

биология точна по биологическим мерам, многие из которых пока лишь интуитивные, хотя позволяют создавать молекулярные устройства, использующие принципы биологии клетки *ab initio*.

Работа выполнена за счет средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № АААА-А17-117013050026-4).

Список литературы / References:

1. Noble D. *Dance to the Tune of Life: Biological Relativity*. CUP, 2017, 300 p.
2. Иваницкий Г.Р. Самоорганизующаяся динамическая устойчивость биосистем, далёких от равновесия. *УФН*, 2017, т. 187, № 7, с. 757-784. [Ivanitskii G.R. The self-organizing dynamic stability of far-from-equilibrium biological systems. *Phys. Usp.*, 2017, vol. 60, no. 7, pp. 757-784. (In Russ.)]
3. Koonin E.V. Frozen Accident Pushing 50: Stereochemistry, Expansion, and Chance in the Evolution of the Genetic Code. *Life*, 2017, vol. 7, № 2, pp. 22-34.
4. Shapiro J.A. Exploring the read-write genome: mobile DNA and mammalian adaptation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, vol. 52, no. 1, pp. 1-17.
5. Plopper G. *Principles of Cell Biology*. 2nd ed. Jones & Bartlett Learning, 2016, 566 p.
6. Longo G., Soto A.M. Why do we need theories? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2016, vol. 122, no. 1, pp. 4-10.
7. Milo R., Phillips R. *Cell Biology by the Numbers*. Garland Science, 2015, 395 p.
8. Zimin A.A., Denisov I.A., Yakimov A.S., Belyanina I.V., Nikiforova V.S., Lukyanenko K.A., Belobrov P.I. Cell-to-cell microfluidic interaction models in the science of health. *Scientific and Practical Journal of Health and Life Sciences*, 2013, no. 4, pp. 10-18.

БИОФИЗИКА ОТКРЫТЫХ СИСТЕМ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЭВОЛЮЦИОННЫЕ МАШИНЫ

Брильков А.В.¹, Брилькова Е.В.², Логинов Ю.Ю.³

¹Сибирский федеральный университет

пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ

e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru

²Институт биофизики ФИЦ СО РАН

Академгородок, 50 стр. 50, г. Красноярск, 660036, РФ

e-mail: evmorbril@mail.ru

³Сибирский государственный университет науки и технологий им. ак. М.Ф.Решетнева

пр. Красноярский рабочий, 31, г. Красноярск, 660037, РФ

e-mail: loginov@sibsau.ru

Аннотация. Статья представляет собой краткий обзор современного состояния проблемы термодинамических критериев эволюции открытых биологических систем. Рассмотрены эксперименты по экспериментальной эволюции (микроэволюции) популяций микроорганизмов в непрерывных культурах. С точки зрения термодинамики, непрерывные культуры микроорганизмов - это открытые термодинамические системы, способные находиться в устойчивых стационарных состояниях. В соответствии с классификацией М. Эйгена, хемостат соответствует случаю постоянных потоков (постоянная скорость разбавления), в то время как турбидостат - случаю постоянной организации (постоянная плотность популяции микроорганизмов). Как следует из общих принципов неравновесной термодинамики (принцип Онзагера, теорема Пригожина) открытые системы обоих типов в стационарном состоянии должны эволюционировать в направлении снижения скорости производства энтропии. Однако, результаты экспериментов по эволюции микроорганизмов в хемостате и турбидостате противоречат этому. Показано, что в процессе экспериментальной эволюции генетически модифицированных микроорганизмов (ГМО) в открытых системах обоих типов при лимитировании развития энергетическим субстратом скорость производства энтропии должна возрастать, а не уменьшаться, как следует из основных положений неравновесной термодинамики. Результаты экспериментов свидетельствуют о необходимости дальнейшего развития термодинамической теории открытых биологических систем, дальнейшего изучения общих закономерностей биологического развития.

Ключевые слова: Неравновесная термодинамика, открытые системы, эволюция стационарных состояний, непрерывные культуры микроорганизмов, турбидостат и хемостат, закономерности микроэволюции.

