

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.112.012:544.142.2

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-183-196>

Поступила в редакцию 22.03.2023

Received 22.03.2023

**А. А. Акуневич<sup>1</sup>, В. В. Хрусталёв<sup>1</sup>, Т. А. Хрусталёва<sup>2</sup>,  
Л. В. Кордюкова<sup>3</sup>, А. М. Арутюнян<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

<sup>3</sup>*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского  
Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова,  
Москва, Российская Федерация*

## **РОЛЬ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В ФОРМИРОВАНИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА**

**Аннотация.** Эпидермальный фактор роста (EGF) – пептид семейства EGF-подобных факторов роста с общим консервативным EGF-подобным доменом, формируемым тремя внутримолекулярными дисульфидными связями. В данной работе описаны изменения в пространственной структуре EGF и его мутантной форме с заменой D46G в С-концевом фрагменте, наблюдаемые при восстановлении дисульфидных связей соответствующих синтетических пептидов в 0,01 М фосфатном буфере (рН = 7,4). Для анализа структуры использовались спектроскопия кругового дихроизма, спектрофлуориметрия, нативный электрофорез в полиакриламидном геле, центрифужная ультрафильтрация. Показано, что восстановление дисульфидных связей изменяет геометрию EGF-подобного домена в сторону увеличения содержания бета-структуры при сохранении димерной формы пептидов. Согласно результатам молекулярного моделирования, при этом может произойти удлинение главной бета-шпильки EGF-подобного домена, межмолекулярной бета-структуры или образование новой бета-структуры между N- и С-концевыми фрагментами молекулы, что изменит поверхность межмолекулярного контакта в составе димера. Доказано, что восстановление дисульфидных связей препятствует диссоциации димеров EGF до мономеров. В физиологических условиях это может привести к неспособности EGF формировать сайты связывания с рецептором EGFR и вызывать его активацию.

**Ключевые слова:** эпидермальный фактор роста, дисульфидные связи, вторичная структура, структурный переход, спектроскопия

**Для цитирования:** Роль дисульфидных связей в формировании пространственной структуры эпидермального фактора роста человека / А. А. Акуневич [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 3. – С. 183–196. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-183-196>

**Anastasia A. Akunevich<sup>1</sup>, Vladislav V. Khrustalev<sup>1</sup>, Tatyana A. Khrustaleva<sup>2</sup>,  
Larisa V. Kordyukova<sup>3</sup>, Alexander M. Arutyunyan<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>3</sup>*A. N. Belozerski Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

## **THE ROLE OF DISULFIDE BONDS IN THE FORMATION OF THE SPATIAL STRUCTURE OF THE HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR**

**Abstract.** The epidermal growth factor (EGF) is a peptide of the EGF-like growth factor family with a common conserved EGF-like domain formed by three intramolecular disulfide bonds. This article describes changes in the spatial structure of EGF and its mutant form with the D46G substitution in its C-terminal fragment observed upon disulfide bonds reduction in the corresponding synthetic peptides in a 0.01 M phosphate buffer (pH = 7.4). The structure was analyzed using circular dichroism spectroscopy, spectrofluorimetry, native polyacrylamide gel electrophoresis, and centrifugal ultrafiltration. It was shown that disulfide bonds reduction changes the geometry of the EGF-like domain towards an increase in the content of the beta-structure, while these peptides remain in dimeric form. According to the molecular modeling results, this can lead to the elongation of the main beta-hairpin of the EGF-like domain, to the elongation of the intermolecular beta-structure, or to the formation of a new beta-structure between the N- and C-terminal fragments of each molecule, which will change the intermolecular interface in dimeric form. Disulfide bonds reduction prevents EGF dimer dissociation to monomers. Under physiological conditions, this can lead to the inability of EGF to form binding sites for EGFR (epidermal growth factor receptor) and to cause its activation.

**Keywords:** epidermal growth factor, disulfide bonds, secondary structure, structural transition, spectroscopy

**For citation:** Akunevich A. A., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A., Kordyukova L. V., Arutyunyan A. M. The role of disulfide bonds in the formation of the spatial structure of the human epidermal growth factor. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 3, pp. 183–196 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-183-196>

**Введение.** Эпидермальный фактор роста (EGF, от англ. *epidermal growth factor*) является олигопептидом семейства факторов роста, стимулирующих рост и дифференцировку эпителиальных клеток. Он состоит из 53 аминокислотных остатков и включает консенсусную последовательность – EGF-подобный домен. Данный домен является консервативным и состоит из шести остатков цистеина, формирующих три внутримолекулярные дисульфидные связи – C<sub>1</sub>–C<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>–C<sub>4</sub> и C<sub>5</sub>–C<sub>6</sub>: CX<sub>7</sub>CX<sub>4–5</sub>CX<sub>10–13</sub>CX<sub>8</sub>GXRC, где С – остатки цистеина, G – остаток глицина, R – остаток аргинина, X – другие аминокислотные остатки [1]. EGF-подобный домен состоит из главной бета-шпильки (антипараллельной бета-структуры, состоящей из двух бета-цепей), за которой следует петля к короткой С-концевой бета-шпильке [2]. С-концевые бета-цепи из короткой бета-шпильки образуют межмолекулярную бета-структуру в составе димерной формы EGF [3, 4]. EGF-подобный домен определяет пространственную структуру данных факторов роста и возможность высокоаффинного связывания с рецепторами семейства ErbB, в первую очередь с рецептором EGFR (от англ. *epidermal growth factor receptor*) [5]. EGF-подобные домены обнаруживаются также во внеклеточной части мембраносвязанных и некоторых секретируемых белков и часто встречаются в виде tandemных повторов, образующих соленоидные домены [2].

Пептиды семейства EGF-подобных факторов роста регулируют эмбриогенез, эпителизацию, иммунный ответ. Они также определяют развитие патологических процессов: эпителиальных опухолей, псориаза, хронической болезни почек (хронической почечной недостаточности) [5]. По этой причине EGF-подобные факторы роста широко используются в фундаментальных исследованиях и имеют большой потенциал для применения в биотехнологии: в частности, для разработки противоопухолевых биомолекул и препаратов для лечения диабетической стопы [6–8]. Ранее нами была получена мутантная форма EGF с аминокислотной заменой D46G в С-концевом фрагменте молекулы с целью дальнейшей разработки лиганда-антагониста EGFR, обладающего противоопухолевой активностью [4].

Дисульфидные связи образуются в окислительных условиях и играют важную роль в фолдинге и стабильности секретируемых белков. Правильное формирование дисульфидных связей зависит от равновесного окислительно-восстановительного потенциала компартмента: эндоплазматического ретикулума в эукариотических клетках либо периплазматического пространства в прокариотических клетках. В этом процессе участвуют тиол:дисульфид-оксидоредуктазы, протеин-дисульфид-изомеразы, тиоредоксины и другие белки [9]. Глутатион, основной антиоксидант внутриклеточной среды, выполняет функцию восстановителя в эндоплазматическом ретикулуме, защищая его среду в условиях гиперокисления [10].

