



УДК 53.06; 616-07; 535.3

## ДЕТЕКТИРОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ АЛЬБУМИНА ПРИ ЕГО ГЛИКИРОВАНИИ И ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ МЕТОДАМИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ



Н. Р. Ровнягина, Т. Н. Тихонова, Д. С. Молоденский, Е. А. Ширшин

Ровнягина Наталия Романовна, аспирант кафедры квантовой электроники, сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, n.rovnyagina2015@yandex.ru

Тихонова Татьяна Николаевна, кандидат физико-математических наук, младший научный сотрудник, Международный лазерный центр, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, tikhonova@physics.msu.ru

Дмитрий Сергеевич Молоденский, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», d.s.molodenskiy@yandex.ru

Ширшин Евгений Александрович, кандидат физико-математических наук, младший научный сотрудник кафедры квантовой электроники, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, shirshin@lid.phyd.msu.ru

**Объект исследования.** Растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА) и его агрегаты. **Цель работы.** Исследование структурных изменений молекул альбумина с помощью оптических и рентгеновских методик при их гликировании и термической денатурации, во время которых белок проходит через схожие интермедиаты. Исследование проведено для раствора БСА при pH 3 и pH 7.4. **Использованные методы и подходы.** Метод стационарной и время-разрешенной флуоресцентной спектроскопии, а также метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). **Основные результаты.** Показано, что положение максимума и время затухания триптофановой флуоресценции чувствительны к конформационным перестройкам белка при инкубации при 65°C при pH 7.4. Обнаружено, что при гликировании значительным образом растет доступность гидрофобных сайтов связывания зонда Нильский красный. В результате термической денатурации БСА при pH 3 изменений вышеуказанных параметров не наблюдалось, однако методом МУРР для данной системы была обнаружена агрегация белка уже при температуре 25°C. Дальнейшая инкубация образца при температуре 65°C не приводит к изменению параметров окружения триптофановых остатков в белке и появлению/увеличению доступности гидрофобных сайтов связывания. Показано, что, несмотря на схожие промежуточные состояния, которые проходят рассматриваемые системы, структурные перестройки белка различны для гликированного и термически денатурированного/агрегированного альбумина.

**Ключевые слова:** гликирование, альбумин, термическая денатурация, конформация, расплавленная глобула, флуоресцентный зонд Нильский красный, тиофлавин Т, конечные

продукты гликирования,  $\pi$ -stacking, фибриллы, патологические состояния, социально значимые заболевания, флуоресцентная спектроскопия, малоугловое рентгеновское рассеяние.

DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-179-190

### Введение

Гликирование белков, в частности, основного транспортного белка плазмы крови – альбумина, является одним из центральных эффектов, лежащих в основе цепочки взаимосвязанных молекулярных процессов, сопутствующих различным социально значимым заболеваниям [1–3]. Функциональные свойства альбумина зависят от его конформации, нарушение которой может привести к потере им транспортных свойств [4]. В процессе гликирования происходит образование комплексов между свободными аминокетильными группами белка и глюкозой, при этом формируются конечные продукты гликирования. Данный процесс сопровождается необратимой структурной перестройкой молекулы, что также может изменить функции белков [5]. В организме здоровых людей скорость данной реакции настолько мала, что её продукты успевают удаляться. Однако при больших концентрациях глюкозы у больных диабетом реакция значительно ускоряется, продукты накапливаются и способны вызвать многочисленные нарушения функциональных свойств органов и тканей [6]. Более того, было показано, что у больных сахарным диабетом уровень гликированного альбумина увеличивается на 6–10% до 20–30% [7].

Наличие конечных продуктов гликирования в организме человека влечет за собой образование сшивков между белками с их последующей агрегацией [8]. В результате данного процесса возможно образование фибриллярных структур [9]. Фибриллы представляют собой нитевидные белковые агрегаты с продольными характерными размерами от сотен нанометров до микрометров [10], при этом они могут накапливаться в органах и тканях, приводя к их повреждению или дисфункции [11].



В связи с этим актуальным является исследование биохимических и биофизических процессов, сопутствующих гликированию. С точки зрения биомедицины наиболее интересной задачей является развитие экспрессных методов индикации патологических процессов, связанных с гликированием белков, для диагностики заболевания, в том числе на ранних его стадиях.

Известно, что в результате действия различных внешних факторов может начаться процесс денатурации белков. Например, при значительном изменении pH среды при  $\text{pH} < 2$  и  $\text{pH} > 11$  происходит заметное разворачивание молекулы [12]. Также широко изучена денатурация под действием температуры [13] и в результате связывания молекулы белка с различными ингибиторами [14]. В работе [15] рассматривается вероятность

конформационных перестроек альбумина на всех уровнях структурной организации белка при взаимодействии с поверхностью наноалмазов. Под действием различных внешних факторов с белками может происходить несколько разных процессов, в том числе агрегация [16], влекущая за собой образование токсичных высокомолекулярных структур. Было показано, что формирование фибрилл возможно в результате различных цепочек молекулярных процессов [12, 16, 17]. При этом вторичная структура белков изменяется принципиальным образом: увеличивается содержание  $\beta$ -структур, что является первым шагом для роста упорядоченных агрегатов [18]. Известно, например, что при pH 3 альбумин переходит в состояние расплавленной глобулы (рис. 1).

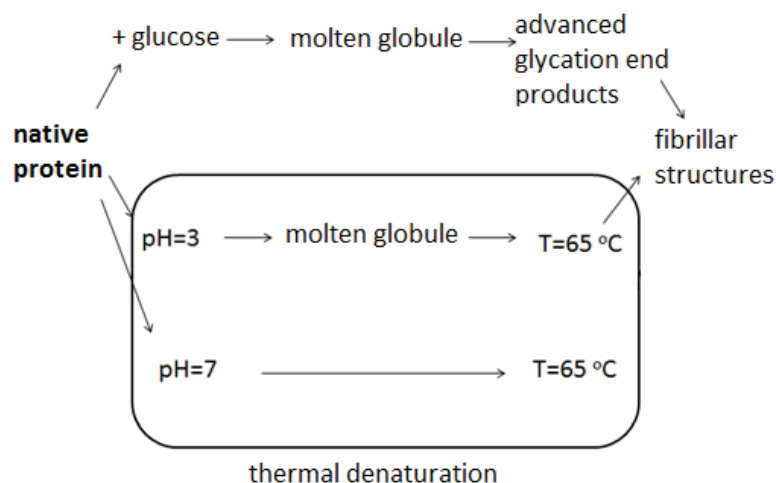


Рис. 1. Схематическое представление образования фибрилл из нативного белка при гликировании и при его термической денатурации

Fig. 1. Scheme of the fibrils formation from native protein during glycation and thermal denaturation

При дальнейшей инкубации альбумина при  $65^\circ\text{C}$  происходит процесс термической денатурации белка (см. рис. 1). Результатом данного процесса является образования фибрилл [19]. В рамках данного исследования была поставлена задача выявить особенности проявления конформационных изменений альбумина при гликировании и его термической денатурации методами флуоресцентной, абсорбционной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния. Данные два процесса (гликирование и термическая денатурация) сравнивались, так как имеют одинаковые стадии конформационных изменений белка (нативный белок, состояние расплавленной глобулы, фибриллы).