BIOPHYSICS OF OPEN SYSTEMS: EXPERIMENTAL EVOLUTIONAL MACHINES

Brilkov A.V.¹, Brilkova E.V.², Loginov Yu.Yu.³

¹Siberian Federal University

Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

e-mail: abrilkov@sfu-kras.ru

²Institute of biophysics FRC SB RAS

Akademgorodok, 50 building 50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

e-mail: evmorbril@mail.ru

³Reshetnev Siberian State University of Science and Technology

Krasnoyarskii rabochii pr., 31, Krasnoyarsk, 660037, Russia

e-mail: loginov@sibsau.ru

Abstract. The article is a brief review of the modern state of problem of thermodynamics criteria of evolution of biological open system. Experiments are considered on the experimental evolution (microevolution) of populations of microorganisms in continuous cultures. From the point of view of thermodynamics, continuous cultures of microorganisms are thermodynamics open system, able to be in the stable stationary states. In accordance with classification of M. Eigen, the chemostat corresponds to the case of constant flows (constant dilution rate), while the turbidostat - to the case of constant organization (constant density of population of microorganisms). As follows from general principles of non-equilibrium thermodynamics (principle of Onsager, theorem of Prigogine) open systems of both types in a steady-state must evolve in the direction of decline of entropy production rate. However, results of experiments on the evolution of microorganisms in the chemostat and in the turbidostat conflict with it. It is shown that in the process of experimental evolution of genetically modified microorganisms (ГМО) in open systems of both types at limiting of development of population by substrate the entropy production rate must increase, but not decrease, as follows from the basic principles of non-equilibrium thermodynamics. The results of experiments testify to the necessity of further development of thermodynamics theory of biological open systems, further study of general regularities of biological development.

Key words: Non-equilibrium thermodynamics, open system, evolution of steady-states, continuous cultures of microorganisms, turbidostat and chemostat, principles of microevolution.

Популяции микроорганизмов как объект для эволюционных исследований. Микробные популяции имеют неоспоримое преимущество перед популяциями макроорганизмов как объект популяционного анализа. Преимущества микробных популяций как идеального объекта популяционной и эволюционной биологии могут быть реализованы в открытых системах при длительном непрерывном культивировании, два основных типа которых мы рассмотрим ниже. В начале 50-х годов прошлого века были обоснованы и стали широко применяться в экспериментах два типа непрерывного (проточного) культивирования микроорганизмов – с постоянным потоком питательной среды через культиватор (хемостат) и постоянной плотностью популяции микроорганизмов в культиваторе (турбидостат) [1-4].

В традиционном турбидостате плотность популяции микроорганизмов стабилизируется по измерению оптической плотности или мутности суспензии микроорганизмов, однако в ряде случаев это достигается с помощью измерения других характеристик, изменяющихся одновременно с ростом популяции. Так, были уже осуществлены: *pH*-стат по скорости образования молочной кислоты бактериями при молочно-кислом брожении; *pH*-стат по скорости закисления среды микроорганизмами, потребляющими физиологически кислые соли азота из питательной среды, иногда этот метод называют еще *pH*-ауксостатом; *CO*₂-стат по скорости образования углекислоты микроорганизмами; оксигеностат по скорости потребления клетками кислорода; нутригостат по скорости поглощения определенного субстрата из среды, например, источника углерода и энергии; viscosity-стат по изменению вязкости ферментационной среды; плотностат по изменению оптической плотности суспензии микроводорослей; люминестат по изменению интенсивности свечения фотобактерий и др. Поскольку в этих методах прямо или косвенно стабилизируется плотность популяции микроорганизмов, можно считать их аналогами турбидостата (подробности см. [3-4]).

