



**НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ,
БИОЛОГИИ, ФАРМАКОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ
NOVEL TECHNOLOGIES IN MEDICINE, BIOLOGY, PHARMACOLOGY
AND ECOLOGY**

материалы Международной конференции

NT+ME `25

Крым, Ялта-Гурзуф, с 1 июня по 8 июня 2025 года

ISBN 978-5-6044060-5-2



9 785604 406052

Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`25 (Гурзуф, с 1 июня по 8 июня 2025 г.). 2025.336 с.
ISBN 978-5-6044060-5-2

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОРГКОМИТЕТ

Председатель – Е.Л. Глориезов

Сопредседатели:

*В.К. Мазо, В.Г. Никитаев, С.С. Обернихин, А.Ф. Топунов,
В.С. Хорошков, С.В. Шестаков, Н.В. Яглова*

Члены Оргкомитета

*М.М. Асланян, С.К. Ахеджак-Нагузе, В.З. Журавлев, В.Ю. Иванов,
М.А. Рагульская, В.П. Реутов, О. Б. Сазонова, С.Н. Самсонов,
Е.М. Трошина, А.Н. Черных, И.П. Шабалова, Е.В. Шарова, В.В. Ярных*

При использовании материалов конференции в научных целях необходимо на них ссылаться. Пример ссылки на материалы конференции:

Фамилия И.О. Название статьи // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`25 (Гурзуф, с 1 июня по 8 июня 2025 г.). 2025. С. XX–XX.– ISBN 978-5-6044060-5-2

СЕКЦИЯ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ	
НОВАЯ КОНЦЕПЦИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК В ОРГАНИЗМЕ Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов, С.В. Назимова, Е.П. Тимохина	10
ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЙ ПОЗВОНОЧНИКА	
А.Д. Черкасов, А.Б. Ильин	15
ПЕПТИД hNDF-6 ПРОЯВЛЯЕТ НЕЙРОПРОТЕКТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ.	
Ю.А. Золотарев, А.К. Дадаян.....	23
ВОЗМОЖНОСТИ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ СТАРЕНИЯ НА ПРИМАТАХ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ СОСТОЯНИЯ ОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА	
О.П. Чжу, Д.Э. Аравияшвили, Н.С. Руденко, И.И.Маринич.....	34
РЕФЕРЕНСНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У НИЗШИХ ОБЕЗЬЯН	
Н.С. Руденко, О.П. Чжу, Д.А. Душин	40
МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ПЕКТИНОВОГО ГЕМОСТАЗА	
Бердыш Д.С., Павленко С.Г., Ильченко Г.В., Евглевский А.А., Кудрявцева Е.В.....	45
КОРРЕКЦИЯ НЕФРОПАТИИ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ	
А.А.Шевандова, Л.Е.Сорокина, А.В. Ткач, И.И.Фомочкина	51
ПЕРИОДЫ НАИБОЛЬШЕЙ УЯЗВИМОСТИ ДЛЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТИМУСА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ	
В.В. Яглов, Э.С. Цомартов, С.С. Обернихин, Е.В. Черешнева, М.Ю. Иванова, Т.А. Ломановская, О.В.Паюшина ..	54
МИГРАЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ В СЕЛЕЗЕНКУ В ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ У КРЫС, РАЗВИВАВШИХСЯ ПРИ НИЗКОДОЗОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ДИХЛОРДИФЕНИЛТРИХЛОРЭТАНА	
Б.Б.Гагулаева, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, С.В. Назимова, Е.П. Тимохина, В.В.Яглов.....	59
ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ЭМУЛЬСИЙ ОЗОНИРОВАННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА В ЛЕЧЕНИИ БУЛЛЕЗНО-ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ФОРМЫ РОЖИ	
Е.А. Едыгова, Д.С. Бердыш, С.Г. Павленко.....	64
ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НАСЕЛЕНИЯ МЕГАПОЛИСОВ ПО МАРКЕРАМ Y-ХРОМОСОМЫ	
И. Г. Удина, А. С. Грачева, М.А. Губина, Ю.А. Васильев, О. Л. Курбатова.....	68
ПРОТИВОАСТМАТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ЗИЛЕУТОН ИНГИБИРУЕТ Ca²⁺-ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРАМИ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ, В МАКРОФАГАХ	
Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов, Н.И. Крутецкая.....	74
ДИСУЛЬФИДСОДЕРЖАЩИЕ АНАЛОГИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА МОДУЛИРУЮТ ТРАНСПОРТ Na⁺ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ	
А.В. Мельница, З.И. Крутецкая, В.Г. Антонов.....	78
ОБРАЩЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИСПЛАТИНУ ПРИ ДЕЙСТВИИ КВЕРЦЕТИНА	
А.А.Ш. Хасан, Е.В. Калинина Ю.Л. Володина А.С. Петрова Д.Д. Жданов, А.А. Штиль В.В. Татарский	83
РОЛЬ ВИТАМИНОВ И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ НАХОДЯЩИХСЯ НА ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ПИТАНИИ	
Е.Ю. Плотникова, Ю.Ю. Васильев, А.И. Корякина, И. А. Куликова	87
СТРУКТУРА БИОПАТОВ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ РАНЫ КОЖИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОЛЛАГЕНОВОЙ ГУБКИ И ФИБРОБЛАСТОВ	
Ю. Г. Барановский, Ф. Н. Ильченко, Е. Ю. Шаповалова, Т. А. Бойко, С. В. Харченко, А. Г. Барановский	90
СЕКЦИЯ: БИОЛОГИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ	
ВЛИЯНИЕ ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТИМУСА КРЫС	
С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, Е.П.Тимохина, В.В. Яглов, С.В. Назимова, Д. А. Цомартова	96
ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПРИ ПОНИЖЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ	
Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В.....	101