В качестве подзадачи ставилось сравнение термической денатурации при pH 3 и при pH 7. Это было сделано для исследования структурных изменений в системах, проходящих различные интермедиаты, и для выявления чувствительности используемых методик при детектировании состояния расплавленной глобулы.

#### Материалы и методы

##### Приготовление образцов

В работе использовались растворимый бычий сывороточный альбумин (БСА, код А1887 в каталоге Sigma, Германия) и глюкоза. Для приготовления растворов применялась бидистиллированная вода.



Образцы для экспериментов по гликированию готовились следующим образом: в буферный раствор Tris-HCl («РЕНАМ», Россия) с pH 7.4 добавлялись белок БСА с концентрацией  $[BSA] = 5 \cdot 10^{-6}$  М и глюкоза с концентрацией  $[Glu] = 50$  мМ. Также готовился образец сравнения без глюкозы. Затем образцы фильтровались с помощью фильтров фирмы Millipore с размером пор 0.2 мкм. Образцы хранились в течение 18 дней в термостате при температуре 37°C. Образцы готовились при pH 7.4.

В работе также использовались флуоресцентный зонд Нильский красный (код 298395 из каталога Sigma, Германия) с концентрацией  $[NR] = 9 \cdot 10^{-7}$  М и флуоресцентный зонд тиофлавин Т (ThT) (код T3516 из каталога Sigma, Германия) с концентрацией  $[ThT] = 2 \cdot 10^{-6}$  М.

Образцы для экспериментов по термической денатурации готовились следующим образом: использовалось два буферных раствора для приготовления образцов с pH 7.4 и 3 – буферный раствор Tris-HCl с концентрацией 50 мМ (pH 7.4) и буферный ацетатный раствор с концентрацией 50 мМ (pH 3) («AppliChem», Германия). В данные буферные растворы добавлялись белок БСА с концентрацией  $[BSA] = 5 \cdot 10^{-6}$  М и зонд Нильский красный с концентрацией  $[NR] = 9 \cdot 10^{-7}$  М. После этого образцы инкубировались при температуре 65°C в течение 24 часов. При этом температура образцов контролировалась термопарой.

#### *Абсорбционная спектроскопия*

Спектры поглощения были получены с помощью спектрофотометра Lambda 25 («Perkin Elmer», США) с возможностью оптических измерений в диапазоне 200–900 нм с разрешением 0.5 нм. Ошибка измерения прибора составляла менее 0.5%. Измерения производились в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см и объемом образца 4 мл при постоянном перемешивании.

#### *Стационарная флуориметрия*

Спектры флуоресценции были получены с использованием спектрофлуориметра FluoroMax-4 фирмы Horiba Jobin-Yvon (Япония) с возможностью флуоресцентных измерений растворов в диапазоне 250–900 нм с разрешением 0.5 нм, источником излучения в данном приборе служит ксеноновая лампа мощностью 150 Вт. Ошибка измерения прибора для одного образца составляла менее 0.5%. Измерения производились в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см и объемом образца 4 мл при постоянном перемешивании.

#### *Время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия*

Для измерения кинетики затухания флуоресценции исследуемых растворов был использован несерийный флуориметр. Установка состояла из 16-канального мульти-анодного ФЭУ (PML-16, «Becker & Hickl», Берлин, Германия). Полихроматор был оснащен решеткой с разрешением 600 делений/мм, таким образом спектральная ширина детектируемой полосы составляла 200 нм (разрешение 12.5 нм/канал).

В качестве источника излучения использовался импульсный светодиод («Edinburgh Instruments», UK) с длительностью импульсов 700 пс, средней мощностью 0.8 мкВт, частотой повторения импульсов 10 МГц. Сбор данных для всех время-разрешенных флуоресцентных измерений белка проводился в течение 30 с, чтобы получить оптимальный сигнал для процедуры деконволюции. Кривые затухания триптофановой флуоресценции белка были получены с использованием канала, соответствующего длине волны 355 нм.

Кинетика затухания флуоресценции бычьего альбумина описывалась биэкспоненциальным законом:

$$F(t) = \sum_i a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (1)$$

где  $a_i$  – предэкспоненциальный коэффициент, определяющий относительный вклад в кривую затухания компоненты с временем затухания  $\tau_i$ , для которого верно соотношение

$$\sum_i a_i = 1. \quad (2)$$

Среднее время жизни возбужденной молекулы определяется выражением

$$\langle \tau \rangle = \sum_i a_i \tau_i. \quad (3)$$

Наличие двух времен жизни связывают с вращательными конформерами триптофана [20, 21].

#### *Метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР)*

В малоугловом эксперименте пучок монохроматического рентгеновского излучения рассеивается после взаимодействия с электронами исследуемого образца. Рассеянная интенсивность как функция вектора рассеяния  $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$ , где  $2\theta$  – угол рассеяния, а  $\lambda$  – длина волны падающего излучения, дает информацию о флуктуациях электронной плотности



в однородной материи. В области малых  $q$  интенсивность рассеяния может быть выражена с помощью аппроксимации Гинье [22]:

$$I(q) \approx I(0)\exp(-q^2 R_g^2/3), \quad (4)$$

где  $R_g$  – радиус инерции взвешенных частиц в приближении монодисперсного раствора. Из (4) видно, что радиус инерции исследуемых частиц может быть определен с помощью построения так называемого графика Гинье ( $\log I(q)$  от  $q^2$ ) и определения угла наклона его линейной части. Важно отметить, что данная аппроксимация применима при выполнении условия  $qR_g \leq 1.3$  [22].

Помимо определения размеров взвешенных в растворе частиц, детальный анализ кривых малоуглового рассеяния позволяет также определять их форму с помощью метода виртуальных атомов [23]. Метод основан на моделировании структуры шариками нужной плотности и определении их пространственных координат с помощью программы минимизации невязки между экспериментальной и теоретической кривыми рассеяния. Теоретическая кривая при этом вычисляется по формуле суммирования Дебая, которая является точной, но требует значительных ресурсов машинного времени.

Измерения методом МУРР проводились на станции ДИКСИ курчатовского источника синхротронного излучения. Станция сконструирована по классической оптической схеме, включающей в себя три пары коллимирующих щелей, однокристалльный монохроматор ( $\lambda = 1.6 \text{ \AA}$ ), фокусирующее в вертикальной плоскости рентгеновское зеркало и двухкоординатный детектор Pilatus3 1M.