Турбидостат как метод культивирования с обратной связью технически сложнее и используется реже, в основном благодаря тому, что в турбидостате можно исследовать разнообразные ограничения роста популяций микроорганизмов плотностно-независимыми факторами среды. Хемостат в этом случае не подходит - при ограничении роста популяции микроорганизмов внешним ингибитором стационарные состояния в хемостате неустойчивы. В экологических исследованиях турбидостат обычно соответствует росту популяций в нелIMITированных условиях, что в природе может встречаться на ранних фазах экологической сукцессии, например, при заселении новой экологической ниши. Непрерывное культивирование в хемостате с глубоким лимитированием роста субстратом является аналогом большинства природных ситуаций, где встречается ограничение роста недостатком ресурсов - питательных веществ, элементов или микроэлементов. Направление экспериментальной эволюции стационарных состояний в открытых системах обоих типов зависит от контролирующего рост популяции фактора - ингибитора или одного из ресурсов (субстратов) среды.

Принципиальные особенности двух типов открытых биологических систем поясним на хорошо известной математической модели непрерывной культуры Моно-Герберта [3-5]:

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= \mu X - D X, \\ \frac{dS}{dt} &= D S_0 - \mu X/Y - D S,\end{aligned}\quad (1)$$

$$\mu = \mu_m S / (K_s + S),$$

где X – плотность популяции микроорганизмов; S_0 , S – концентрация субстрата во входной среде и в культиваторе; μ – удельная скорость роста популяции; Y – коэффициент экономичности использования субстрата; зависимость удельной скорости роста популяции микроорганизмов от концентрации лимитирующего рост субстрата $\mu(S) = \mu_m S / (K_s + S)$ выбрана в наиболее распространенной форме записи Моно в виде кривой с насыщением, K_s – константа полунасыщения.

В хемостате удельная скорость разбавления среды постоянна $D = const$ и при $\mu(S) = D$ стационарные значения X и S равны соответственно:

$$\begin{aligned}X^* &= Y(S_0 - S^*), \\ S^* &= K_s D / (\mu_m - D).\end{aligned}\quad (2)$$

В турбидостате экспериментатором задается постоянная плотность популяции микроорганизмов $X_0 = const$, а удельная скорость разбавления определяется уравнением регулятора, например, в самом простейшем случае, линейного типа:

$$D = k(X - X_0),\quad (3)$$

где X_0 – заданная плотность популяции; k – постоянная регулирования, $k > 0$.

Стационарные значения фактической плотности популяции микроорганизмов и концентрации субстрата в культиваторе в турбидостате при выполнении равенства $\mu(S) = D$ следующие:

$$\begin{aligned}X^* &= \mu(S^*)/k + X_0, \\ S^* &= S_0 - X^*/Y.\end{aligned}\quad (4)$$

Из выражения (4) следует, что в стационарном состоянии в турбидостате с регулятором линейного типа, задаваемым уравнением (3), устанавливается плотность популяции микроорганизмов X^* несколько выше необходимого экспериментатору значения X_0 – на малую величину $\varepsilon = \mu(S^*)/k$. При использовании регуляторов других типов действительная плотность популяции X^* может быть и немного меньше задаваемого значения X_0 . До сих пор широко распространено неверное представление о том, что турбидостат позволяет исследовать только нелимитированный рост популяции микроорганизмов, т.е. при высоких концентрациях субстрата S^* в культиваторе. Очевидно, что при использовании достаточно точного регулятора плотности популяции в турбидостате (см. выражение (3)) или его аналогов можно, в принципе, задать любую степень лимитирования роста популяции микроорганизмов недостатком определенного субстрата, т.е. так же, как и в хемостате, и даже исследовать субстратное ингибирование роста популяции, что в хемостате невозможно. Однако закономерности микроэволюции микробных популяций при длительном развитии в этих двух типах открытых систем, как мы увидим ниже, отличаются.

Экспериментальные эволюционные машины. Подчеркнем два важных отличия процессов микроэволюции в турбидостате и хемостате с точки зрения эволюции стационарных состояний в открытых термодинамических системах. По известной классификации М. Эйгена хемостат соответствует случаю постоянных потоков, а турбидостат – случаю постоянной организации [6]. Если в таких системах происходят эволюционные изменения, переход от одного стационарного состояния к другому в результате мутирования и естественного отбора, то направление и скорость микроэволюции популяции можно непосредственно связать с величиной степени ограничения развития популяции недостатком или избытком конкретного фактора внешней среды.