СОДЕРЖАНИЕ

ГЕМОГЛОБИНЫ, КРОВЬ, ЖЕЛЕЗО И СТРЕСС

ОКСИД АЗОТА: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОГО МАРКЕРА В КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ И СИГНАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ ДО ШИРОКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКИ С. В. Васильева.....	105
АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ Фуллеренолов при перекисном окислении гемоглобина А.Ф. Топунов, О.В. Космачевская, Э.И. Насыбуллина, И.С. Рябоконь, В.П. Седов, М.Е. Взнуздаев	112
РАЗНОКАЧЕСТВЕННОСТЬ СОСТАВА ЛИПИДОВ СМОЛТОВ ГОРБУШИ (<i>ONCORHYNCHUS GORBUSCHA</i>) ИЗ РАЗНЫХ РЕК БАССЕЙНОВ БЕЛОГО И БАРЕНЦЕВА МОРЕ: К ВОПРОСУ О ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЕ ВИДА И СМОЛТИФИКАЦИИ Д.И. Манойлова, С.А. Мурзина, Воронин В.П., Ефремов Д.А., Немова Н.Н.....	115
ТРАНСФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТРАНСПОРТА ЭНДОГЕННЫХ ВЕЩЕСТВ Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников, О.Н. Сучкова, П.Д. Ананьева, Е.Н. Якушева.....	120
РЕАКЦИИ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С БЕЛКАМИ КРОВИ И ГЛУТАТИОНОМ О.В. Покидова, Н.С. Емельянова, В.О. Новикова, Б.Л. Психа, А.В. Куликов, Н.А. Санина.....	123
ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ С УЧАСТИЕМ СТРУКТУРНЫХ ЛИПИДОВ БИОМЕМБРАН У МЕЗОПЕЛАГИЧЕСКИХ РЫБ К ОБИТАНИЮ НА ГЛУБИНЕ В.П. Воронин, Д.В. Артеменков, А.М. Орлов, С.А. Мурзина	127
БИС-ГИСТИДИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ГЕМОГЛОБИНА (ГЕМИХРОМ): УЧАСТИЕ В РЕДОКС-ПРЕВРАЩЕНИЯХ О.В. Космачевская, Э.И. Насыбуллина, О.Е. Багрова, И.С. Пугаченко А.Ф. Топунов	132
ДИНИТРОЗИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ЖЕЛЕЗА С КАРНОЗИНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ: ОБРАЗОВАНИЕ, АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИРАДИКАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ Э.И. Насыбуллина, О.В. Космачевская, Хвесью К.В. ¹ , А.Ф. Топунов.....	137
NO ⁺ /NO ⁻ - ГЕНЕРИРУЮЩАЯ СИСТЕМА АВТОКАТАЛИЗА В КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМИСА В.И. Петухов, Е.В. Дмитриев	141
МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СИСТЕМ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ-БИОРЕАКТОРОВ Е.С. Протасов, Л.Д. Колева, А. Бовт Е. И. Синауридзе, Ф. И. Атауллаханов	146
ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ СПЕРМАТОЗОИДАХ И МОНОНУКЛЕАРАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕРЕБЦОВ С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ КРИОУСТОЙЧИВОСТЬЮ СПЕРМЫ А. М. Шитикова, М. М. Атрощенко, В. И. Звягина, Н. А. Фролова, О. В. Широкова, Аронова М.А.	151
ГОМОЦИСТЕИН-ИНДУЦИРОВАННАЯ МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ: КЛЮЧЕВОЙ МЕХАНИЗМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ Урясьев О.М., Марсянова Ю.А., Бельских Э.С., Звягина В.И.....	155
ЦИТОГЛОБИН В ЧАСТОТНОЙ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ ХОНДРОЦИТОВ О.И. Баум, А.К. Дмитриев, О.А. Тифлова	160
РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА ИЗОТОПНО-МЕЧЕНОГО НЕЙРОГЛОБИНА М.А. Семенова, О.М. Смирнова, В.В. Бритиков, Е.В. Бритикова, Я.В. Бершацкий, Э.В. Бочаров, Д.А. Долгих, Р.В. Черткова.....	165
СЕКЦИЯ: МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА: ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ	
НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЕ И ФАРМАКОЛОГИИ Е.Р.Никитина	169
ПРОЕКТ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ С ФИКСИРОВАННЫМ НАПРАВЛЕНИЕМ ПРОТОННОГО ПУЧКА ДЛЯ КОМПЛЕКСА ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ «ЛУЧ-ПРОТОН» А.Н. Черных, М.С. Булатов, Д.А. Жидков, Г.И. Кленов, К.С. Красильщиков, Д.Г. Орлов.....	173
ОПОЗНАВАНИЕ СО СЖАТИЕМ В МЕДИЦИНСКОМ ИМИДЖИНГЕ: ОБЗОР С ПРИМЕРАМИ А.Б. Коновалов	180
НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ: ФИЛЬТРОМЕТР С ИЗМЕРЕНИЕМ КИНЕТИКИ ПОТОКА СУСПЕНЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАННЫЙ ФИЛЬТР Кушнир Н.С. Суворова А.С	189
МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ЛИМФОМАМИ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ С.А. Алексеев, В.Н. Троян, О.А.Рукавицын.....	193