Расстояние образец–детектор на станции варьируется в зависимости от задачи вплоть до 2.4 м. Для того чтобы получить оптимальное разрешение по времени, расстояние между образцом и детектором было выбрано равным 0.5 м при времени экспозиции детектора 3 минуты на кадр. При данной геометрии съёмки модуль вектора рассеяния  $q$  варьировался в диапазоне от 0.2 до 4.2  $\text{nm}^{-1}$ .

Нагрев каждого образца в растворе производился в диапазоне от 25 до 70 °С с шагом 5 °С, время достижения теплового равновесия в каждой точке составляло 10 мин. Для каждого образца при каждой температуре снималась серия по 3 кадра для оценки влияния радиационных повреждений на кривую рассеяния. Для дополнительного контроля были произведены

измерения при фиксированной температуре в течение 60 мин, которые показали, что эффектом радиационного повреждения белка при комнатных температурах можно пренебречь.

## Результаты и их обсуждение

### 1. Конформационные изменения БСА при термической денатурации в системах, проходящих различные интермедиаты

В данной работе ставилась цель сравнить термическую денатурацию при pH 3 и при pH 7.4 для исследования структурных изменений в системах, проходящих различные промежуточные состояния, и для выявления чувствительности используемых методик при детектировании фибриллярных структур [24–26], а также состояния расплавленной глобулы [27].

Индикатором конформационных изменений белка может являться его триптофановая флуоресценция (рис. 2 *A, B*), так как триптофановые остатки чувствительны к изменениям своего микроокружения [28].

При термической денатурации белка в растворе при pH 7.4 происходит плавление белковой глобулы, приводящее к коротковолновому сдвигу спектра триптофановой флуоресценции (см. рис. 2, *A*). Данный факт может быть проинтерпретирован как следствие уменьшения полярности окружения триптофановых остатков в БСА [28]. Как видно из рис. 2, *B*, термическая инкубация альбумина при pH 3 при 65 °С не приводит к изменениям спектральных характеристик триптофановой флуоресценции, соответственно можно сделать вывод о том, что свойства микроокружения триптофановых остатков меняются слабо.

Вторым индикатором конформационных изменений белка являлось изменение флуоресценции гидрофобного зонда Нильский красный, эмиссия которого возрастает при встраивании его в области с низкой полярностью, например, в гидрофобные домены белков и их агрегатов [29]. На рис. 3, *A, B* представлены спектры флуоресценции зонда в присутствии БСА при pH 7.4 и pH 3 до и после температурного воздействия.

Видно, что в растворе термически денатурированного альбумина при pH 7.4 наблюдается коротковолновый сдвиг спектра флуоресценции зонда, что свидетельствует об изменении полярности его микроокружения – происходит его



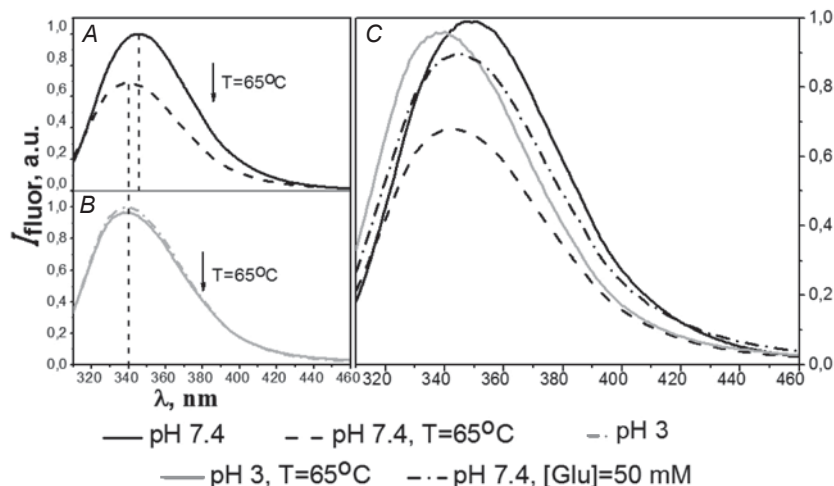


Рис. 2. Сравнение спектров собственной триптофановой флуоресценции БСА: *A* – при термической денатурации в растворе с pH 7.4, *B* – при термической денатурации в растворе с pH 3, *C* – при термической денатурации и при его гликировании, [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  М

Fig. 2. Comparison of spectra of intrinsic tryptophan fluorescence BSA, (*A*) – during thermal denaturation, pH 7.4, (*B*) – during thermal denaturation, pH 3, (*C*) – during thermal denaturation and glycation, [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  M

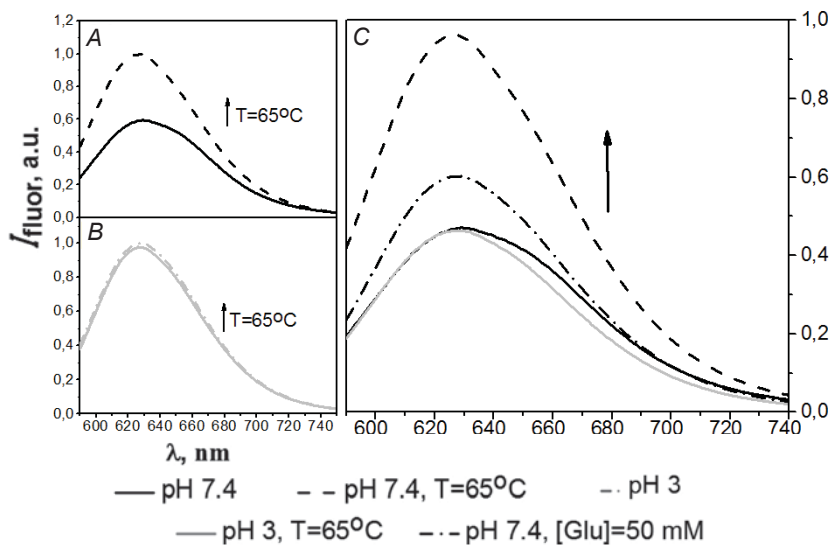


Рис. 3. Сравнение спектров флуоресценции зонда Нильский красный в комплексе: *A* – с термически денатурированным БСА в растворе с pH 7, *B* – с термически денатурированным БСА в растворе с pH 3, *C* – с термически денатурированным и гликированным БСА, [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  М, [NR] =  $9 \cdot 10^{-7}$  М

Fig. 3. Comparison of the Nile red fluorescence spectra in complex (*A*) with thermally denatured BSA, pH 7, (*B*) – with thermally denatured BSA, pH 3, (*C*) – with thermally denatured and glycated BSA, [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  M, [NR] =  $9 \cdot 10^{-7}$  M

встраивание в гидрофобные домены, которые, возможно, появляются между взаимодействующими белками, либо гидрофобные домены становятся более доступными для зонда [29, 30]. В растворе БСА при pH 3 после нагрева изменения

в оптических характеристиках и, следовательно, изменения в полярности микроокружения зонда не наблюдаются.