Вопрос формирования дисульфидных связей имеет важное фундаментальное значение, поскольку раскрывает молекулярные механизмы развития заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием (мисфолдингом) белков, окислительным и восстановительным стрессом [11, 12]. Неспособность мутантных форм фибриллина-1 формировать дисульфидные связи в EGF-подобном домене приводит к развитию синдрома Марфана [13]. Мутантные формы интегринов  $\alpha\text{Pb}\beta\text{3}$  и  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  с неправильным паттерном дисульфидных связей EGF-подобного домена имеют низкий уровень экспрессии на поверхности клетки [14]. Мутации в гене *NOTCH3* приводят к изменению количества остатков цистеина в соответствующем белке и развитию церебральной аутосомно-доминантной артериопатии [15].

Из-за особой пространственной структуры, поддерживаемой тремя дисульфидными связями, производство рекомбинантных форм EGF-подобных факторов роста в прокариотических системах затруднено. Большая часть молекул рекомбинантного EGF образует тельца включения, а для его растворимой фракции характерно неправильное сворачивание (мисфолдинг) и неполное и/или неверное формирование дисульфидных связей [16]. Выявление структурных последствий неполного и/или неверного образования дисульфидных связей EGF-подобного домена способствует поиску решения этой проблемы, а следовательно, совершенствованию биофармацевти-

ческого производства, снижению производственных затрат, повышению качества и эффективности биологических препаратов.

Цель данной работы – описать изменения в формировании пространственной структуры эпидермального фактора роста и его варианта с заменой D46G в С-концевом фрагменте, наблюдаемые при восстановлении дисульфидных связей.

Задачи исследования: 1) оценить эффект восстановления дисульфидных связей на порядок олигомеров EGF и EGF D46G; 2) проанализировать вторичную структуру EGF и EGF D46G до и после восстановления дисульфидных связей; 3) смоделировать пространственную структуру невосстановленных и восстановленных форм EGF и EGF D46G.

**Объекты и методы исследования.** Для изучения структуры EGF и EGF D46G методами спектроскопии были использованы два пептида, полученные с помощью твердофазного химического синтеза по стандартному Fmoc-протоколу на автоматическом синтезаторе (Elabscience, Китай): человеческий EGF с нативной аминокислотной последовательностью (NSDSECLSHDG YCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR) и человеческий EGF с заменой D46G (соответствующее положение в аминокислотной последовательности выделено полужирным шрифтом). Образцы каждого из пептидов (700 мкг) растворяли в 1 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH = 7,4) в течение 12 ч при температуре 5 °С. Полученные насыщенные растворы центрифугировали при 16 000 g в течение 15 мин, после чего концентрация надосадочной жидкости была определена по коэффициенту молярной экстинкции при 280 нм. Концентрация EGF составляла 495 мкг/мл, EGF D46G – 358 мкг/мл. Восстановление дисульфидных связей осуществлялось путем добавления 2 мкл 0,5 М раствора трис(2-карбокситил)фосфина (TCEP) (Thermo Scientific, США) на 100 мкл каждого из растворов с последующим выдерживанием в течение 10 мин.

Фильтрацию анализируемых растворов до и после восстановления дисульфидных связей проводили через центрифужный ультрафильтр Vivaspin 500 (Sartorius, Германия) с полиэфирсульфоновой мембраной и порогом отсека по молекулярной массе 10,0 кДа при 12 000 g в течение 10 мин при комнатной температуре (20 °С).

Спектры кругового дихроизма (КД) регистрировали на спектрометре Chirascan CD (Applied Photophysics, Великобритания) в диапазоне от 190 до 260 нм при постепенном нагревании от 20 до 50 °С с шагом в 5 °С и со скоростью повышения температуры 1 °С в минуту. Длина оптического пути составляла 0,02 см. Для деконволюции полученных спектров использовали ресурс BeStSel (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) [17].

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Solar CM2203 при постепенном повышении температуры от 22 до 50 °С с шагом в 1 °С и ширине щелей 2 нм (исследование температурного тушения флуоресценции) и 5 нм (центрифужная ультрафильтрация). Каждый спектр был снят трижды, после чего усреднялся и сглаживался по пяти точкам. В состав EGF и EGF D46G входят два остатка триптофана (Trp49, Trp50), расположенные в С-концевом фрагменте цепи, и пять остатков тирозина (Tyr13, Tyr23, Tyr29, Tyr37, Tyr44). Чтобы учесть влияние флуоресценции тирозина на интенсивность флуоресценции триптофана, спектры снимали при  $\lambda_{\text{Ex}} = 280$  нм (соответствует флуоресценции суммы остатков тирозина и триптофана) и  $\lambda_{\text{Ex}} = 295$  нм (соответствует флуоресценции остатков триптофана) в диапазоне  $\lambda_{\text{Em}} = 300\text{--}400$  нм с шагом 1 нм.

Нативный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез) проводили согласно стандартному протоколу [18]. Цитохром *c* (свиной, сердце) (SERVA Electrophoresis, Германия) был выбран в качестве белка-маркера, поскольку в растворе он образует хорошо охарактеризованные мономерные (~12 кДа), димерные (~24 кДа), тримерные (~36 кДа) и тетрамерные (~48 кДа) формы [19]. Навески цитохрома *c* (200 мкг) и EGF (200 мкг) растворяли в 200 мкл катодного буфера (pH = 7,4) без добавления кумасси бриллиантового синего G-250 в течение 5 ч при 5 °С. Навеску EGF (200 мкг) для последующего восстановления дисульфидных связей также растворяли в 200 мкл катодного буфера (pH = 7,4) без добавления кумасси бриллиантового синего G-250 в тех же условиях, после чего вносили 4 мкл 0,5 М раствора TCEP (Thermo Scientific, США) и выдерживали в течение 10 мин. Затем в каждую пробу вносили по 30 мкл 2 %-ного раствора кумасси бриллиантового синего G, оставляли при 5 °С в течение 8 ч (конечная массовая

доля кумасси бриллиантового синего G составляла 0,26 %). В гель вносили по 40 мкл раствора, что соответствует 35 мкг каждого из исследуемых белков. Величину изоэлектрической точки (pI) EGF рассчитывали с помощью Isoelectric Point Calculator 2.0 (<http://ipc2.mimuw.edu.pl>) [20]. Разделяющий 10 %-ный ПААГ готовили с использованием 0,5 М Бис-Трис (pH = 7,4) буфера. Анодный буфер содержал 50 мМ Бис-Трис (pH = 7,4), катодный буфер – 50 мМ трицина, 15 мМ Бис-Триса и 0,02 % кумасси бриллиантового синего G-250 (pH = 7,4). Электрофорез осуществляли в условиях охлаждения в течение 4 ч в стандартной вертикальной установке для электрофореза с двойным охлаждением Hoefer SE600 (Hoefer Pharmacia Biotech, США). Нативный ПААГ-электрофорез проводили в течение 30 мин при 120 В и 20 мА, а после пересечения катодным буфером границы концентрирующего и разделяющего гелей – в течение 2,5 ч при 150 В и 20 мА. Полученные гели фиксировали смесью ледяной уксусной кислоты, этанола и воды (1 : 5 : 4) в течение 30 мин. Один из гелей окрашивали в 0,1 %-ном растворе кумасси бриллиантового синего R-250 в смеси ледяной уксусной кислоты, 96 %-ного раствора этилового спирта и воды (1 : 5 : 4) в течение 2 ч, после чего несколько раз промывали в течение суток смесью ледяной уксусной кислоты, 96 %-ного раствора этилового спирта и воды (1 : 1 : 8) по стандартному протоколу [18]. Второй гель окрашивали серебром по стандартному протоколу [21].

