	-4.1877
14-3-3ε-пептид 13	-3.9838	-1.6552
14-3-3ε-пептид 14	-0.9630	4.4171
14-3-3ε-пептид 15	-5.5486	-8.2827
14-3-3ε-пептид 16	-10.9533	-7.4790
14-3-3ε-пептид 17	-11.7870	-10.1628
14-3-3ε-пептид 18	-10.2906	-8.2749

Комплекс 14-3-3ε-пептид (длина)	MMPBSA (kcal/mol)	MMGBSA (kcal/mol)
14-3-3ε-пептид 19	-9.3739	-5.5714
14-3-3ε-пептид 20	-4.2549	-2.3515
14-3-3ε-пептид 21	-5.8388	-4.5992
14-3-3ε-пептид 22	-5.4214	-4.0404
14-3-3ε-пептид 23	-2.1478	-0.5267
14-3-3ε-пептид 24	-12.1188	-8.7375
14-3-3ε-пептид 25	-3.4666	-0.0552
14-3-3ε-пептид 26	3.0371	0.1930
14-3-3ε-пептид 27	-2.4002	1.0102
14-3-3ε-пептид 28	-6.8601	-5.6742
14-3-3ε-пептид 29	-3.6436	0.9972
14-3-3ε-пептид 30	19.9762	0.1980
14-3-3ε-пептид 31	-4.6705	28.5443
14-3-3ε-пептид 32	-9.2596	-4.2048
14-3-3ε-пептид 33	-9.5092	-5.1997
14-3-3ε-пептид 34	-9.6045	-3.9378
14-3-3ε-пептид 35	-3.9703	-3.0285
14-3-3ε-пептид 36	-12.6249	-8.7378
14-3-3ε-пептид 37	-5.1356	-7.4235
14-3-3ε-пептид 38	-2.4462	0.4265
14-3-3ε-пептид 39	-12.3693	-10.5952
14-3-3ε-пептид 40	-3.4824	-3.8202

Исходя из Табл. 1 можно сделать вывод, что пептиды 11 (-21,1005 ккал/моль при MMPBSA и -18,9734 ккал/моль при MMGBSA), 16 (-10,9533 ккал/моль и -7,4790 ккал/моль) и 17 (-11,7870 ккал/моль при MMPBSA и -10,1628 ккал/моль при MMGBSA) демонстрируют самое сильное связывающее сродство, что указывает на то, что эти пептиды образуют стабильные комплексы с белком 14-3-3ε. Некоторые пептиды – такие, как 26 (3,0371 ккал/моль при MMPBSA и 0,1930 ккал/моль при MMGBSA) и 30 (19,9762 ккал/моль при MMPBSA и 0,1980 ккал/моль при MMGBSA), демонстрируют положительные энергии связывания, что указывает на дестабилизированные взаимодействия с белком 14-3-3ε. Также в некоторых случаях, например, для пептидов 31 и 38, существуют значительные различия между результатами

ММРBSA и ММGBSA. Это расхождение может быть связано с разными подходами к расчету энергий сольватации в ММРBSA (с использованием подхода Пуассона-Больцмана) и ММGBSA (с использованием обобщенного подхода Борна), что может повлиять на точность для конкретных пептидов. В целом, результаты показывают, что пептиды 11, 16 и 17 являются наиболее перспективными кандидатами на сильные и стабильные взаимодействия с 14-3-3ε, в то время, как некоторые пептиды демонстрируют более слабые или даже дестабилизирующие взаимодействия, что может быть полезно для понимания специфики взаимодействий пептид-белок в этой системе.