При анализе рассматриваемых систем, произведенном методом абсорбционной спектро-



скопии (рис. 4, A), видно, что при термическом воздействии на раствор БСА+NR при pH 7.4 его оптическая плотность на всех длинах волн растёт, что с большой долей вероятности говорит о процессе образования агрегатов в данном образце. При инкубации БСА (pH 3) при 65°C

оптическая плотность раствора на всех длинах волн практически не меняется. Таким образом, метод абсорбционной спектроскопии не позволяет сделать вывод о наличии агрегатов в растворе БСА при pH 3 после термического воздействия.

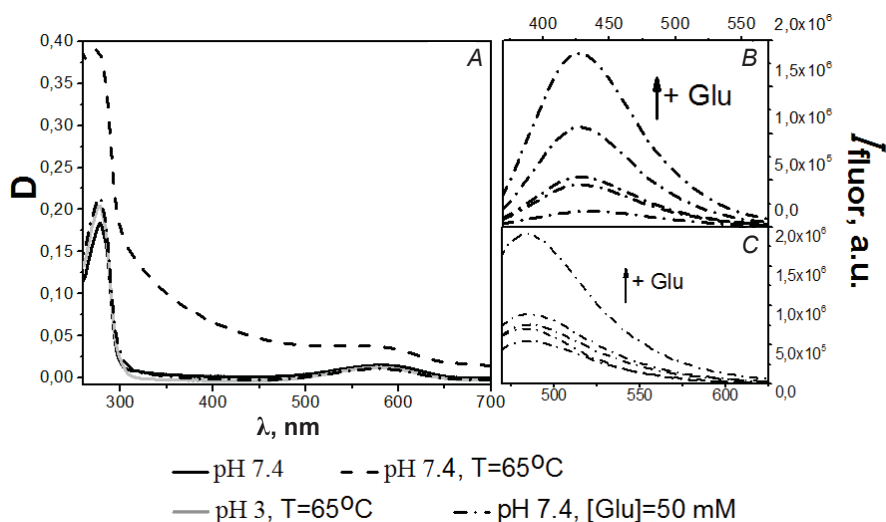


Рис. 4. Спектры поглощения образцов БСА+NR при их термической денатурации и при гликировании (A); спектры флуоресценции БСА при возбуждении на длине волны  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  нм в растворе гликированного белка (B); спектры флуоресценции зонда тиофлавин Т в растворе гликированного белка (C),  $[\text{BCA}] = 5 \cdot 10^{-6}$  М,  $[\text{NR}] = 9 \cdot 10^{-7}$  М,  $[\text{ThT}] = 2 \cdot 10^{-6}$  М

Fig. 4. (A) – absorption spectra of BSA + NR samples under thermal denaturation and glycation, (B) – BSA fluorescence spectra of glycated protein solution under excitation at  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm, (C) – thioflavin T fluorescence spectra in glycated protein solution,  $[\text{BCA}] = 5 \cdot 10^{-6}$  M,  $[\text{NR}] = 9 \cdot 10^{-7}$  M,  $[\text{ThT}] = 2 \cdot 10^{-6}$  M

Для того чтобы провести детальное исследование структурных изменений, происходящих с белком при термическом воздействии, было произведено исследование кинетики термической агрегации БСА в буферных растворах pH 3 и pH 7.4 методом МУРР. На рис. 5, A показана температурная зависимость рассчитанного с помощью аппроксимации Гинье средневзвешенного по ансамблю частиц радиуса инерции молекул белка.

Из рис. 5, A видно, что в растворе альбумина, находящемся при pH 7.4, при нагреве до 50 °C заметных структурных перестроек молекулы белка не происходит. При дальнейшем увеличении температуры, однако, наблюдается резкий скачок значения радиуса инерции в области температуры плавления белка (65 °C), что связано с изменением конформации белка и образованием агрегатов. Напротив, в раство-

ре БСА при pH 3 уже при малых температурах (~30 °C) наблюдается рост средневзвешенного радиуса инерции частиц, что говорит об образовании агрегатов белка. Данный факт можно объяснить тем, что молекула альбумина при pH 3 находится в состоянии расплавленной глобулы [31], в результате чего ее стабильность является пониженной и соответственно процесс агрегации запускается спонтанно уже при низких (ниже температуры плавления нативного белка) температурах.

Согласно шариковой модели молекулы альбумина в растворе с pH 3 разворачивание белковой глобулы в цепочку происходит уже при комнатной температуре (см. рис. 5, C). Белок БСА состоит из трех доменов, которые могут изменять свое относительное положение в пространстве в зависимости от параметров

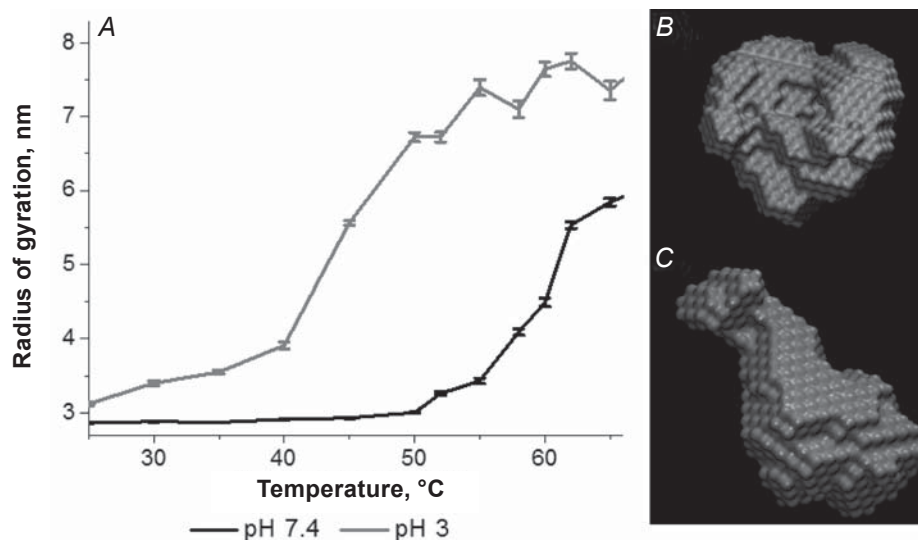


Рис. 5. Зависимость среднего радиуса инерции молекулы БСА от температуры раствора альбумина при pH 3 и pH 7.4 (A); шариковая модель, построенная методом виртуальных атомов до температурного воздействия: B – молекулы альбумина в растворе с pH 7.4, C – молекулы альбумина в растворе с pH 3. [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  М

Fig. 5. (A) – dependence of average gyration radius of the BSA molecule on the temperature, pH 3 and pH 7.4; model was constructed using virtual atoms method, (B) – albumin molecules before heating, pH 7.4, (C) – albumin molecules, pH 3. [БСА] =  $5 \cdot 10^{-6}$  М

окружения. Наши шариковые модели могут быть применены для оценки происходящей в растворе молекулярной тектоники и интерпретированы как выстраивание трех доменов БСА вдоль одной оси. Для сравнения, при pH 7.4 белок имеет классическую глобулярную форму в виде сердца (heart-shaped) (см. рис. 5, B) [32]. Стоит отметить, что полученные данные хорошо согласуются с литературными (см., например, [33]), где авторы также отмечают разворачивание сывороточного альбумина человека в цепочку при понижении pH раствора.