ПОСЛОЙНОЕ 2D СКАНИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ БИОТКАНИ ИЗЛУЧЕНИЕМ СО₂ ЛАЗЕРА А.К. Дмитриев, А.Н. Коновалов, В.Н. Кортуннов, В.А. Ульянов	198
ИЗМЕРЕНИЕ НИЗКОГО ДАВЛЕНИЯ В КОСМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ Т.И. Мурашкина, В.А. Бадеев.....	204
ЭЛЕКТРОПУНКТУРНАЯ ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА Н.И. Воробьев Н.А. Загустина, С.В. Гурин.....	209
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И МОДЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАДИОБИОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА УСКОРЕННЫХ ИОНОВ УГЛЕРОДА Я.В. Кизилова, А.Н. Соловьев, С.Н. Корякин.....	213
НОВАТОРСКАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ И.А. Куликова, Т.И. Мурашкина, Е.Ю. Плотникова, Ю.Ю. Васильев	219
СЕКЦИЯ: ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ	
ВЛИЯНИЕ КОРМОВЫХ ДОБАВОК С СОДЕРЖАНИЕМ ФИТАЗ ГРИБНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ КРОССА «СМЕНА 9» Е.П. Исакова, Н.Н. Гесслер, О.И. Кляйн, А.В. Розумий, Ю.И. Дерябина Е.А. Овсейчик, В.С. Лукашенко	222
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА ЛОСОСЕВЫХ РЫБ ИЗ КОНСЕРВОВ А.В. Кузнецов, С.А. Царин, Ю.В. Самотой, С.А. Кирпиченко, Д.В. Метелева, С.Н. Пасенин.....	227
ОРГАНИЗМЫ-ОБРАСТАТЕЛИ В ПЕРЕРАБОТКЕ ЛОМА КОРАБЕЛЬНОЙ СТАЛИ Я.В. Саванина	233
СЕКЦИЯ: ГЕНОМИКА. ГЕНЫ И БОЛЕЗНИ	
ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ МЕЖДУ АРХЕЯМИ И БАКТЕРИЯМИ С.В.Шестаков, Е.А.Карбышева.....	240
ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ рiРНК И ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ОНКОГЕНЕЗОМ С.М. Шляпников, А.А. Агумава, О.И. Вышемирский	246
СЕКЦИЯ: ОКСИД АЗОТА И ПРОДУКТЫ ЕГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ	
МИШЕНЬ-ОРИЕНТИРОВАННЫЕ ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА - ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ Н.А. Санина	252
АКТИВНЫЕ ФОРМЫ АЗОТА И КИСЛОРОДА: ВОЗМОЖНОЕ ИХ ВЛИЯНИЕ НА СРЕДНЮЮ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ В.П. Реутов, Н.В. Пасикова, Е.Г. Сорокина, Л.А. Давыдова.....	258
ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА, ГЛУТАМАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ОКСИД АЗОТА Е.Г. Сорокина, В.П. Реутов, Ж.Б. Семенова, О.В. Глоба, О.В. Карасева, В.Г. Пинелис, И.Е. Смирнов.....	275
ЭКСПРЕССИЯ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗ В АДЕНОКАРЦИНОМАХ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА Л.А. Савлущинская, В.П. Дерягина, Н.И. Рыжова, Л.В. Кривошеева.....	283
ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА В ЛЕЙКОЦИТАХ И МАКРОФАГАХ З.В. Куроптева, О.Л. Белая, В.П. Реутов	288
СЕКЦИЯ: КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ: НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ, НЕВРОЛОГИЯ, НЕЙРОХИРУРГИЯ, НЕЙРОХИМИЯ И НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ	
ИССЛЕДОВАНИЕ БОЛИ: ВОЗМОЖНОСТИ СУБЪЕКТИВНЫХ И ОБЪЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ БОЛЕВЫХ ОЩУЩЕНИЙ У ЧЕЛОВЕКА Е.М.Трошина, С.О.Болтгнева., Е.В.Шарова, И.А.Воронина, О.Б.Сазонова	296
ЦИФРОВАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И КОГНИТИВНАЯ СФЕРА ПСИХИКИ Е.Г. Чибисова, О.Н. Усатенко.....	313
СЕКЦИЯ: ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА И КОСМИЧЕСКАЯ ПОГОДА	
СНИЖЕНИЕ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ А.П. Григорян, М.А. Овчинников, А.П. Евсеев, Д.А. Блескин, О.М. Марченко, Е.Ю.Симоненко.....	319