Заключение

В данном исследовании мы успешно продемонстрировали “de novo”-дизайн коротких пептидов как потенциальных модуляторов для белка 14-3-3ε, ключевого адаптера, участвующего во множестве клеточных процессах – таких, как клеточная сигнализация, апоптоз и нейродегенерация. Используя передовые вычислительные инструменты – такие, как “AlphaFold2” для моделирования белков и “AfDesign” для дизайна пептидов, было смоделировано 34 пептида, каждый длиной 7–40 аминокислот, нацеленных на консервативные сайты взаимодействия 14-3-3ε. Моделирование показало, что разработанные пептиды могут избирательно связываться с этими критическими сайтами, тем самым подчеркивая их потенциал в качестве терапевтических агентов с высокой специфичностью и низкой токсичностью.

В ходе симуляции молекулярной динамики анализ значений RMSD показал, что большинство комплексов стабилизировались, что указывает на сильные взаимодействия для нескольких пептидов, в частности, пептидов 11, 16 и 17, которые продемонстрировали самые сильные связывающие свойства. Анализы ММРBSA и ММGBSA дополнительно подтвердили стабильность этих взаимодействий.

Подытожив все мы пришли к выводу, что использование компьютерного дизайна пептидов и моделирования молекулярной динамики предоставило ценную информацию о взаимодействиях между короткими пептидами и белком 14-3-3ε, которые потенциально могут выступать в качестве модуляторов, нацеленных на белок-белковые взаимодействия. Дальнейшая работа должна быть сосредоточена на проведении докиннг-анализа на структуре комплексов 14-3-3 с таргетными взаимодействующими белками.

Ссылка на дополнительные материалы: <https://docs.google.com/document/d/1gtPOtzRi8NrYvT4SsbLO8aC5QRZAFT8y/edit?usp=sharing&oid=100378967411728914890&rtpof=true&sd=true>

ЛИТЕРАТУРА

1. Fu H., Subramanian R. and Masters S. (2000). 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40 617–47.

2. Oughtred R., Rust J., Chang C., Breitkreutz B., Stark C., Willems A., Boucher L., Leung G., Kolas N., Zhang F., Dolma S., Coulombe-Huntington J., Chatri-aryamontri A., Dolinski K. and Tyers M. (2021). The BIOGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions *Protein Science* 30 187–200.
3. Souers A., Levenson J., Boghaert E., Ackler S., Catron N.D., Chen J., Dayton B., Ding H, Enschede S., Fairbrother W., Huang D., Hymowitz S., Jin S., Khaw S., Kovar P., Lam L., Lee J., Maecker H., Marsh K., Mason K., Mitten M., Nimmer P., Oleksijew A., Park C., Park C.-M., Phillips D., Roberts A., Sampath D., Seymour J., Smith M., Sullivan G., Tahir S., Tse C., Wendt M., Xiao Y., Xue J., Zhang H., Humerickhouse R., Rosenberg S. and Elmore S. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets *Nat Med* 19 202–8.
4. Kosugi T. and Ohue M. (2022). Solubility-Aware Protein Binding Peptide Design Using AlphaFold *Biomedicines* 10, 1626.
5. Wells J. and McClendon C. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein–protein interfaces *Nature* 450 1001–9.
6. Wang L., Wang, N., Zhang W. *et al.* Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Sig Transduct Target Ther* 7, 48 (2022): <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>
7. Cabri W., Cantelmi P., Corbisiero D., Fantoni T, Ferrazzano L., Martelli G., Mattellone A. and Tolomelli A. (2021). Therapeutic Peptides Targeting PPI in Clinical Development: Overview, Mechanism of Action and Perspectives *Front. Mol. Biosci.* 8 697586.
8. Wang X., Ni D., Liu Y. and Lu S. (2021). Rational Design of Peptide-Based Inhibitors Disrupting Protein-Protein Interactions. *Front. Chem.* 9:682675. DOI: 10.3389/fchem.2021.682675.
9. Obsil T. and Obsilova V. (2011). Structural basis of 14-3-3 protein functions *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22 663–72.
10. Yang X., Lee W., Sobott F., Papagrigoiriou E., Robinson C., Grossmann J., Sundström M., Doyle D. and Elkins J. (2006). Structural basis for protein–protein interactions in the 14-3-3 protein family *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 17237–42.
11. Yin S.-J., Lee J.-R., Kwak H., Lee B.-N., Han J.-W., Hahn M.-J., Park Y.-D. and Yang J.-M. (2020). Functional study of 14-3-3 protein epsilon (YWHAE) in keratinocytes: microarray integrating bioinformatics approaches *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 38 2633–49.
12. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S., Ballard A., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A., Kavukcuoglu K., Kohli P. and Hassabis D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold *Nature* 596 583–9.
13. Schrödinger L., & DeLano W. (2020). PyMOL. Retrieved from <http://www.pymol.org/pymol>.
14. Villaró-Cos S. and Lafarga T. (2023). Online tools to support teaching and training activities in chemical engineering: enzymatic proteolysis *Front. Educ.* 8 1290287.
15. Rathore A., Choudhury S., Arora A., Tijare P. and Raghava G. (2024). ToxinPred 3.0: An improved method for predicting the toxicity of peptides *Computers in Biology and Medicine* 179 108926.