На основании данных спектроскопии были построены трехмерные модели, отражающие содержание элементов вторичной структуры в EGF и EGF D46G до и после восстановления дисульфидных связей. Моделирование осуществлялось на сервере I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) с последующей генерацией множества возможных конформаций пептидов на сервере 3DRobot (<https://zhanggroup.org/3DRobot/>). Принцип работы алгоритма I-TASSER основан на подборе структурных шаблонов из Protein Data Bank с последующим построением полно-размерных атомарных моделей из их фрагментов с помощью итеративного моделирования [22]. Генерация различных вариантов пространственной структуры пептида алгоритмом 3DRobot происходила на основании повторной сборки фрагментов загруженной модели с последующей двухэтапной итерацией для минимизации энергии [23]. В результате для каждого из пептидов было получено по 300 моделей, среди которых были выбраны те, что соответствовали данным, полученным при анализе спектров КД. Моделирование димеров восстановленных форм пептидов осуществлялось с помощью программы для белок-белкового докинга Hex 8.0.0 [24].

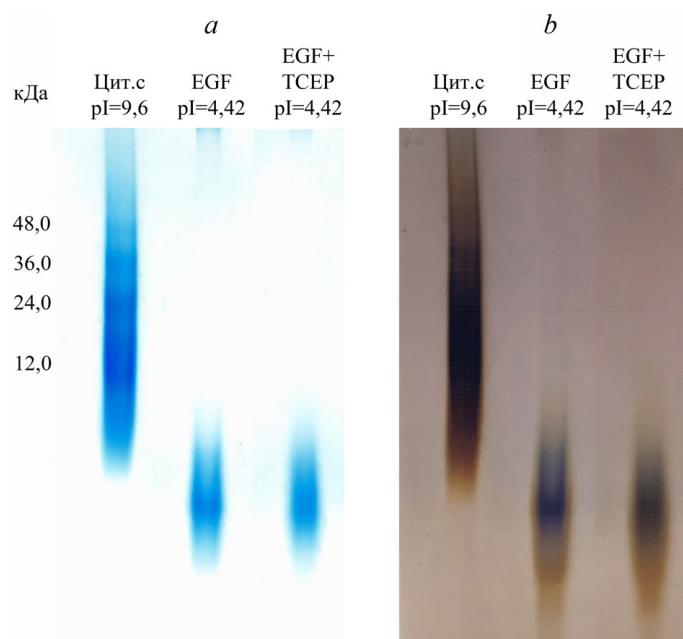


Рис. 1. Результаты нативного ПААГ-электрофореза невосстановленной и восстановленной форм EGF (pH = 7,4): окрашивание кумасси бриллиантовым синим R-250 (a) и серебром (b)

Fig. 1. Native PAGE of nonreduced and reduced EGF (pH = 7.4): staining with Coomassie brilliant blue R-250 (a) and silver (b)



**Результаты и их обсуждение.** Ранее нами было показано, что EGF и его мутантная форма с заменой D46G в 0,01 М фосфатном буфере (рН = 7,4) существуют преимущественно в состоянии димеров [4]. Молекулярная масса мономеров EGF и EGF D46G составляет 6,22 и 6,16 кДа, а молекулярная масса их димеров – 12,44 и 12,32 кДа соответственно. Замена D46G в С-концевом фрагменте EGF удлиняет межмолекулярную бета-структуру, что приводит к увеличению устойчивости данных димеров: их диссоциация не происходит при повышении температуры до 50 °С [4].

С помощью нативного ПААГ-электрофореза в настоящей работе доказано, что восстановление дисульфидных связей в структуре EGF не приводит к образованию олигомерных форм более высокого порядка и диссоциации димеров в 0,01 М фосфатном буфере (рН = 7,4). Как видно на рис. 1, димеры невосстановленного и восстановленного EGF мигрировали на большее расстояние, чем мономер цитохрома *c*, хотя их молекулярные массы примерно равны, что объясняется более низкой абсолютной величиной заряда цитохрома *c* (т. е. разницей между рI белка и рН буферного раствора).

Согласно данным центрифужной ультрафильтрации с порогом отсечения по молекулярной массе 10 кДа, восстановление дисульфидных связей приводит к выраженному увеличению устойчивости димерных форм пептидов. Сквозь данный фильтр проходят только мономеры невосстановленной формы EGF (рис. 2), о чем свидетельствует характерный для пептида спектр флуоресценции в фильтрате с двумя максимумами при длинах волн около 330 и 357 нм [4, 25].

Восстановление дисульфидных связей в структуре EGF D46G также не приводит к диссоциации его димерной формы: спектры флуоресценции, характерные для данного пептида, не были зарегистрированы в фильтрате.

При повышении температуры с 22 до 50 °С наблюдается выраженный батохромный сдвиг в спектре флуоресценции невосстановленного EGF: максимум эмиссии сдвигается с 330 на 357 нм. В невосстановленном EGF эмиссия на длине волны 357 нм начинает преобладать при 31 °С ( $\lambda_{\text{Ex}} = 280$  нм) и 27 °С ( $\lambda_{\text{Ex}} = 295$  нм) (рис. 3). Микроокружение остатков триптофана в мутантном EGF D46G более гидрофобно: эмиссия на длине волны 357 нм начинает преобладать при 40 °С ( $\lambda_{\text{Ex}} = 280$  нм) и 34 °С ( $\lambda_{\text{Ex}} = 295$  нм) (рис. 4).

При восстановлении дисульфидных связей выраженного батохромного сдвига при нагревании не наблюдается. В восстановленном EGF прирост эмиссии на длине волны 357 нм проис-

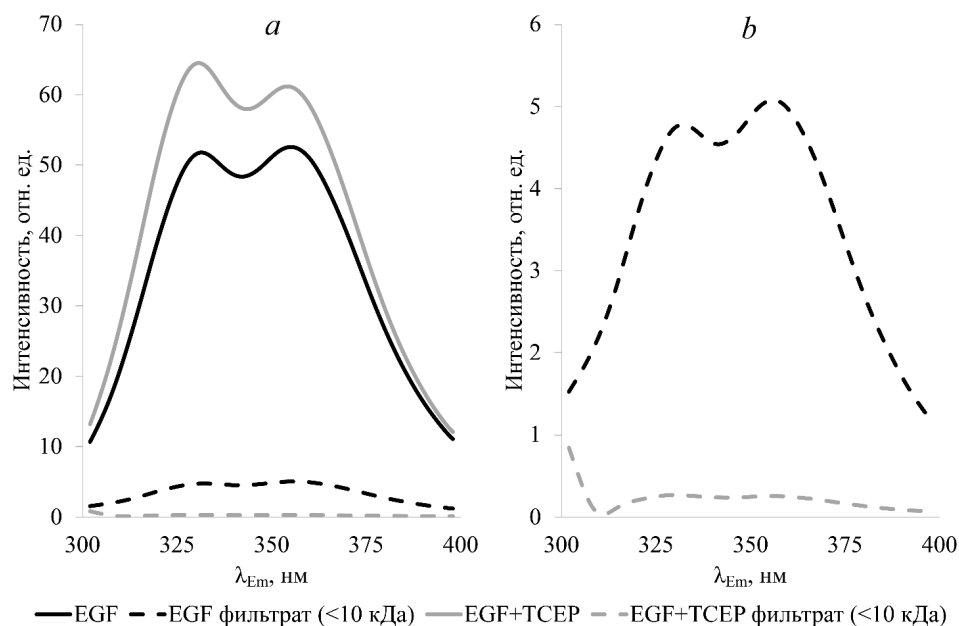


Рис. 2. Спектры флуоресценции нативного EGF и его фильтрата (а), а также исключительно фильтрата (б) до и после восстановления дисульфидных связей (рН = 7,4; 20 °С;  $\lambda_{\text{Ex}} = 280$  нм)