СОДЕРЖАНИЕ

СЕКЦИЯ: ИНТЕГРАТИВНАЯ ЭКОЛОГИЯ В XXI ВЕКЕ

ПОТРЕБЛЕНИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИМИ ВОДЫ, АНАЛОГИЧНОЙ МАРСИАНСКОЙ ПО СОДЕРЖАНИЮ ДЕЙТЕРИЯ ПРИВОДИТ К РАЗВИТИЮ АДАПТАЦИОННОГО СИНДРОМА

Козин С.В., Кравцов А.А., Лясота О.М., Дорохова А.А., Джимак С.С. 323

НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ СИСТЕМЫ ПРИ СТАРЕНИИ В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Н.Д. Гончарова, О.А. Чигарова, А.М. Ермолаева, Т.Э. Оганян, Н.В. Тимошенко, Д.М. Карасева..... 331

СОДЕРЖАНИЕ

SECTION: EXPERIMENTAL BIOLOGY AND CLINICAL MEDICINE IN THE THIRD MILLENNIUM

NOVEL CONCEPT OF PHYSIOLOGIC REGENERATION OF CHROMAFFIN CELLS <i>N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov, S.V. Nazimova, E.P. Timokhina</i>	10
AGE DYNAMICS OF DEVELOPMENT OF SPINAL PATHOLOGIES <i>A.D. Cherkasov, A.B. Ilyin</i>	15
PEPTIDE HLDF-6 EXHIBITS NEUROPROTECTIVE ACTIVITY IN NEURODEGENERATIVE DISEASES. <i>Yu.A. Zolotarev, A.K. Dadayan</i>	23
POSSIBILITIES OF STUDYING AGING PROCESSES IN PRIMATES BY INDICATORS OF THE STATE OF THE OXIDANT SYSTEM OF THE ORGANISM <i>O.P. Zhu, D.E. Aravashvili, N.S. Rudenko, I.I. Marinich</i>	34
REFERENCE INTERVALS OF HEMATOLOGICAL INDICATORS IN LOWER MONKEYS <i>N.S. Rudenko, O.P. Zhu, D.A. Dushin</i>	40
MORPHOLOGICAL VERIFICATION OF PECTIN HEMOSTASIS <i>D.S. Berdysh, S.G. Pavlenko, G.V. Ilchenko, A.A. Evglevsky, E.V. Kudryavtseva</i>	45
CORRECTION OF NEPHROPATHY IN METABOLIC SYNDROME <i>A.A. Shevandova, L.E. Sorokina, A.V. Tkach, I.I. Fomochkina</i>	51
PERIODS OF GREATEST VULNERABILITY FOR THYMUS FUNCTION WHEN EXPOSED TO THE ENDOCRINE DISRUPTOR DDT <i>V.V. Yaglov, E.S. Tsomartova, S.S. Obernikhin, E.V. Cheresheva, M.YU. Ivanova, T.A. Lomanovskaya, O.V. Paushina</i>	54
NEUTROPHIL MIGRATION TO SPLEEN DURING POSTNATAL ONTOGENY IN RATS DEVELOPMENTALLY EXPOSED TO LOW DOSES OF DICHLORODIPHENYLTRICHLOROETHANE <i>B.B. Gagulaeva, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, S.V. Nazimova, E.P. Timokhina, V.V. Yaglov</i>	59
THE USE OF MICROCAPSULATED EMULSIONS OF OZONATED VEGETABLE OIL IN THE TREATMENT OF BULLOUS HEMORRHAGIC ERYSIPELAS. <i>E.A. Edygova, D.S. Berdysh, S.G. Pavlenko</i>	64
DIFFERENTIATION OF POPULATION OF MEGALOPOLISES BY MARKERS OF Y-CHROMOSOME <i>E. G. Udina, A.S. Gracheva, M.A. Gubina, Yu.A. Vasiliev, O.L. Kurbatova</i>	68
ANTI-ASTHMATIC DRUG ZILEUTON INHIBITS Ca^{2+} RESPONSES, INDUCED BY IMMUNOMODULATORS GLUTOXIM AND MOLIXAN, IN MACROPHAGES <i>L.S. Milenina, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov, N.I. Krutetskaya</i>	74
DISULFIDE-CONTAINING OXIDIZED GLUTATHIONE ANALOGUES MODULATE Na^{+} TRANSPORT IN FROG SKIN EPITHELIUM <i>A.V. Melnitska, Z.I. Krutetskaya, V.G. Antonov</i>	78
REVERSAL OF CANCER CELL RESISTANCE TOWARDS CISPLATIN BY QUERCETIN <i>A.A. Sh. Hasan, E.V. Kalinina, Yu.L. Volodina, A.S. Petrova, D.D. Zhdanov, A.A. Shtil, V.V. Tatarsky</i>	83
THE ROLE OF VITAMINS AND TRACE ELEMENTS IN NEWBORNS ON PARENTERAL NUTRITION <i>E.Yu. Plotnikova, Yu.Yu. Vasiliev, A.I. Koryakina, I.A. Kulikova</i>	87
STRUCTURE OF BIOPSY SAMPLES OF ISCHEMIC SKIN WOUND AFTER TRANSPLANTATION OF COLLAGEN SPONGE AND FIBROBLASTS <i>Yu. G. Baranovsky, F.N. Ilchenko, E.Yu. Shapovalova, T.A. Boyko, S.V. Kharchenko, A.G. Baranovsky</i>	90
SECTION: BIOLOGY OF STABLE ISOTOPES	
EFFECT OF WATER WITH REDUCED DEUTERIUM CONTENT ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE RAT THYMUS <i>S.S. Obernikhin, N.V. Yaglova, E.P. Timokhina, V.V. Yaglov, S.V. Nazimova, D.A. Tsomartova</i>	96
DEUTERIUM REDUCTION-ASSOCIATED CHANGES IN T-CELLS BLOOD CONTENT <i>E.P. Timokhina, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov, S.V. Nazimova</i>	101