Кинетика накопления более активных мутантов, вытесняющих исходную форму из культиватора в результате естественного отбора (автоселекции), на первый взгляд, выглядит достаточно разнообразной. В турбидостате это – мутанты с повышенной максимальной удельной скоростью роста; более “резистентные” мутанты, т.е. способные расти с повышенной скоростью в условиях ингибирования роста. В зависимости от механизмов и мест ингибирования можно наблюдать широкий спектр мутантов, преодолевающих ограничение роста конкретными ингибиторами, токсикантами, антибиотиками. Для хемостата же более характерны мутанты с повышенным сродством к лимитирующему субстрату; более экономичные формы, экономно расходующие субстраты при их недостатке; более жизнеспособные мутанты, т.е. с пониженной скоростью отмирания и т.д. [3]. Однако, несмотря на кажущееся разнообразие эволюционных переходов в этих двух типах открытых систем, при их изучении обнаруживаются общие закономерности, наиболее характерной из которых в хемостате является снижение концентрации лимитирующего рост субстрата, и возрастание энергетического потока при лимитировании развития популяций недостатком субстрата-источника энергии в открытых системах обоих типов [7].

Эволюция самовоспроизводящихся молекулярных структур типа гиперциклов (замкнутых цепочек из ферментов и нуклеиновых кислот) в обоих типах открытых систем изучалась М. Эйгеном [6]. Он рассматривал

конкуренцию таких единиц в открытых системах при двух типах селекционных ограничений: постоянные потоки (аналог хемостата) и постоянная организация (аналог турбидостата). Близость его результатов к расчетам по кинетике эволюционных переходов в микробных популяциях в хемостате оказалась удивительной [8]. Рассмотрим этот случай подробнее, поскольку в экспериментах он наблюдается чаще всего.

Запишем систему уравнений для развития некоторой i -той мутантной популяции микроорганизмов X_i в хемостате, пренебрегая потоком обратных мутаций:

$$\begin{aligned} \frac{dX_i}{dt} &= \mu_i X_i - D X_i, \\ \frac{dS}{dt} &= D S_0 - \mu_i X_i / Y_i - D S, \\ \mu_i &= \mu_{max, i} S / (K_{s, i} + S), \end{aligned} \quad (5)$$

где X_i – плотность i -той мутантной популяции микроорганизмов; μ_i – удельная скорость размножения i -той мутантной популяции микроорганизмов; D – удельная скорость разбавления среды; S – концентрация субстрата в культиваторе; S_0 – концентрация субстрата в среде на входе в культиватор; Y_i – коэффициент экономичности использования субстрата микроорганизмами; $K_{s, i}$, $\mu_{max, i}$ – константы Моно для i -той мутантной популяции микроорганизмов.

Для стационарного состояния i -той мутантной популяции X_i , имеем следующие решения:

$$\begin{aligned} X_i^* &= Y_i (S_0 - S_i^*), \\ S_i^* &= K_{s, i} D / (\mu_{max, i} - D). \end{aligned} \quad (6)$$

Анализ показывает, что стационарное состояние i -той мутантной популяции (X_i^* , S_i^*) устойчиво по Ляпунову и глобально устойчиво в том случае, если S_i^* является наименьшей стационарной концентрацией лимитирующего рост субстрата по сравнению с аналогичными концентрациями для всех других популяций, включая исходную и всевозможные мутантные [9]. Это означает, что данная i -тая мутантная популяция X_i выигрывает в конкуренции за субстрат у всех остальных и устойчиво существует в хемостате до тех пор, пока не появится некоторая другая мутантная форма X_k , стационарная концентрация субстрата S_k^* для которой будет еще меньше: $S_k^* < S_i^*$. Таким образом, появление мутантов с повышенной скоростью роста в хемостате всегда приводит к снижению стационарной концентрации лимитирующего рост субстрата S_i^* .