Fig. 2. Fluorescence spectra of native EGF and its filtrate (a), as well as filtrate alone (b) before and after disulfide bonds reduction (рН = 7.4; 20 °С;  $\lambda_{\text{Ex}} = 280$  nm)

ходит монотонно: соотношение интенсивностей при 330 и 357 нм достигает единицы при 50 °С (см. рис. 3). В восстановленном EGF D46G прирост эмиссии на длине волны 357 нм происходит монотонно до 37 °С при возбуждении на обеих длинах волн. Тем не менее соотношение интенсивностей при 330 и 357 нм не достигает единицы, а, напротив, уменьшается при нагревании пептида выше 40 °С (рис. 4).

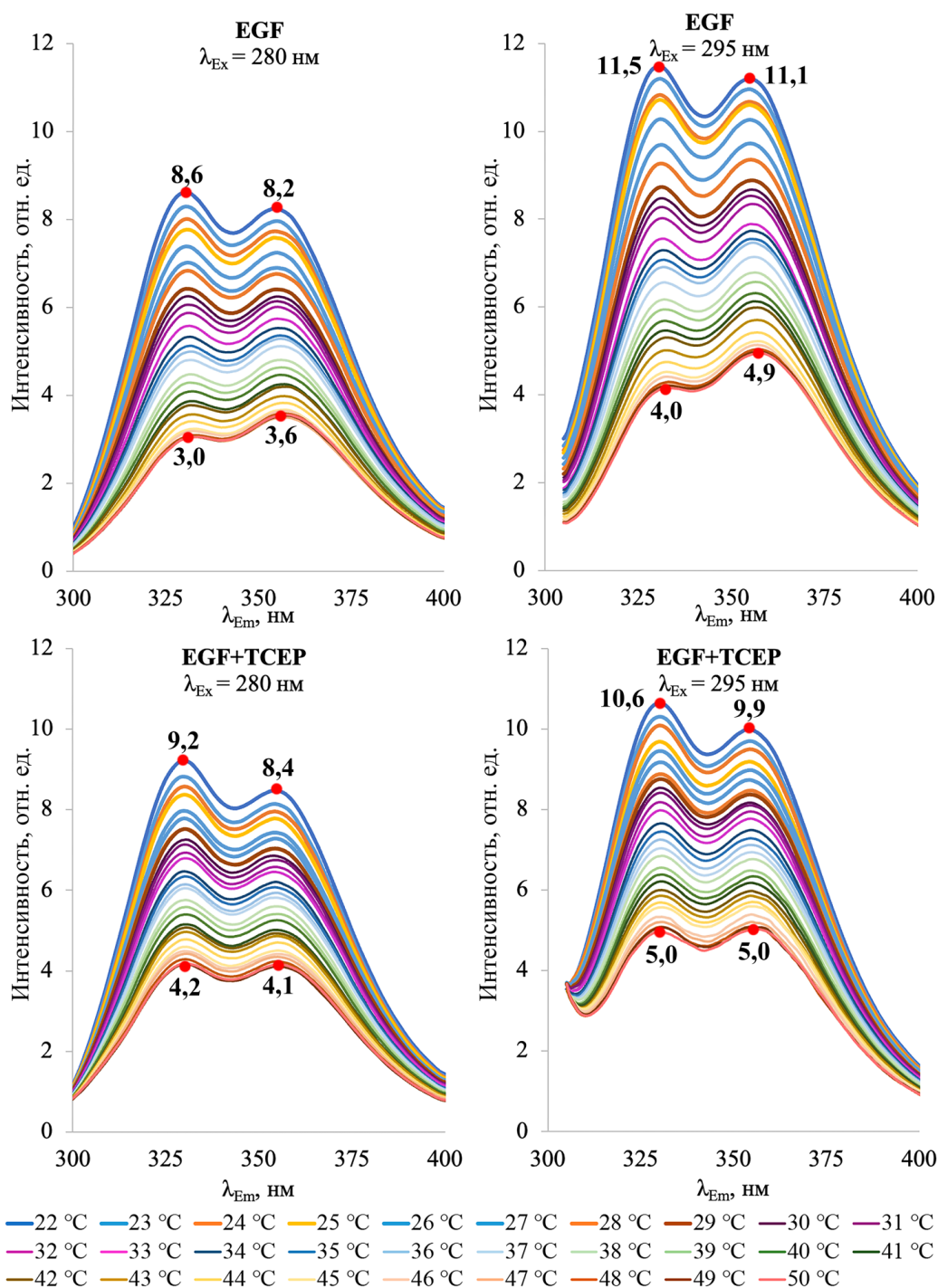


Рис. 3. Спектры флуоресценции EGF до и после восстановления дисульфидных связей в диапазоне температур от 22 до 50 °С (pH = 7,4)

Fig. 3. EGF fluorescence spectra before and after disulfide bonds reduction in the temperature range from 22 to 50 °С (pH = 7.4)

Выражанный батохромный сдвиг в невосстановленном EGF свидетельствует о том, что остатки триптофана данного пептида выходят в более полярное микроокружение и дестабилизируются в результате взаимодействия с молекулами растворителя, что происходит вследствие диссоциации димеров при нагревании. Напротив, отсутствие выраженного батохромного сдвига в спектрах флуоресценции восстановленных пептидов свидетельствует о том, что при повышении