Стоит отметить, что в отличие от метода стационарной флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии, не показывающих радикальных конформационных изменений при термическом воздействии на раствор БСА (см. рис. 3, A), находящегося в состоянии расплавленной глобулы (pH 3), метод МУРР является более чувствительным к структурным изменениям молекул в растворе альбумина. Иными словами, образование агрегатов в растворе с pH 3 не приводит ни к изменению полярности окружения триптофановых остатков в белке (рис. 2, B), ни к появлению новых доступных гидрофобных сайтов или экспонированию гидрофобных сайтов в растворитель (соответственно неизменными остаются оптические характеристики гидрофобного зонда

NR, см. рис. 3, B). Таким образом, несмотря на то что в системе имеют место конформационные перестройки молекулы и межмолекулярные взаимодействия, их наличие не проявляется в оптических свойствах использованных флуоресцентных индикаторов.

## 2. Конформационные изменения БСА при гликировании и термической денатурации

В работе было также произведено сравнение конформационных изменений альбумина при его гликировании и при его термической денатурации/агрегации. На рис. 2, C представлены спектры собственной флуоресценции БСА: 1) при pH 7.4 (в нативном состоянии); 2) при его термической денатурации при pH 7.4,  $T = 65$  °C; 3) при термической денатурации при pH 3; 4) при гликировании (pH 7.4).

Как видно из рис. 2, C, гликирование альбумина не приводит к изменению полярности окружения триптофановых остатков, поскольку положение максимума полосы собственной флуоресценции остается неизменным. При этом при гликировании БСА наблюдается заметный рост флуоресцентной полосы, обусловленной наличием конечных продуктов гликирования (см. рис. 4, B), что является подтверждением успешного хода процесса гликирования. Данные факты



находятся в соответствии с литературными данными [8]. В то же время из рис. 3, С видно, что при гликировании альбумина наблюдается рост флуоресценции зонда Нильский красный, что говорит об увеличении доступности гидрофобных сайтов связывания. Более того, исследования, проведенные с использованием флуоресцентного зонда тиофлавин Т, являющегося специфичным маркером образования фибриллярных структур [34], показали увеличение интенсивности его флуоресценции при гликировании БСА (см. рис. 4, С), что может быть интерпретировано

как образование фибриллоподобных агрегатов или увеличение доли  $\beta$ -структур в белке. Первое предположение находится в соответствии с литературными данными [35].

### 3. Исследование конформационных изменений гликированного и термически денатурированного белка с использованием метода время-разрешенной флуориметрии

В данной работе было произведено измерение кинетик затухания собственной триптофановой флуоресценции белка при термической денатурации и при его гликировании (рис. 6).

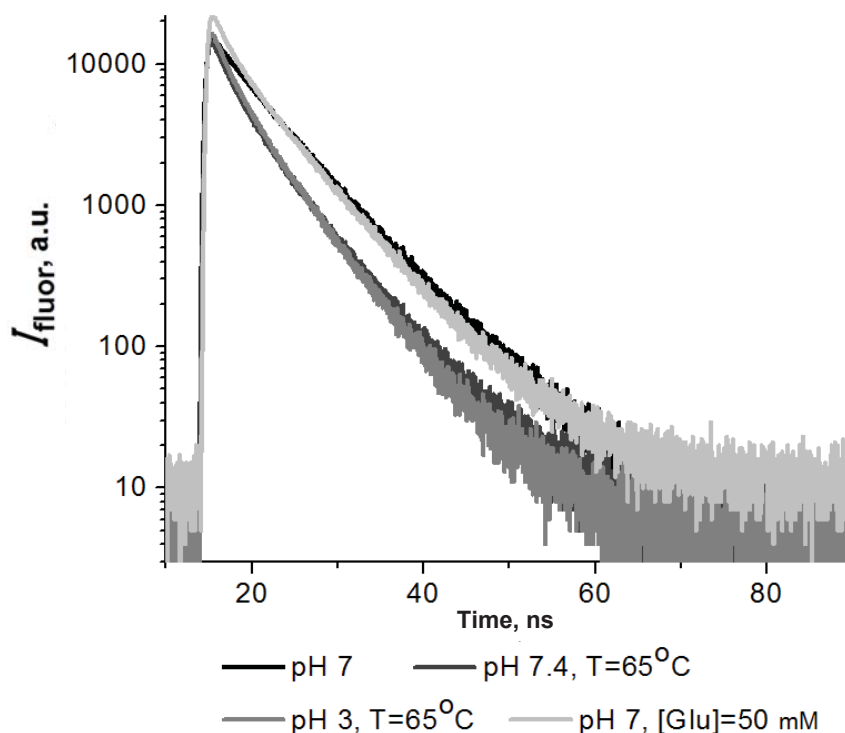


Рис. 6. Кинетики затухания флуоресценции БСА при термической денатурации и при его гликировании. Длина волны возбуждения  $\lambda_{ex} = 280$  нм

Fig. 6. BSA fluorescence decay kinetics under thermal denaturation and glycation. Excitation wavelength  $\lambda_{ex} = 280$  nm

После анализа полученных результатов были определены относительные амплитуды и средние времена жизни возбужденной молекулы для смеси растворов БСА+зонд pH 3, pH 7.4 при термическом воздействии и при инкубации БСА с глюкозой в течение 18 дней. Результаты представлены в таблице.