HEMOGLOBINS, BLOOD, IRON, AND STRESS

NITRIC OXIDE: FROM FUNDAMENTAL MARKER AT CLINICAL DIAGNOSTICS AND SIGNAL MOLECULE TO MEDICINE PRACTICE <i>S.V. Vasilyeva</i>	105
ANTIOXIDANT EFFECT OF FULLERENOLS AT HEMOGLOBIN PEROXIDATION <i>A.F. Topunov, O.V. Kosmachevskaya, E.I. Nasybullina, I.S. Ryabokon, V.P. Sedov, M.E. Vznuzdaev</i>	112
THE HETEROGENEITY OF THE LIPID COMPOSITION OF PINK SALMON (ONCORHYNCHUS GORBUSCHA) TARTS FROM DIFFERENT RIVERS OF THE BASINS OF THE WHITE AND BARENTS SEAS: ON THE ISSUE OF THE POPULATION STRUCTURE OF THE SPECIES AND ITS SMOLTIFICATION <i>D.I. Manoilova, S.A. Murzina, V.P. Voronin, D.A. Efremov, N.N. Nemova</i>	115
TRANSFECTED CELL LINES FOR EVALUATION OF ENDOGENOUS SUBSTANCE TRANSPORT <i>Yu.V. Abalenikhina, A.V. Shulkin, P.Yu. Mylnikov, O.N. Suchkova, P.D. Ananieva, E.N. Yakusheva</i>	120
REACTIONS OF NITROSYL IRON COMPLEXES WITH BLOOD PROTEINS AND GLUTATHIONE <i>O.V. Pokidova, N.S. Emelyanova, V.O. Novikova, B.L. Psikha, A.V. Kulikov, N.A. Sanina</i>	123
ECOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ADAPTATIONS WITH THE PARTICIPATION OF STRUCTURAL LIPIDS OF BIOMEMBRANES IN MESOPELAGIC FISHES TO DEPTH-SEA HABITATION <i>V.P. Voronin, D.V. Artemenkov, A.M. Orlov, S.A. Murzina</i>	127
BIS-HISTIDYL COMPLEX OF HEMOGLOBIN (HEMICHROME): PARTICIPATION IN REDOX-TRANSFORMATIONS <i>O.V. Kosmachevskaya, E.I. Nasybullina, O.E. Bagrova, I.S. Pugachenko, A.F. Topunov</i>	132
DINITROSYL IRON COMPLEX WITH CARNOSINE LIGANDS: FORMATION, ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL EFFECT <i>E.I. Nasybullina, O.V. Kosmachevskaya, Khvesko K.V., A.F. Topunov</i>	137
NO⁺/NO⁻-GENERATING SYSTEM OF AUTOCATALYSIS IN EPIDERMAL CELLS <i>V.I. Petukhov, E.V. Dmitriev</i>	141
MATHEMATICAL MODELLING OF METABOLIC SYSTEMS AS A TOOL FOR DEVELOPMENT OF ERYTHROCYTES-BIOREACTORS <i>E.S. Protasov, L.D. Koleva, A. Bovt, E.I. Sinauridze, F.I. Ataullakhanov</i>	146
OXIDATIVE STRESS IN CRYOPRESERVED SPERMATOOZOA AND PBMC OF STALLIONS WITH HIGH AND LOW SPERM CRYOSTABILITY. <i>A.M. Shitikova, M.M. Atroshchenko, V.I. Zvyagina, N.A. Frolova, O.V. Shirokova, M.A. Aronova</i>	151
HOMOCYSTEINE-INDUCED MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION: A KEY MECHANISM OF ENDOTHELIAL PATHOLOGY <i>O.M. Uryasiev, Yu.A. Marsyanova, E.S. Belskikh, V.I. Zvyagina</i>	155
CYTOGLOBIN IN FREQUENCY PHOTOBIMODULATION OF CHONDROCYTES <i>O.I. Baum, A.K. Dmitriev, O.A. Tiflova</i>	160
ISOTOPICALLY LABELED NEUROGLOBIN BIOSYNTHESIS SYSTEM DEVELOPMENT <i>M.A. Semenova, O.M. Smirnova, V.V. Britikov, E.V. Britikova, Ya.V. Bershatsky, E.V. Bocharov, D.A. Dolgikh, R.V. Chertkova</i>	165
SECTION: MEDICAL PHYSICS: DIAGNOSTICS AND THERAPY	
NEW TECHNOLOGIES IN BIOLOGY, MEDICINE AND PHARMACOLOGY <i>E.R. Nikitina</i>	169
DESIGN OF A MULTIFUNCTIONAL FACILITY WITH A FIXED DIRECTION OF A PROTON BEAM FOR THE PROTON RADIATION THERAPY COMPLEX "LUCH-PROTON" <i>A.N. Chernykh, M.S. Bulatov, D.A. Zhidkov, G.I. Klenov, K.S. Krasilshchikov, D.G. Orlov</i>	173
COMPRESSED SENSING IN MEDICAL IMAGING: A REVIEW WITH EXAMPLES <i>A.B. Kononov</i>	180
A NEW APPROACH TO ASSESSING THE DEFORMABILITY OF ERYTHROCYTES: A FILTEROMETER WITH MEASUREMENT OF THE KINETICS OF THE FLOW OF ERYTHROCYTE SUSPENSION THROUGH A MEMBRANE FILTER <i>N.S. Kushnir, A.S. Suvorova</i>	189