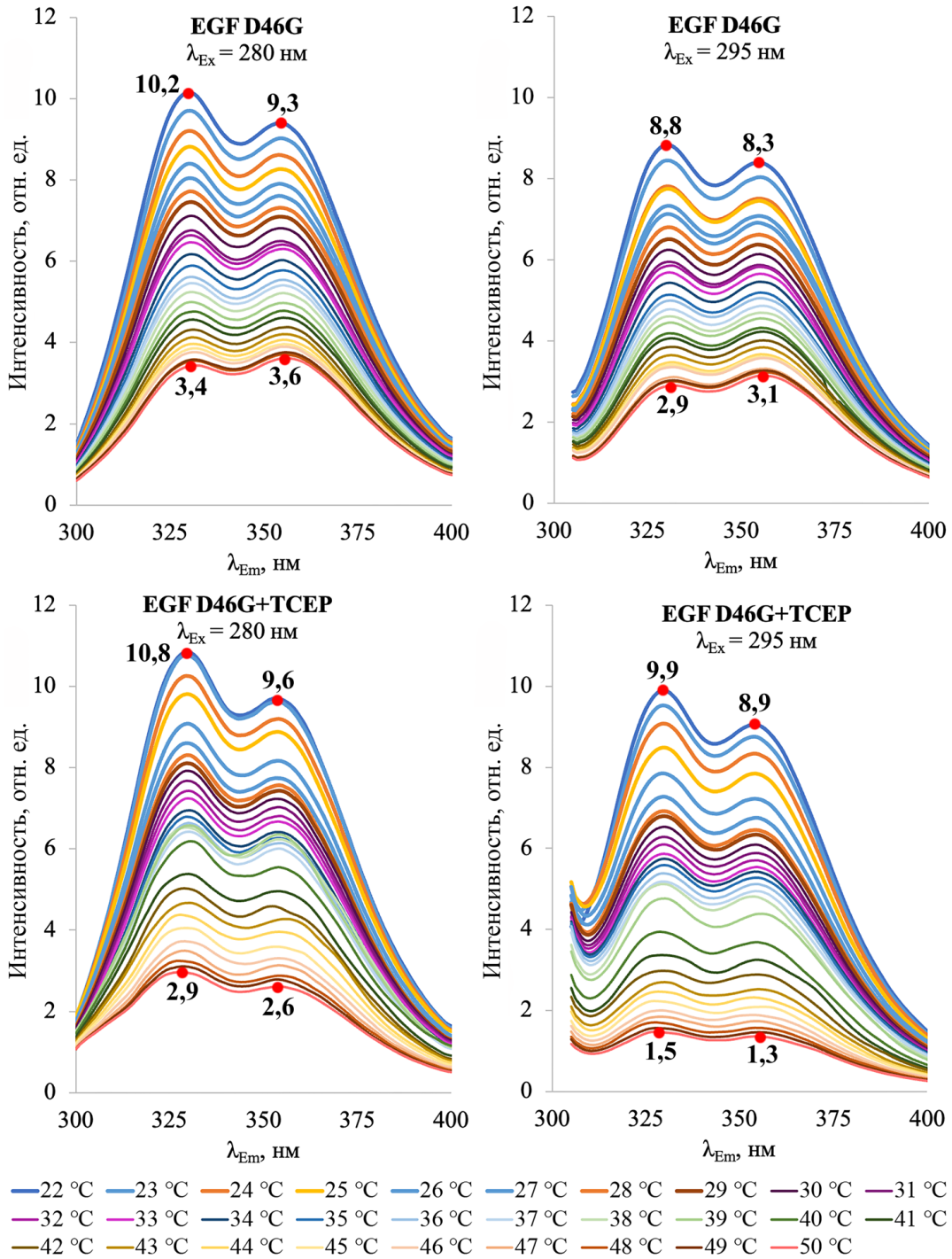


Рис. 4. Спектры флуоресценции EGF D46G до и после восстановления дисульфидных связей в диапазоне температур от 22 до 50 °C (pH = 7,4)

Fig. 4. EGF D46G fluorescence spectra before and after disulfide bonds reduction in the temperature range from 22 to 50 °C (pH = 7.4)

температуры остатки триптофана продолжают находиться в гидрофобном микроокружении, возможно, в составе межмолекулярной бета-структуры, формируемой димерной формой пептида, или же в других более гидрофобных условиях. Данное изменение в спектре флуоресценции также хорошо заметно на рис. 2: восстановление дисульфидных связей в EGF приводит к сдвигу максимума флуоресценции с 357 к 330 нм.

Поскольку замена D46G в С-концевом фрагменте EGF реорганизует и стабилизирует межмолекулярную бета-структуру в составе димера, происходит перенос энергии между остатками тирозина и триптофана, расположенными в данной области: в отличие от спектров флуоресценции EGF, для его мутантной формы с заменой D46G характерна более интенсивная суммарная эмиссия остатков триптофана и тирозина ( $\lambda_{\text{Ex}} = 280$  нм), чем эмиссия только лишь остатков триптофана ( $\lambda_{\text{Ex}} = 295$  нм) [4]. Восстановление дисульфидных связей не влияет на эффективность данного переноса: интенсивность флуоресценции EGF D46G при  $\lambda_{\text{Ex}} = 280$  нм выше, чем при

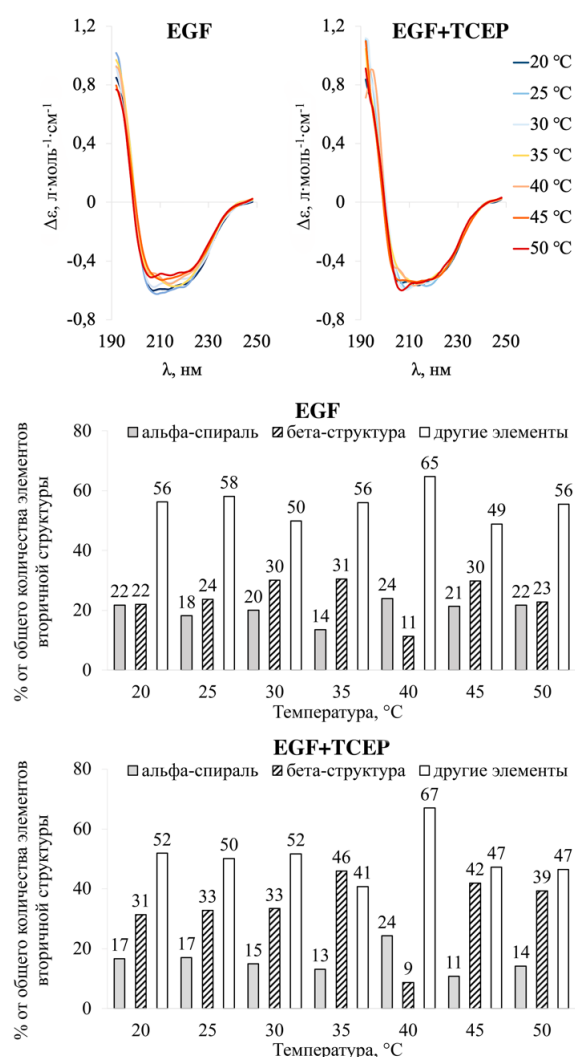


Рис. 5. Спектры КД EGF до и после восстановления дисульфидных связей в диапазоне температур от 20 до 50 °C, а также диаграммы, отражающие содержание элементов вторичной структуры EGF при данных температурах (pH = 7,4)

Fig. 5. EGF CD spectra before and after disulfide bonds reduction in the temperature range from 20 to 50 °C and diagrams reflecting the EGF secondary structure content at these temperatures (pH = 7.4)