16. Wang J., Wolf R., Caldwell J., Kollman P. and Case D. (2004). Development and testing of a general amber force field *J Comput Chem* 25 1157–74.
17. Roe D. and Cheatham T. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data *J. Chem. Theory Comput.* 9 3084–95
18. Case D., Aktulga H., Belfon K., Ben-Shalom I., Berryman J., Brozell S., Cerutti D., Cheatham T, III, Cisneros G., Cruzeiro V., Darden T., Forouzesh N., Giambasu G., Giese T., Gilson M., Gohlke H., Goetz A., Harris J., Izadi S., Izmailov S., Kasavajhala K., Kaymak M., King E., Kovalenko A., Kurtzman T., Lee T., Li P., Lin C., Liu J., Luchko T., Luo R., Machado M., Man V., Manathunga M., Merz K., Miao Y., Mikhailovskii O., Monard G., Nguyen H., O’Hearn K., Onufriev A., Pan F., Pantano S., Qi R., Rahnamoun A., Roe D., Roitberg A., Sagui C., Schott-Verdugo S., Shajan A., Shen J., Simmerling C., Skrynnikov N., Smith J., Swails J., Walker R., Wang J., Wang J., Wei H., Wu X., Wu Y., Xiong Y., Xue Y., York D., Zhao S., Zhu Q. and Kollman P. (2023). Amber 2023, University of California, San Francisco.
19. Audain E., Ramos Y., Hermjakob H., Flower D. and Perez-Riverol Y. (2016). Accurate estimation of isoelectric point of protein and peptide based on amino acid sequences *Bioinformatics* 32 821–7.
20. Jiang Z., Vasil A., Hale J., Hancock R., Vasil M. and Hodges R. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides *Biopolymers* 90 369–83.
21. Kovacs J., Mant C. and Hodges R. (2006). Determination of intrinsic hydrophilicity/hydrophobicity of amino acid side chains in peptides in the absence of nearest-neighbor or conformational effects *Biopolymers* 84 283–97.
22. Case D., Ben-Shalom I., Brozell S., Cerutti D., Cheatham T.III, Cruzeiro V., Darden T., Duke R., Ghoreishi D. and Gilson M. (2018). “AMBER 2018”. University of California, San Francisco.
23. Maruyama Y., Igarashi R., Ushiku Y. and Mitsutake A. (2023). Analysis of Protein Folding Simulation with Moving Root Mean Square Deviation *J. Chem. Inf. Model.* 63 1529–41.
24. Zhang X., Perez-Sanchez H. and Lightstone C. (2017).