СОДЕРЖАНИЕ

MAGNETIC RESONANCE IMAGING IN PATIENTS WITH LYMPHOMAS AFTER TREATMENT <i>S.A. Alekseev, V.N. Trojan, O.A. Rukavitsyn</i>	193
LAYER-BY-LAYER 2D SCANNING OF THE BIOTISSUE SURFACE USING CO₂ LASER RADIATION <i>A.K. Dmitriev, A.N. Konovalov, V.N. Kortunov, V.A. Ulyanov</i>	198
MEASUREMENT OF LOW PRESSURE IN SPACE LIFE SUPPORT SYSTEMS <i>T.I. Murashkina, V.A. Badeev</i>	204
THE ELECTROPUNCTURE DIAGNOSIS OF HUMAN HEALTH <i>N.I. Vorobyov, N.A. Zagustina, S.V. Gurin</i>	209
EXPERIMENTAL AND SIMULATED ESTIMATION OF RADIOBIOLOGICAL RESPONSE OF ACCELERATED CARBON IONS <i>Ya.V. Kizilova, A.N. Solovyev, S.N. Koryakin</i>	213
AN INNOVATIVE METHOD FOR DETERMINING BLOOD GROUP AFFILIATION <i>I.A. Kulikova, T.I. Murashkina, E.Yu. Plotnikova, Yu.Yu. Vasiliev</i>	219
SECTION: PROBLEMS, METHODS, AND PRODUCTS OF MODERN BIOTECHNOLOGY INFLUENCE OF FEED SUPPLEMENTS CONTAINING PHYTASE OF FUNGAL AND BACTERIAL ORIGIN ON BIOCHEMICAL BLOOD FEATURES OF BROILER CHICKENS OF THE CROSS "SMENA 9" <i>E.P. Isakova, N.N. Gessler, O.I. Klein, A.V. Rozumiy, Yu.I. Deryabina E.A. Ovseychik, V.S. Lukashenko</i>	222
GENETIC EXPERTISE OF CANNED SALMON FISH <i>A.V. Kuznetsov, S.A. Tsarin, Yu.V. Samotoy, S.A. Kirpichenko, D.V. Metelyova, S.N. Pasein</i>	227
FOULING ORGANISMS IN THE PROCESSING OF SHIP STEEL SCRAP <i>Ya.V. Savanina</i>	233
SECTION: GENOMICS. GENES AND DISEASES HORIZONTAL GENE TRANSFER BETWEEN ARCHAEA AND BACTERIA <i>S.V. Shestakov, E.A. Karbysheva</i>	240
POSSIBILITIES OF USING piRNA AND ONCOLYTIC VIRUSES TO FIGHT ONCOGENESIS <i>S.M. Shlyapnikov, A.A. Agumava, O.I. Vyshemirsky</i>	246
SECTION: NITRIC OXIDE AND ITS METABOLIC PRODUCTS IN BIOLOGICAL SYSTEMS TARGET ORIENTED NITRIC OXIDE DONORS AS PROMISING AGENTS FOR THERAPY OF INFLAMMATORY PROCESSES <i>N.A. Sanina</i>	252
REACTIVE FORMS OF NITROGEN AND OXYGEN: THEIR POSSIBLE INFLUENCE ON AVERAGE LIFE EXPECTANCY <i>V.P. Reutov, N.V. Pasikova, E.G. Sorokina, L.A. Davydova</i>	258
GLUTAMIC ACID, GLUTAMATE RECEPTORS AND NITRIC OXIDE <i>E.G. Sorokina, V.P. Reutov, Zh.B. Semenova, O.V. Globa, O.V. Karaseva, V.G. Pinelis, I.E. Smirnov</i>	275
EXPRESSION OF INDUCIBLE AND ENDOTHELIAL NO SYNTHASES IN HUMAN COLON ADENOCARCINOMAS <i>L.A. Savluchinskaya, V.P. Deryagina, N.I. Ryzhova, L.V. Krivosheeva</i>	283
THE INCREASE OF NITRIC OXIDE PRODUCTION IN LEUKOCYTES AND MACROPHAGES <i>Z.V. Kuropteva, O.L. Belaya, V.P. Reutov</i>	288