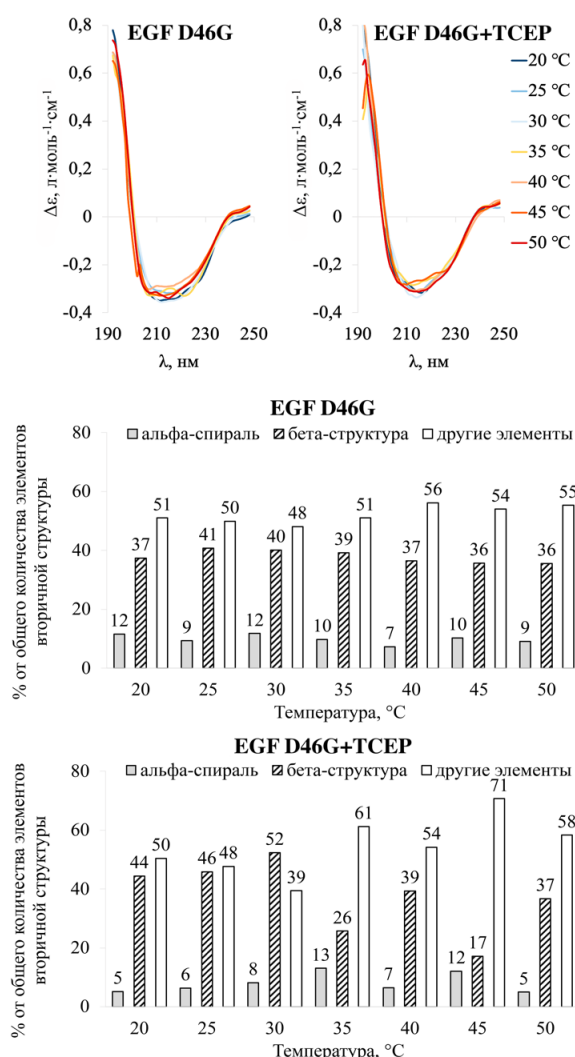


Рис. 6. Спектры КД EGF D46G до и после восстановления дисульфидных связей в диапазоне температур от 20 до 50 °C, а также диаграммы, отражающие содержание элементов вторичной структуры EGF D46G при данных температурах (pH = 7,4)

Fig. 6. EGF D46G CD spectra before and after disulfide bonds reduction in the temperature range from 20 to 50 °C and diagrams reflecting the EGF D46G secondary structure content at these temperatures (pH = 7.4)



$\lambda_{\text{Ex}} = 295$  нм (рис. 4), что свидетельствует о сохранении коротких дистанций между остатками тирозина и триптофана.

Помимо этого, восстановление дисульфидных связей приводит к общему увеличению интенсивности флуоресценции (см. рис. 2–4), что объясняется возможностью формирования SH-π-взаимодействий и изменения пространственного расположения флуорофоров, расположенных вблизи восстанавливаемых дисульфидных связей [26]. Ранее нами было показано, что восстановление дисульфидных связей в структуре нативного EGF приводит к отдалению некоторых ароматических аминокислотных остатков от NH-групп пептидных связей. Данные остатки расположены в пределах 5,0 Å от дисульфидных связей и контактируют с NH-группами основной цепи в пределах 5,7 Å. Вблизи дисульфидной связи Cys6–Cys20 расположены остатки Tyr13, Tyr22, Tyr29, вблизи Cys14–Cys31 – остатки Tyr13, вблизи Cys33–Cys42 – остатки Tyr37 [27].

Восстановление дисульфидных связей нативного EGF приводит к увеличению количества аминокислотных остатков в составе бета-структуры: их количество, усредненное для всего температурного диапазона, достоверно выше ( $p = 0,012$ ) в восстановленном EGF ( $33,4 \pm 9,0$  %), чем в невосстановленном EGF ( $24,3 \pm 5,1$  %) (рис. 5). При увеличении температуры от 35 до 40 °C для невосстановленного EGF характерны выраженные структурные переходы от упорядоченной бета-структуры к неупорядоченной структуре (англ. *random coil*) [4]. Однако при увеличении температуры от 40 до 45 °C соотношение аминокислотных остатков в составе альфа-спиралей и бета-структур возвращается к прежнему уровню [4]. Описанный переход к неструктурированному состоянию при 40 °C (pH = 7,4) обеспечивает формирование сайтов связывания с рецептором EGFR в структуре лиганда. Ранее нами было описано, что данный структурный переход затрагивает N-концевую часть EGF, обеспечивающую связывание с III доменом рецептора EGFR, и не затрагивает C-концевую межмолекулярную бета-структуру, поскольку полная диссоциация димеров при температуре, близкой к физиологической, не наблюдалась [4]. Восстановленная форма EGF сохраняет способность к переходу в неструктурированное состояние, несмотря на достоверно более высокое содержание аминокислотных остатков в составе бета-структуры.

Восстановление дисульфидных связей приводит к дезорганизации EGF D46G при нагревании выше 40 °C, поскольку количество аминокислотных остатков в составе неупорядоченных фрагментов становится выше их количества в составе бета-структур и альфа-спиралей. Тем не менее в диапазоне температур от 20 до 40 °C не было обнаружено достоверных отличий ( $p = 0,563$ ) в содержании бета-структур в восстановленном EGF D46G ( $41,5 \pm 10,0$  %) и невосстановленном EGF D46G ( $38,8 \pm 1,8$  %) (рис. 6).

Основными элементами вторичной структуры, определяющими пространственное строение EGF и наблюдаемыми при различных значениях pH, являются главная антипараллельная бета-шпилька, формируемая двумя бета-цепями – Val19–Ile23 и Lys28–Asn32, а также короткая антипараллельная бета-шпилька, формируемая короткими бета-цепями Tyr37–Ile38 и Tyr44–Arg45 [2, 3]. Согласно полученным данным, в результате восстановления дисульфидных связей в среднем около пяти аминокислотных остатков перешли в бета-структурное состояние в EGF, около четырех – в EGF D46G. Описанное увеличение числа остатков в бета-структуре может быть следствием образования новой бета-цепи и/или удлинения уже существующих (главной бета-шпильки и/или C-концевой бета-шпильки). Наиболее вероятным является удлинение C-концевой межмолекулярной бета-структуры, поскольку предыдущие эксперименты показали повышение стабильности димерных форм пептидов и сохранение эффекта переноса энергии между остатками тирозина и триптофана, которые находятся в C-концевом фрагменте полипептида.

На рис. 7 приведены модели мономеров и димеров изучаемых пептидов, которые могут наблюдаться в растворе при pH = 7,4 и температуре до 30 °C. Замена D46G вызывает переход короткой C-концевой альфа-спирали Leu47–Leu52 в межмолекулярную бета-структуру, образованную бета-цепями Gln43–Arg45 и Trp50–Leu52 [4]. Разрыв дисульфидной связи Cys6–Cys20 должен приводить к выраженному повышению мобильности N-концевого фрагмента EGF (Ser2–Asp11).



Обращение бета-структуры между N- и C-концевым фрагментами восстановленного EGF может препятствовать связыванию их мономеров с рецептором EGFR. При физиологической температуре восстановленный EGF, вероятно, также не способен формировать N-концевые сайты связывания с III доменом рецептора EGFR, хотя способность претерпевать структурный переход, характерный для его невосстановленной формы, сохраняется.

Замена D46G в C-концевом фрагменте EGF повышает стабильность димеров и предотвращает переход в неупорядоченное состояние, характерное для нативного EGF при 40 °С. Повышение ригидности пептидной цепи и стабилизация димерной формы при одновременном сохранении N-концевых сайтов связывания с рецептором может снижать агонистическую активность мутантной формы EGF. Данное свойство мутантной формы пептида в перспективе может быть рассмотрено для использования в фармацевтической практике с целью снижения избыточной пролиферации клеток при неопластических трансформациях. Однако восстановление дисульфидных связей такой мутантной формы EGF может и вовсе лишить его способности связываться с рецептором вследствие удлинения бета-структуры EGF-подобного домена и/или образования бета-структуры между N- и C-концевым фрагментами. Помимо этого, выраженная ригидность EGF-подобного домена восстановленной формы EGF D46G может не позволить сформировать сайты связывания с I доменом рецептора.