Определенные времена жизни флуоресценции БСА при pH 7.4 находятся в согласии с литературными данными [36]. При термической агрегации нативного белка среднее время жизни

падает с 5.5 до 4 нс. При этом время жизни белка при pH 3 до и после нагрева практически не меняется и составляет 3.8 и 3.7 нс соответственно. Данный факт может быть объяснен тем, что в состоянии расплавленной глобулы при pH 3 молекула белка уже претерпела существенные конформационные изменения, и дальнейшее температурное воздействие приводит к более слабому изменению микроокружения триптофановых остатков по сравнению с термической денатурацией при pH 7.4. Аналогично при гликировании





**Параметры, полученные при аппроксимации кинетики затухания флуоресценции БСА**  
**Parameters obtained by approximating of the BSA fluorescence decay kinetics**

Образец Sample	Времена жизни флуоресценции, нс Fluorescence lifetime, ns	Относительные амплитуды, % Relative amplitudes, %	Среднее время жизни, нс Average lifetime, ns	$\chi^2$ (невязка) Discrepancy
BSA, pH 7.4	$\tau_1 = 3.1 \pm 0.1$ $\tau_2 = 6.7 \pm 0.4$	$a_1 = 49.4 \pm 2.1$ $a_2 = 50.6 \pm 2.5$	$\langle \tau \rangle = 5.5 \pm 0.3$	1.98
BSA, pH=7.4, T=65 °C	$\tau_1 = 2.7 \pm 0.1$ $\tau_2 = 6.4 \pm 0.3$	$a_1 = 65.9 \pm 2.6$ $a_2 = 34.1 \pm 1.9$	$\langle \tau \rangle = 4.0 \pm 0.2$	1.45
BSA, pH=3	$\tau_1 = 2.6 \pm 0.1$ $\tau_2 = 5.7 \pm 0.3$	$a_1 = 61.3 \pm 2.5$ $a_2 = 38.7 \pm 2.0$	$\langle \tau \rangle = 3.8 \pm 0.1$	1.75
BSA, pH=3, T=65 °C	$\tau_1 = 2.5 \pm 0.1$ $\tau_2 = 5.5 \pm 0.3$	$a_1 = 59.5 \pm 2.4$ $a_2 = 40.5 \pm 2.4$	$\langle \tau \rangle = 3.7 \pm 0.1$	1.6
Гликированный БСА, pH 7.4	$\tau_1 = 2.6 \pm 0.1$ $\tau_2 = 6.4 \pm 0.3$	$a_1 = 48.0 \pm 2.0$ $a_2 = 52.0 \pm 2.2$	$\langle \tau \rangle = 5.3 \pm 0.3$	1.96

альбумина не наблюдается изменений времени жизни флуоресценции (см. таблицу). В целом наблюдаемые тренды находятся в соответствии с изменениями стационарных флуоресцентных характеристик триптофановых остатков.

#### Заключение

В данной работе методами стационарной и время-разрешенной флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии, а также методом малоуглового рентгеновского рассеяния были показаны различные проявления структурных изменений альбумина при гликировании и термической денатурации. В частности, молекула белка в растворе при pH 3 еще до термического воздействия теряет свою нативную конформацию и полностью разворачивается. Было показано, что процесс образования агрегатов в данном растворе запускается спонтанно еще до нагрева.

При термическом воздействии на молекулу БСА в растворе с pH 7.4 происходит структурная перестройка белка, а именно уменьшение полярности микроокружения триптофановых остатков и увеличение доступности гидрофобных доменов. Вследствие температурных воздействий молекулы нативного альбумина ассоциируют в аморфные агрегаты.

При гликировании альбумин также проходит состояние расплавленной глобулы, однако не происходит изменения полярности микроокружения триптофановых остатков, значительным образом растет доступность гидрофобных сайтов связывания БСА, альбумин агрегирует с образованием структур, обогащенных  $\beta$ -листами. Таким

образом, в данной работе было показано, что, несмотря на схожие промежуточные состояния, которые проходят рассматриваемые системы, структурные перестройки белка различны для гликированного и термически денатурированного/агрегированного альбумина.

#### Благодарности

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 16-32-60168, 16-32-00049) и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект № 7372ГУ/2015).*

#### Список литературы

1. *Liggins J., Furth A.* Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. Vol. 1361. P. 123–130.
2. *Suarez G., Rajaram R.* Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose // *Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 3674–3679.
3. *Monnier V. M., Sell D. R.* Maillard Reaction-Mediated Molecular Damage to Extracellular Matrix and Other Tissue Proteins in Diabetes, Aging, and Uremia // *Diabetes* 1992. Vol. 21. P. 36–41.
4. *Tikhonova T. N., Shirshin E. A., Budylin G. S., Fadeev V. V., Petrova G. P.* Assessment of the Europium (III) Binding Sites on Albumin Using Fluorescence Spectroscopy // *J. Phys. Chem.* 2014. Vol. 118. P. 6626–6633.
5. *Zhdanova N. G., Shirshin E. A., Maksimov E. G., Panchishin I. M., Saletsky A. M., Fadeev V. V.* Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015. Vol. 14. P. 897–908.