SECTION: CLINICAL NEUROSCIENCES: NEUROPHYSIOLOGY, NEUROLOGY, NEUROSURGERY, NEUROCHEMISTRY, AND NEUROPHARMACOLOGY PAIN RESEARCH: THE POSSIBILITIES OF SUBJECTIVE AND OBJECTIVE METHODS FOR ASSESSING PAIN IN HUMANS <i>E.M. Troshina, S.O. Boltneva, E.V. Sharova, I.A. Voronina, O.B. Sazonova</i>	296
DIGITAL TRANSFORMATION AND THE COGNITIVE SPHERE OF THE PSYCHE <i>E.G. Chibisova, O.N. Usatenko</i>	313
SECTION: HUMAN HEALTH AND SPACE WEATHER REDUCTION OF THE MEMBRANE POTENTIAL OF MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS OF HUMAN SPERM DUE TO EXPOSURE TO GAMMA RADIATION <i>A.P. Grigorian, M.A. Ovchinnikov, A.P. Evseev, D.A. Bleski, O.M. Marchenko, E.Yu. Simonenko</i>	319

СОДЕРЖАНИЕ

SECTION: INTEGRATIVE ECOLOGY IN THE 21ST CENTURY

AS A RESULT OF THE CONSUMPTION OF WATER WITH A DEUTERIUM CONTENT SIMILAR TO THAT ON MARS, MAMMALS DEVELOP AN ADAPTATION SYNDROME

S.V. Kozin, A.A. Kravtsov, O.M. Lyasota, A.A. Dorokhova, S.S. Dzhimak 323

NEUROENDOCRINE SYSTEMS DURING AGING UNDER CONSTANT LIGHTING

N.D. Goncharova, O.A. Chigarova, A.M. Ermolaeva, T.E. Oganyan, N.V. Timoshenko, D.M. Karaseva 331

НОВАЯ КОНЦЕПЦИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК В ОРГАНИЗМЕ

Получены данные, на основании которых существующая концепция регенерации мозгового вещества была дополнена новым положением: поддержание тканевого гомеостаза в мозговом веществе надпочечников в постнатальном онтогенезе может происходить не только за счет пролиферации хромаффинных клеток, но также и за счет создания пула высокодифференцированных хромаффиноцитов, готовых к дальнейшей дедифференцировке.

Ключевые слова: надпочечник, мозговое вещество, хромаффинные клетки, дисморфогенез, регенерация, пролиферация, плюрипотентность

N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov, S.V. Nazimova, E.P. Timokhina
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary
Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery"

NOVEL CONCEPT OF PHYSIOLOGIC REGENERATION OF CHROMAFFIN CELLS

The exiting concepts of adrenal medulla reparation and self-maintenance have been supplemented by a new position that the tissue homeostasis in the adrenal medulla during postnatal ontogeny is ensured both by cell proliferation and appearance of pool of highly differentiated adrenal cells ready to dedifferentiation.