“DE NOVO” DESIGN OF PEPTIDES AS POTENTIAL MODULATORS FOR 14-3-3 PROTEIN

A. Paronyan^{1,2}

¹Russian-Armenian (Slavonic) University

²Institute of Molecular Biology NAS RA

ABSTRACT

Protein-protein interactions (PPIs) are key factors in various cellular processes, including signal transduction, gene expression, immune response, apoptosis, and other critical cellular mechanisms. To date, over half a million dysregulated PPIs have been identified in association with pathological processes. Peptides have emerged as promising PPI modulators due to their ability to selectively bind to specific protein regions. In this study, the target was the 14-3-3 ϵ protein, an adaptor protein involved in cellular signaling, cell cycle development regulation, neurodegenerative processes, apoptosis, carcinogenesis, autophagy, and viral replication [1]. A “de novo” design of 34 peptides (ranging from 7 to 40 amino acid resi-

dues) was carried out for the 14-3-3 ϵ protein, utilizing binding sites involving amino acid residues essential for the interaction of 14-3-3 with phosphorylated protein partners. The use of short peptides as modulators represents a relevant design method for potential therapeutic agents due to their relatively high specificity, stability, and low toxicity.

Keywords: peptide modeling, *in silico*, AfDesign, molecular dynamics, protein-protein interactions.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Амбарцумян Е.Р. – аспирантка четвертого года обучения по специальности «Биохимия» Российско-Армянского университета

Варданян Э.А. – аспирант 3-го года обучения кафедры математики и математического моделирования Российско-Армянского университета

Казарян Ш.А. – к.б.н., старший преподаватель кафедры медицинской биохимии и биотехнологии Российско-Армянского университета

Карибян Я.А. – аспирантка третьего года обучения по специальности «Органическая химия» Российско-Армянского университета

Манукян А.А. – младший научный сотрудник научной группы ИКАР Института биомедицины и фармации Российско-Армянского университета

Мхитарян Н.Н. – младший сотрудник лаборатории новых материалов для квантовой электроники и интегральной оптики Армянского государственного педагогического университета им. Х. Абовяна

Оганесян А.А. – к.б.н., доцент, заведующая кафедрой медицинской биохимии и биотехнологии Российско-Армянского университета

Оганян С.А. – аспирантка первого года обучения по специальности «Биохимия» Российско-Армянского университета

Паронян А.К. – аспирантка по специальности «Математическая биология, биоинформатика» Российско-Армянского университета

Рушанян А.Ф. – аспирант Национального политехнического университета Армении

Тирацуюн С.Г. – к.б.н., доцент кафедры биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии

**ВЕСТНИК РОССИЙСКО-АРМЯНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА.
СЕРИЯ: ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКИЕ И ЕСТЕСТВЕННЫЕ
НАУКИ, №2/2024г.**

**VESTNIK OF RUSSIAN-ARMENIAN UNIVERSITY. SERIES:
PHYSICAL MATHEMATICAL AND NATURAL SCIENCES,
No. 2/2024.**

*Главный редактор РНИ – М.Э. Авакян
Специалист РНИ – А.С. Есяян
Компьютерная верстка – А.С. Бжикян*

*Editor-in-Chief of the EOSP – M.E. Avakyan
EOSP specialist – A.S. Yesayan
Computer layout – A.S. Bzhikyan*

Адрес Редакции научных изданий
Российско-Армянского университета:
0051, г. Ереван, ул. Овсепя Эмина, 123
тел./факс: (+374 12) 77-57-75 (внутр. 392)
e-mail maria.avakian@rau.am

Address of the Editorial Board of Scientific
Publications of the Russian-Armenian University:
0051, Yerevan, st. Hovsep Emin, 123
tel./fax: (+374 12) 77-57-75 (ext. 392)
e-mail: maria.avakian@rau.am

Заказ № 1

Подписано к печати 26.12.2024г.
Формат 70x100¹/₁₆. Бумага офсетная № 1.
Объем 5.8 усл. п.л. Тираж 100 экз.

Order No. 1

Signed for publication on December 26, 2024
Format 70x100¹/₁₆. Offset paper No. 1.
Volume 5.8 conv. p.l. Circulation 100 copies