6. Mendez D. L., Jensen R. A. The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin // Arch. Biochem. Biophys. 2005. Vol. 444. P. 92–99.
7. Nakajou K., Watanabe H., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants // Biochim. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1623. P. 88–97.
8. Obayashi H., Nakano K. Formation of Crossline as a Fluorescent Advanced Glycation End Product *in vitro* and *in vivo* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. Vol. 226. P. 37–41.
9. Odetti P., Aragno I., Rolandi R., Garibaldi S., Valentini S., Cosso L., Traverso N., Cottalasso D., Pronzato M. A., Marinari U. M. Scanning force microscopy reveals structural alterations in diabetic rat collagen fibrils : role of protein glycation // Diabetes/metabolism research and reviews. 2000. Vol. 16. P. 74–81.
10. Adamcik J., Jung J.-M., Flakowski J., De Los Rios P., Dietler G., Mezzenga R. Understanding amyloid aggregation by statistical analysis of atomic force microscopy images // Nature Nanotech. 2010. Vol. 5. P. 423–428.
11. Ross C. A., Poirier M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease // Nature Med. 2004. Vol. 10. P. S10–S17.
12. Lin V. J. C., Koenig J. L. Raman studies of bovine serum albumin // Biopolymers. 1976. Vol. 15. P. 203–218.
13. Hayakawa I., Kajikara J., Morikawa K., Oda M., Fujio Y. Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals // J. Food Sci. 1992. Vol. 57. P. 288–292.
14. Brandt N. N., Chikishev A. Yu., Mankova A. A., Sakodynskaya I. K. Effect of thermal denaturation, inhibition, and cleavage of disulfide bonds on the low-frequency Raman and FTIR spectra of chymotrypsin and albumin // J. Biomed. Optics. 2015. Vol. 20. P. 051015-1-051015-6.
15. Svetlakova A. S., Brandt N. N., Priezzhev A. V., Chikishev A. Yu. Raman microspectroscopy of nanodiamond-induced structural changes in albumin // J. Biomed. Optics. 2015. Vol. 20. P. 047004-1–047004-5.
16. Vetri V., Librizzi F., Leone M., Militello V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH : comparison with human serum albumin // Eur. Biophys. J. 2006. Vol. 36. P. 717–725.
17. Shang L., Wang Y. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin : Gold Nanoparticle Bioconjugates : A Spectroscopic Study // Langmuir. 2007. Vol. 23. P. 2714–2721.
18. Wahl M. Time-Correlated Single Photon Counting. URL: <http://www.picoquant.com> (дата обращения: 14.01.2017).
19. Bhattacharya M., Jain N., Mukhopadhyay S. Insights into the Mechanism of Aggregation and Fibril Formation from Bovine Serum Albumin // J. Phys. Chem. 2011. Vol. 115. P. 4195–4205.
20. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М. : Мир, 1986. 496 с.
21. Szabo A. G., Rayner D. M. Fluorescence Decay of Tryptophan Conformers in Aqueous Solution // J. Amer. Chem. Soc. 1980. Vol. 102. P. 554–563.
22. Guinier A., Fournet G. Small angle scattering of X-rays // J. Polym. Sci. 1955. Vol. 1. P. 268.
23. Franke D., Svergun D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering // J. Appl. Cryst. 2009. Vol. 42. P. 342–346.
24. Blake C., Serpell L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous  $\beta$ -sheet helix // Structure. 1996. Vol. 4. P. 989–998.
25. Wu C., Wang Z., Lei H., Zhang W., Duan Y. Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations // J. Amer. Chem. Soc. 2007. Vol. 129. P. 1225–1232.
26. Biancalana M., Makabe K., Koide A., Koide S. Aromatic cross-strand ladders control the structure and stability of  $\beta$ -rich peptide self-assembly mimics // J. Mol. Biol. 2008. Vol. 383. P. 205–213.
27. Yang J., Dunker A. K., Powers J. R., Clark S., Swanson B. G.  $\beta$ -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure // J. Agric. Food. Chem. 2001. Vol. 49. P. 3236–3243.
28. Sulkowska A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin // Mol. Struct. 2002. Vol. 614. P. 227–232.
29. Tajalli H., Gilani A. G., Zakerhamidi M. S., Tajalli P. The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media // Dyes and Pigments. 2008. Vol. 78. P. 15–24.
30. Okamoto A., Tainaka K., Fujiwara Y. Nile Red nucleoside : Design of a solvatofluorochromic nucleoside as an indicator of micropolarity around DNA // J. Org. Chem. 2006. Vol. 71. P. 3592–3598.
31. Muzammil S., Kumar Y., Tayyab S. Molten globule-like state of human serum albumin at low pH // FEBS. 1999. Vol. 266. P. 26–32.
32. Leggio C., Galantini L., Pavel N. V. About the albumin structure in solution : cigar Expanded form versus heart Normal shape // Phys. Chem. Chem. Phys. 2008. Vol. 10. P. 6741–6750.
33. Olivieri J. R., Craievich A. F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle x-ray scattering // Eur. Biophys. J. 1995. Vol. 24. P. 77–84.
34. Krebs M. R. H., Bromley E. H. C., Donald A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils : localisation and implications // J. Struct. Biol. 2005. Vol. 149. P. 30–37.
35. Bouma B., Kroon-Batenburg L. M., Wu Y. P., Brünjes B., Posthuma G., Kranenburg O., Gebbink M. F. Glycation induces formation of amyloid cross- $\beta$  structure in albumin // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 41810–41819.
36. Togashi D. M., Ryder A. G., Mc Mahon D., Dunne P., McManus J. Fluorescence study of Bovine Serum Albumin and Ti and Sn Oxide Nanoparticles Interactions // Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV / eds. D. Schweitzer, M. Fitzmaurice. Proc. of SPIE-OSA Biomedical Optics, SPIE Vol. 6628, 66281K, 2007 (11 p.).

**Образец для цитирования:**

Ровнягина Н. Р., Тихонова Т. Н., Молоденский Д. С., Ширшин Е. А. Детектирование конформационных изменений альбумина при его гликировании и термической денатурации методами флуоресцентной спектроскопии и малоуглового рентгеновского рассеяния // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Физика. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 179–190. DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-179-190.

**Albumin Conformational Changes During Glycation and Thermal Denaturation Processes Revealed by Fluorescence Spectroscopy and Small-angle X-ray Scattering**

**N. R. Rovnyagina, T. N. Tikhonova, D. S. Molodenskiy, E. A. Shirshin**

Nataliya R. Rovnyagina, ORCID 0000-0002-6729-3245, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, n.rovnyagina2015@yandex.ru

Tatiana N. Tikhonova, ORCID 0000-0003-2639-9163, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, tikhonova@physics.msu.ru

Dmitry S. Molodenskiy, ORCID 0000-0002-5954-4294, National Research Centre Kurchatov Institute, Sq. Akademika Kurchatova, 1, Moscow, 123098, Russia, d.s.molodenskiy@yandex.ru

Evgeny A. Shirshin, ORCID 0000-0002-5514-3557, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia, shirshin@lid.phys.msu.ru

**Background and Objectives:** Objects of the research in this study are solutions of bovine serum albumin (BSA) and its aggregates. Structural changes of the protein molecules in solution with pH 3 and pH 7.4 are investigated during glycation and thermal denaturation processes, when the BSA molecules in solution undergo similar intermediate states. The main aim of the research is to compare structural changes of the BSA upon its glycation and thermal denaturation, revealed by combination of optical and X-ray techniques. **Materials and Methods:** The main techniques used in this study were steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy, as well as small angle X-ray scattering (SAXS). **Results:** Position of maximum in tryptophan fluorescence spectrum and tryptophan fluorescence lifetime are sensitive to BSA conformational changes at pH 7.4 upon its incubation at 65°C. Availability of hydrophobic binding sites of NR significantly increases upon glycation. No alterations of these photophysical parameters are observed at pH 3. However, SAXS experiments reveal presence of BSA aggregates at 25°C and above. Further incubation of the solution at 65°C is not accompanied by changes in the local environment of tryptophan residues or appearance/accessibility enhancement of hydrophobic sites in the protein structure. **Conclusion:** This study shows that structural changes of the BSA molecules differ for glycated and thermally denatured / aggregated proteins, though the molecules undergo similar intermediate states during these processes.

**Key words:** glycation, albumin, thermal denaturation, conformation, molten globule, Nile Red, thioflavin T, AGEs (advanced glycation end-products),  $\pi$ -stacking, fibrils, pathological conditions, socially important diseases, fluorescence spectroscopy, Small Angle X-ray Scattering.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects nos. 16-32-60168, 16-32-00049) and the Assistance Foundation for Small Innovative Enterprises Development in Science and Technology (project no. 7372 GU/2015).