**Заключение.** Восстановление дисульфидных связей EGF и его варианта с заменой D46G в C-концевом фрагменте приводит к увеличению количества аминокислотных остатков в составе бета-структур в насыщенном растворе пептидов в 0,01 М фосфатном буфере (pH = 7,4). Это может быть связано с переходом короткой N-концевой альфа-спирали Pro7–Asp11 в короткую бета-цепь Ser2–Ser4, с удлинением главной бета-шпильки EGF-подобного домена, а также с увеличением межмолекулярной бета-структуры. Формируемая при восстановлении дисульфидных связей бета-цепь (Ser2–Ser4) способна сближаться с C-концевой бета-цепью (Leu47–Arg53) для образования бета-структуры из трех бета-цепей, что приводит к повороту молекул в составе димеров восстановленных форм EGF и EGF D46G и изменению поверхности межмолекулярного контакта. Удлинение и реорганизация межмолекулярной бета-структуры стабилизирует и резко снижает способность димеров восстановленной формы EGF к диссоциации. Таким образом, восстановление дисульфидных связей в физиологических условиях может привести к неспособности EGF диссоциировать до мономеров, формировать сайты связывания с EGFR и вызывать его активацию.

### Список использованных источников

1. Carpenter, G. Epidermal growth factor / G. Carpenter, S. Cohen // *Ann. Rev. Biochem.* – 1979. – Vol. 48. – P. 193–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.001205>
2. Evolution of distinct EGF domains with specific functions / M. A. Wouters [et al.] // *Protein Sci.* – 2005. – Vol. 14, N 4. – P. 1091–1103. <https://doi.org/10.1110/ps.041207005>
3. Crystal structure of human epidermal growth factor and its dimerization / H. S. Lu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 37. – P. 34913–34917. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102874200>
4. Equilibrium between dimeric and monomeric forms of human epidermal growth factor is shifted towards dimers in a solution / A. A. Akunevich [et al.] // *Protein J.* – 2022. – Vol. 41, N 2. – P. 245–259. <https://doi.org/10.1007/s10930-022-10051-y>
5. Wieduwilt, M. J. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics / M. J. Wieduwilt, M. M. Moasser // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – Vol. 65, N 10. – P. 1566–1584. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7440-8>
6. Zhang, A. Improved anti-cancer effect of epidermal growth factor-gold nanoparticle conjugates by protein orientation through site-specific mutagenesis / A. Zhang, J. Nakanishi // *Sci. Technol. Adv. Mater.* – 2021. – Vol. 22, N 1. – P. 616–626. <https://doi.org/10.1080/14686996.2021.1944783>
7. Efficacy and safety of recombinant human epidermal growth factor for diabetic foot ulcers: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials / D. Y. Zhao [et al.] // *Int. Wound J.* – 2020. – Vol. 17, N 4. – P. 1062–1073. <https://doi.org/10.1111/iwj.13377>
8. Tombling, B. J. EGF-like and other disulfide-rich microdomains as therapeutic scaffolds / B. J. Tombling, C. K. Wang, D. J. Craik // *Angewandte Chem. Int. Ed.* – 2020. – Vol. 59, N 28. – P. 11218–11232. <https://doi.org/10.1002/anie.201913809>

9. Robinson, P. J. Mechanisms of disulfide bond formation in nascent polypeptides entering the secretory pathway / P. J. Robinson, N. J. Bulleid // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, N 1994. – P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/cells9091994>
10. Мартинович, Г. Г. Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г. Г. Мартинович, С. Н. Черенкевич. – Минск : БГУ, 2008. – 159 с.
11. Imbalance of heterologous protein folding and disulfide bond formation rates yields runaway oxidative stress / K. E. Tyo [et al.] // *BMC Biol.* – 2012. – Vol. 10. – Art. 16. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-16>
12. Pérez-Torres, I. Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents / I. Pérez-Torres, V. Guarner-Lans, M. E. Rubio-Ruiz // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, N 10. – Art. 2098. <https://doi.org/10.3390/ijms18102098>
13. Case report: Biochemical and clinical phenotypes caused by cysteine substitutions in the epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1 / X. Liu [et al.] // *Front. Gen.* – 2022. – Vol. 13. – Art. 928683. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.928683>
14. Unique disulfide bonds in epidermal growth factor (EGF) domains of  $\beta 3$  affect structure and function of  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  and  $\alpha \text{v}\beta 3$  integrins in different manner / R. Mor-Cohen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, N 12. – P. 8879–8891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.311043>
15. Trans-reduction of cerebral small vessel disease proteins by notch-derived EGF-like sequences / N. M. P. Cartee [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, N 3671. – P. 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms23073671>
16. Recombinant human epidermal growth factor inclusion body solubilization and refolding at large scale using expanded-bed adsorption chromatography from *Escherichia coli* / K. Sharma [et al.] // *Protein Expression and Purification*. – 2008. – Vol. 60, N 1. – P. 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.02.020>
17. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra / A. Micsonai [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2018. – N 46. – P. 315–322. <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>
18. Wittig, I. Blue native PAGE / I. Wittig, H. P. Braun, H. Schägger // *Nat. Protocols*. – 2006. – Vol. 1, N 1. – P. 418–428. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.62>
19. Cytochrome c polymerization by successive domain swapping at the C-terminal helix / S. Hirota [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 107, N 29. – P. 12854–12859. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001839107>
20. Kozłowski, L. P. IPC 2.0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants / L. P. Kozłowski // *Nucl. Acids Res.* – 2021. – Vol. 49, N 1. – P. 285–292. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab295>
21. Chevallet, M. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels / M. Chevallet, S. Luche, T. Rabilloud // *Nat. Protocols*. – 2006. – Vol. 1, N 4. – P. 1852–1858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>
22. Yang, J. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions / J. Yang, Y. Zhang // *Nucl. Acids Res.* – 2015. – N 43. – P. 174–181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
23. Deng, H. 3DRobot: automated generation of diverse and well-packed protein structure decoys / H. Deng, Y. Jia, Y. Zhang // *Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 32 (3). – P. 378–387. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv601>
24. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors / G. Macindoe [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2010. – N 38. – P. 445–449. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq311>
25. Spectra of tryptophan fluorescence are the result of co-existence of certain most abundant stabilized excited state and certain most abundant destabilized excited state / V. V. Khrustalev [et al.] // *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2021. – Vol. 257, art. 119784. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119784>
26. Lakowicz, J. Principles of fluorescence spectroscopy / J. Lakowicz. – New York : Springer, 2006. – 954 p.
27. Акуневич, А. А. Оценка последствий восстановления дисульфидных связей на расположение ароматических аминокислотных остатков в третичной структуре эпидермального фактора роста человека / А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв, Т. А. Хрусталёва // *Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине : сб. науч. тр. 2-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Санкт-Петербург, 2–3 дек. 2021 г. / Сев.-Зап. гос. мед. ун-т им. И. И. Мечникова ; ред. Л. Б. Гайковская [и др]. – СПб., 2021. – С. 21–28.*