Микроэволюционные переходы в турбидостате относятся пока к менее изученным и экспериментально, и теоретически. Поскольку в турбидостате поддерживается постоянная плотность популяции $X_0 = const$, то при неизменной концентрации субстрата на входе S_0 изменение экономичности использования субстрата Y у мутантной популяции должно, в принципе, привести к изменению стационарной концентрации субстрата S_i^* в турбидостате (ее еще называют «остаточной» концентрацией субстрата). Следовательно, при этом должна измениться и удельная скорость роста исходной и мутантной популяций, благодаря чему создается селективное преимущество мутантной формы по сравнению с исходной.

Анализ математической модели для турбидостата (см. выражения (1, 3, 5)) показывает, что остаточная концентрация субстрата у популяции мутанта, заместившего исходную популяцию в турбидостате, не всегда минимальна. Таким образом, классические хемостатные критерии микроэволюции и конкурентоспособности популяций, основанные на снижении остаточной концентрации субстрата или большем наклоне зависимости μ (S) у популяции, выигравшей в конкуренции, в турбидостате не выполняются [3]. Более общим критерием микроэволюции для обоих типов открытых систем (и для хемостата, и для турбидостата) при лимитировании роста популяций недостатком субстрата является возрастание потока субстрата, использованного популяцией, победившей в конкуренции [3]. Однако в случае ограничения роста популяций микроорганизмов избытком субстрата (субстратное ингибирование), которое тоже достаточно распространено в мире микроорганизмов, общей закономерностью микроэволюции в турбидостате, наоборот, является снижение потока токсичного субстрата, использованного популяцией.

Термодинамические критерии эволюции. Известно, что существование общих термодинамических критериев эволюции биологических систем как открытых систем вдали от равновесия само по себе вызывает сомнения [10]. Экспериментальные измерения скорости образования энтропии биологической системы в принципе можно сделать по скорости теплопродукции при необратимых изменениях в системе. Конечно, необходимо учитывать, что теплопродукция организмов зависит и от состояния мембранных структур, и от состояния энергетического метаболизма и т.д. [10]. Этим требованиям вполне отвечают стационарные состояния в непрерывной культуре микроорганизмов, в особенности микроэволюционные переходы, связанные с процессами перестройки генетической структуры популяции, такие как, например, потеря плазмид клетками генетически модифицированных микроорганизмов (ГМО), без изменения типа и состояния энергетического метаболизма клеток [11]. Удельная скорость теплопродукции популяции микроорганизмов в непрерывной культуре прямо пропорциональна удельной скорости роста популяции, или, в более общем случае, – потоку субстрата, использованного популяцией.

Таким образом, при переходе от одного стационарного состояния к другому в процессе микроэволюции микробных популяций в открытой системе с лимитированием роста недостатком энергетического субстрата удельная скорость теплопродукции, а с ней и скорость прироста энтропии должна возрастать, а не уменьшаться,

как полагают М. Эйген [6], Г. Николис и И. Пригожин [12], В. Эбелинг [13], А. И. Зотин с соавт. [14] и другие исследователи. Очевидное противоречие физических принципов развития открытых биологических систем и критериев, основанных на экспериментах с проточными популяциями микроорганизмов, требует дальнейшего развития термодинамической теории открытых биологических систем.

Список литературы / References:

1. Novick A., Szilard L. Description of the chemostat. *Science*, 1950, vol. 112, pp. 715-718.
2. Bryson V. Microbial selection. P. II. The turbidostatic selector – a device for automatic isolation of bacterial variants. *Science*, 1952, vol. 116, pp. 48-52.
3. Печуркин Н.С., Брильков А.В., Марченкова Т.В. *Популяционные аспекты биотехнологии*. Новосибирск: Наука, 1990, 173 с. [Pechurkin N.S., Brilkov A.V., Marchenkova T.V. *Population aspects of biotechnology*. Novosibirsk: Nauka, 1990, 173 p. (In Russ.)]
4. Gitelzon I.I., Pechurkin N.S., Brilkov A.V. *Population Problems in the Biology of Unicellular Organisms*. - London: Harwood Academic Publ. GmbH (United Kingdom), 1989, 77 p.
5. Monod J. La technique de culture continue. Theorie et applications. *Ann. Inst. Past.*, 1950, vol. 79, pp. 390-410.
6. Эйген М. *Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул*. М.: Мир, 1973, 216 с. [Eigen M. Self organization of matter and the evolution of biological macro molecules. *Naturwissenschaften*, 1971, vol. 58, no. 10, pp. 465-523.]
7. Wick L.M., Weilenmann H., Egli T. The apparent clock-like evolution of *Escherichia coli* in glucose-limited chemostats is reproducible at large but not at small population sizes and can be explained with Monod kinetics. *Microbiology*, 2002, vol. 148, pp. 2889-2902.
8. Печуркин Н.С., Никифорова Н.В., Дегерменджи А.Г. Сравнительный анализ эволюции гиперциклов Эйгена и микробных популяций в открытых системах. *Биофизика*, 1982, т. 27, № 2, с. 297-303. [Pechurkin N.S., Nikiforova N.V., Degermendzy A.G. The comparative analysis of evolution of the Eigens hypercycles and microbial populations in open systems. *Biophysics*, 1982, vol. 27, no. 2, pp. 297-303. (In Russ.)]
9. Hsu S.B., Hubbell S.P., Waltman P. A mathematical theory for single-nutrient competition in continuous cultures of microorganisms. *SIAM J. Appl. Maths.*, 1977, vol. 32, pp. 366-383.
10. Рубин А.Б. Термодинамика биологических процессов. *Сорос. образов. журн.*, 1998, № 10, с. 77-83. [Rubin A.B. Thermodynamics of biological processes. *Soros Ed. J.*, 1998, no. 10, pp. 77-83. (In Russ.)]
11. Ganusov V.V., Brilkov A.V. Estimating the instability parameters of plasmid-bearing cells. I. Chemostat culture. *Journal of Theoretical Biology*, 2002, vol. 219, no. 2, pp. 193-205.
12. Николис Г., Пригожин И. *Самоорганизация в неравновесных системах: от диссипативных структур к упорядоченности через флуктуации*. М.: Мир, 1979, 512 с. [Nikolis G., Prigogin I. *Self-organization in nonequilibrium systems: from dissipative structures to order through fluctuations*. М.: Mir, 1979, 512 p. (In Russ.)]
13. Эбелинг В., Энгель А., Файстель Р. *Физика процессов эволюции*. М.: Эдиториал УРСС, 2001, 328 с. [Ebeling V., Engel A., Feistel R. *Physics of evolution processes*. М.: Editorial URSS, 2001, 328 p. (In Russ.)]
14. Зотин А.И., Зотин А.А. *Направление, скорость и механизмы прогрессивной эволюции: Термодинамические и экспериментальные основы*. М.: Наука, 1999, 320 с. [Zotin A.I., Zotin A.A. *Direction, rate and mechanisms of progressive evolution: Thermodynamic and experimental bases*. М.: Nauka, 1999, 320 p. (In Russ.)]

СИСТЕМНЫЙ ПОДХОД В СОЗДАНИИ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ В БИОФИЗИКЕ.

Рыбалко С. Ю., Ислямов Р. И., Ященко С.Г.

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского»

бульвар Ленина 5/7, г. Симферополь, 295006, РФ

e-mail: kphis012@yandex.ua

Аннотация. В работе рассматривается процесс построения математических моделей применяемых в преподавании биофизики в высших медицинских учебных заведениях. Основное внимание уделяется системному анализу начального этапа создания математической модели. Разработан подход позволяющий детально прояснить поэтапную связь между логическим описанием условий создания модели и конечным математическим выражением. Это позволило создать простой и понятный алгоритм построения математических моделей на основе дифференциальных уравнений для описания и решения большого класса биологических, физических и медицинских задач. При демонстрации создания данных моделей акцентируется возможность творческого применения данного подхода студенческих научных исследованиях в медико-биологических дисциплинах.

Ключевые слова: Математическая модель, этапы, системный поход, преподавание.