**References**

1. Liggins J., Furth A. Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, vol. 1361, pp. 123–130.
2. Suarez G., Rajaram R. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, pp. 3674–3679.
3. Monnier V. M., Sell D. R. Maillard Reaction-Mediated Molecular Damage to Extracellular Matrix and Other Tissue Proteins in Diabetes, Aging, and Uremia. *Diabetes*, 1992, vol. 21, pp. 36–41.
4. Tikhonova T. N., Shirshin E. A., Budylin G. S., Fadeev V. V., Petrova G. P. Assessment of the Europium (III) Binding Sites on Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 2014, vol. 118, pp. 6626–6633.
5. Zhdanova N. G., Shirshin E. A., Maksimov E. G., Panchishin I. M., Saletsky A. M., Fadeev V. V. Tyrosine fluorescence probing of the surfactant-induced conformational changes of albumin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, vol. 14, pp. 897–908.
6. Mendez D. L., Jensen R. A. The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, vol. 444, pp. 92–99.
7. Nakajou K., Watanabe H., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, vol. 1623, pp. 88–97.
8. Obayashi H., Nakano K. Formation of Crossline as a Fluorescent Advanced Glycation End Product *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, vol. 226, pp. 37–41.
9. Odetti P., Aragno I., Rolandi R., Garibaldi S., Valentini S., Cosso L., Traverso N., Cottalasso D., Pronzato M. A., Marinari U. M. Scanning force microscopy reveals structural alterations in diabetic rat collagen fibrils: role of protein glycation. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2000, vol. 16, pp. 74–81.
10. Adamcik J., Jung J.-M., Flakowski J., De Los Rios P., Dietler G., Mezzenga R. Understanding amyloid aggregation by statistical analysis of atomic force microscopy images. *Nature Nanotech.*, 2010, vol. 5, pp. 423–428.



11. Ross C.A., Poirier M.A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Med.*, 2004, vol. 10, pp. S10–S17.
12. Lin V. J. C., Koenig J. L. Raman studies of bovine serum albumin. *Biopolymers*, 1976, vol. 15, pp. 203–218.
13. Hayakawa I., Kajikara J., Morikawa K., Oda M., Fujio Y. Denaturation of bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin by high pressure, heat and chemicals. *J. Food Sci.*, 1992, vol. 57, pp. 288–292.
14. Brandt N. N., Chikishev A. Yu., Mankova A.A., Sakodinskaya I. K. Effect of thermal denaturation, inhibition, and cleavage of disulfide bonds on the low-frequency Raman and FTIR spectra of chymotrypsin and albumin. *J. Biomed. Optics.*, 2015, vol. 20, pp. 051015-1–051015-6.
15. Svetlakov A. S., Brandt N. N., Priezzhev A. V., Chikishev A. Yu. Raman microspectroscopy of nanodiamond-induced structural changes in albumin. *J. Biomed. Optics*, 2015, vol. 20, pp. 047004-1–047004-5.
16. Vetri V., Librizzi F., Leone M., Militello V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin. *Eur. Biophys J.*, 2006, vol. 36, pp. 717–725.
17. Shang L., Wang Y. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin : Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study. *Langmuir*, 2007, vol. 23, pp. 2714–2721.
18. Wahl M. *Time-Correlated Single Photon Counting*. Available at: <http://www.picoquant.com> (accessed 14 January 2017).
19. Bhattacharya M., Jain N., Mukhopadhyay S. Insights into the Mechanism of Aggregation and Fibril Formation from Bovine Serum Albumin. *J. Phys. Chem.*, 2011, vol. 115, pp. 4195–4205.
20. Lakovich Dzh. *Osnovy fluorestsentnoi spektroskopii* [Fundamentals of fluorescence spectroscopy]. Moscow, Mir, 1986. 496 p. (in Russian).
21. Szabo A. G., Rayner D. M. Fluorescence Decay of Tryptophan Conformers in Aqueous Solution. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, vol. 102, pp. 554–563.
22. Guinier A., Fournet G. Small angle scattering of X-rays. *J. Polym. Sci.*, 1955, vol. 1, p. 268.
23. Franke D., Svergun D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.*, 2009, vol. 42, pp. 342–346.
24. Blake C., Serpell L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous  $\beta$ -sheet helix. *Structure*, 1996, vol. 4, pp. 989–998.
25. Wu C., Wang Z., Lei H., Zhang W., Duan Y. Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations. *J. Amer. Chem. Soc.*, 2007, vol. 129, pp. 1225–1232.
26. Biancalana M., Makabe K., Koide A., Koide S. Aromatic cross-strand ladders control the structure and stability of  $\beta$ -rich peptide self-assembly mimics. *J. Mol. Biol.*, 2008, vol. 383, pp. 205–213.
27. Yang J., Dunker A. K., Powers J. R., Clark S., Swanson B. G.  $\beta$ -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure. *J. Agric. Food. Chem.*, 2001, vol. 49, pp. 3236–3243.
28. Sulkowska A. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Mol. Struct.*, 2002, vol. 614, pp. 227–232.
29. Tajalli H., Gilani A. G., Zakerhamidi M. S., Tajalli P. The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media. *Dyes and Pigments*, 2008, vol. 78, pp. 15–24.
30. Okamoto A., Tainaka K., Fujiwara Y. Nile Red nucleoside: Design of a solvatofluorochromic nucleoside as an indicator of micropolarity around DNA. *J. Org. Chem.*, 2006, vol. 71, pp. 3592–3598.
31. Muzammil S., Kumar Y., Tayyab S. Molten globule-like state of human serum albumin at low pH. *FEBS*, 1999, vol. 266, pp. 26–32.
32. Leggio C., Galantini L., Pavel N. V. About the albumin structure in solution: cigar Expanded form versus heart Normal shape. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, vol. 10, pp. 6741–6750.
33. Olivieri J. R., Craievich A. F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle x-ray scattering. *Eur. Biophys. J.*, 1995, vol. 24, pp. 77–84.
34. Krebs M. R. H., Bromley E. H. C., Donald A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.*, 2005, vol. 149, pp. 30–37.
35. Bouma B., Kroon-Batenburg L. M., Wu Y. P., Brünjes B., Posthuma G., Kranenburg O., Gebbink M. F. Glycation induces formation of amyloid cross- $\beta$  structure in albumin. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 41810–41819.
36. Togashi D. M., Ryder A. G., Mc Mahon D., Dunne P., McManus J. Fluorescence Study of Bovine Serum Albumin and Ti and Sn Oxide Nanoparticles Interactions. *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV*. Eds. D. Schweitzer, M. Fitzmaurice, Proc. of SPIE-OSA Biomedical Optics, SPIE Vol. 6628, 66281K, 2007 (11 p.).

**Cite this article as:**

Rovnyagina N. R., Tikhonova T. N., Molodenskiy D. S., Shirshin E. A. Albumin Conformational Changes During Glycation and Thermal Denaturation Processes Revealed by Fluorescence Spectroscopy and Small-angle X-ray Scattering. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Physics*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 179–190 (in Russian). DOI: 10.18500/1817-3020-2017-17-3-179-190.