## References

1. Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, 1979, vol. 48, pp. 193–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.001205>
2. Wouters M. A., Rigoutsos I., Chu C. K., Feng L. L., Sparrow D. B., Dunwoodie S. L. Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Science*, 2005, vol. 14, no. 4, pp. 1091–1103. <https://doi.org/10.1110/ps.041207005>
3. Lu H. S., Chai J. J., Li M., Huang B. R., He C. H., Bi R. C. Crystal structure of human epidermal growth factor and its dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 37, pp. 34913–34917. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102874200>
4. Akunevich A. A., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A., Poboinev V. V., Shalygo N. V., Stojarov A. N., Arutyunyan A. M., Kordyukova L. V., Sapon Y. G. Equilibrium between dimeric and monomeric forms of human epidermal growth factor is shifted towards dimers in a solution. *Protein Journal*, 2022, vol. 41, no. 2, pp. 245–259. <https://doi.org/10.1007/s10930-022-10051-y>
5. Wieduwilt M. J., Moasser M. M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, vol. 65, no. 10, pp. 1566–1584. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7440-8>



6. Zhang A., Nakanishi J. Improved anti-cancer effect of epidermal growth factor-gold nanoparticle conjugates by protein orientation through site-specific mutagenesis. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2021, vol. 22, no. 1, pp. 616–626. <https://doi.org/10.1080/14686996.2021.1944783>
7. Zhao D. Y., Su Y. N., Li Y. H., Yu T. Q., Li J., Tu C. Q. Efficacy and safety of recombinant human epidermal growth factor for diabetic foot ulcers: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *International Wound Journal*, 2020, vol. 17, no. 4, pp. 1062–1073. <https://doi.org/10.1111/iwj.13377>
8. Tombling B. J., Wang C. K., Craik D. J. EGF-like and other disulfide-rich microdomains as therapeutic scaffolds. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, vol. 59, no. 28, pp. 11218–11232. <https://doi.org/10.1002/anie.201913809>
9. Robinson P. J., Bulleid N. J. Mechanisms of disulfide bond formation in nascent polypeptides entering the secretory pathway. *Cells*, 2020, vol. 9, no. 9, pp. 1–13. <https://doi.org/10.3390/cells9091994>
10. Martinovich G. G., Cherenkevich S. N. *Redox processes in cells*. Minsk, Belarusian State University, 2008. 159 p. (in Russian).
11. Tyo K. E., Liu Z., Petranovic D., Nielsen J. Imbalance of heterologous protein folding and disulfide bond formation rates yields runaway oxidative stress. *BMC Biology*, 2012, vol. 10, art. 16. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-16>
12. Pérez-Torres I., Guarner-Lans V., Rubio-Ruiz M. E. Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, vol. 18, no. 10, art. 2098. <https://doi.org/10.3390/ijms18102098>
13. Liu X., Liu K., Nie D., Zhang J., Zhang L., Liu X., Wang J. Case report: Biochemical and clinical phenotypes caused by cysteine substitutions in the epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1. *Frontiers in Genetics*, 2022, vol. 13, art. 928683. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.928683>
14. Mor-Cohen R., Rosenberg N., Einav Y., Zelzion E., Landau M., Mansour W., Averbukh Y., Seligsohn U. Unique disulfide bonds in epidermal growth factor (EGF) domains of  $\beta 3$  affect structure and function of  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  and  $\alpha \text{v}\beta 3$  integrins in different manner. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, no. 12, pp. 8879–8891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.311043>
15. Cartee N. M. P., Lee S. J., Young K. Z., Zhang X., Wang M. M. Trans-reduction of cerebral small vessel disease proteins by notch-derived EGF-like sequences. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, vol. 23, no. 3671, pp. 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms23073671>
16. Sharma K., Babu P. V., Sasidhar P., Srinivas V. K., Mohan V. K., Krishna E. Recombinant human epidermal growth factor inclusion body solubilization and refolding at large scale using expanded-bed adsorption chromatography from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2008, vol. 60, no. 1, pp. 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.02.020>
17. Micsonai A., Wien F., Bulyáki É., Kun J., Moussong É., Lee Y. H., Goto Y., Réfrégiers M., Kardos J. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research*, 2018, no. 46, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>
18. Wittig I., Braun H. P., Schägger H. Blue native PAGE. *Nature Protocols*, 2006, vol. 1, no. 1, pp. 418–428. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.62>
19. Hirota S., Hattori Y., Nagao S., Taketa M., Komori H., Kamikubo H. [et al.]. Cytochrome c polymerization by successive domain swapping at the C-terminal helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, no. 29, pp. 12854–12859. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001839107>
20. Kozłowski L. P. IPC 2.0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants. *Nucleic Acids Research*, 2021, vol. 49, no. 1, pp. 285–292. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab295>
21. Chevallet M., Luche S., Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 2006, vol. 1, no. 4, pp. 1852–1858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>
22. Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 2015, no. 43, pp. 174–181. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>
23. Deng H., Jia Y., Zhang Y. 3DRobot: automated generation of diverse and well-packed protein structure decoys. *Bioinformatics*, 2016, vol. 32 (3), pp. 378–387. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv601>
24. Macindoe G., Mavridis L., Venkatraman V., Devignes M. D., Ritchie D. W. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors. *Nucleic Acids Research*, 2010, no. 38, pp. 445–449. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq311>
25. Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A., Poboinev V. V., Stojarov A. N., Kordyukova L. V., Akunevich A. A. Spectra of tryptophan fluorescence are the result of co-existence of certain most abundant stabilized excited state and certain most abundant destabilized excited state. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, vol. 257, art. 119784. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119784>
26. Lakowicz J. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York, Springer, 2006. 954 p.
27. Akunevich A. A., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A. Evaluation of the consequences of disulfide bonds reduction on the positions of aromatic amino acid residues in the human epidermal growth factor tertiary structure. *Sovremennye dostizheniya khimiko-biologicheskikh nauk v profilakticheskoi i klinicheskoi meditsine: sbornik nauchnykh trudov 2-i Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (Sankt-Peterburg, 2–3 dekabrya 2021 goda)* [Modern achievements of chemical and biological sciences in preventive and clinical medicine: collection of scientific papers of the 2nd All-Russian scientific and practical conference with international participation (St. Petersburg, December 2–3, 2021)]. Saint Petersburg, 2021, pp. 21–28 (in Russian).

### Информация об авторах

*Акуневич Анастасия Александровна* – аспирант. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: akunevichna@gmail.com

*Хрусталёв Владислав Викторович* – д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru

*Хрусталёва Татьяна Александровна* – канд. биол. наук, ученый секретарь. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tanissia.lir@gmail.com

*Кордюкова Лариса Валентиновна* – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (Ленинские горы, 1-40, 119991, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: kord@belozersky.msu.ru

*Арутюнян Александр Мигранович* – канд. физ.-мат. наук, доцент, заведующий лабораторией. Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (Ленинские горы, 1-40, 119991, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: alarut@belozersky.msu.ru

### Information about the authors

*Anastasia A. Akunevich* – Postgraduate student. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: akunevichna@gmail.com.

*Vladislav V. Khrustalev* – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru

*Tatyana A. Khrustaleva* – Ph. D. (Biol.), Scientific Secretary. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tanissia.lir@gmail.com

*Larisa V. Kordyukova* – D. Sc. (Biol.), Leading Researcher. A. N. Belozerski Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University (1-40, Leninskiye gory, 119991, Moscow, Russian Federation). E-mail: kord@belozersky.msu.ru

*Alexander M. Arutyunyan* – Ph. D. (Phys.-Math.), Associate Professor, Head of the Laboratory. A. N. Belozerski Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University (1-40, Leninskiye gory, 119991, Moscow, Russian Federation). E-mail: alarut@belozersky.msu.ru