Key words: adrenals, medulla, chromaffin cells, dismorphogenesis, regeneration, proliferation, pluripotency

Введение

В организме человека и животных существуют различные клеточные популяции, различающиеся не только по гистогенетическим типам, но и по способности к регенерации. Традиционно к клеткам с высоким регенераторным потенциалом относят эпителиальные и клетки соединительные ткани, а с низким регенераторным потенциалом – нервной ткани [1]. В развитии и росте органов лежат четыре основных морфогенетических процесса: деление клеток, дифференцировка, апоптоз и миграция. Сочетание этих процессов как в количественном, так и временном аспектах формирует уникальную программу развития для каждого органа. После завершения роста органы переходят к физиологической регенерации, то есть самоподдержанию клеточных популяций.

Процессы физиологической регенерации более сложны для изучения, чем репаративной и требуют создания уникальных моделей, позволяющих дисбалансировать морфогенез и регенерацию. Особенно это важно при исследовании тканей и клеток, характеризующихся низким пролиферативной активностью и клеточным оборотом в течение жизни. Регенеративная способность коры надпочечников общепризнана, как в случае повреждения, так и в части самоподдержания клеточных пулов в течение жизни. Известно, что клетки клубочковой и пучковой зоны заменяются на протяжении всей жизни как у человека, так и у грызунов. Физиологическая регенерация мозгового вещества является открытым вопросом. Но ни одно исследование не смогло доказать существование *de novo* генерации хромаффинных клеток *in vivo* в нормальных условиях. В течение десятилетий мозговое вещество взрослых надпочечников считалось постмитотической клеточной популяцией [1]. Однако некоторые исследования показали, что очень небольшое количество хромаффинных клеток делится во взрослых надпочечниках грызунов [2,3]. Небольшое количество обнаруженных делений хромаффинных клеток объясняется медленной кинетикой оборота хромаффинной ткани. Например, кратковременное воздействие BrdU в течение от 12 ч до 7 дней у взрослых крыс привело к

тому, что в мозговом веществе было помечено менее 1% хромаффинных клеток [4]. Очевидно, что в течение жизни должна происходить смена хромаффинных клеток. Но каковы механизмы самообновления клеточной популяции? Эти вопросы приобрели особую актуальность в последние 10-15 лет, когда на общем всплеске исследований в области так называемых стволовых, мультипотентных и прогениторных клеток и их использования в регенеративной медицине, появились идеи о получении хромаффинных клеток для трансплантации больным нейродегенеративными заболеваниями и в терапии болевого синдрома. Хромаффинные клетки казались идеальным вариантом, поскольку обладали большей пластичностью, чем нейроны. Было проведено несколько сотен трансплантаций пациентам с болезнью Паркинсона, и в научной литературе появились отчеты о положительной динамике у пациентов, но выживаемость пересаженной хромаффинной ткани оказалась очень низкой. Это и стало причиной снижения числа работ в этой области и на сегодняшний день помимо данных о низкой способности зрелых хромаффинных клеток к делению в постнатальном онтогенезе, полученных несколько десятилетий назад, ничего принципиально нового в понимании основ физиологической регуляции хромаффинной ткани не появилось. В связи с этим мы провели исследование по установлению возможных механизмов физиологической регенерации, то есть механизмов поддержания самообновления хромаффинных клеток надпочечников у крысы. Первым этапом работы было изучение периода перехода от активного роста к периоду самоподдержания клеточных популяций у интактных животных.

Материалы и методы

Эксперимент проводился на интактных самцах крыс Вистар (n=20) и самцах, подвергавшихся низкодозовому воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии (менее 3 мкг/кг в сутки) в возрасте 42-х суток, что соответствует пубертатному периоду и активному росту надпочечников и в возрасте 70 суток (n=20), то есть в постпубертатном периоде, когда рост надпочечника крысы завершается [5]. Животных выводили из эксперимента на 42-е сутки передозировкой «Золетила 100» («Virbac», Франция). Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов органа, окрашенных гематоксилином и эозином. Морфометрию светооптических препаратов проводили с помощью программы «Image Score» («Leica Microsystems», Германия). Определяли площадь мозгового вещества и площадь, занимаемую хромаффинными клетками в мозговом веществе.

Для определения терминальной дифференцировки и функциональной активности хромаффинных клеток использовали иммуногистохимическое выявление тирозингидроксилазы с помощью поликлональных кроличьих антител («Abcam», Великобритания). Для изучения пролиферативной активности хромаффинных клеток проводили иммуногистохимическое определение экспрессии Ki-67, экспрессию лиганда Shh, транскрипционных факторов Oct4 и Sox2 в хромаффинных клетках выявляли также иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных антител («Abcam», Великобритания). Подсчитывали процент позитивных клеток. Производили иммуногистохимическое исследование β -катенина, являющегося активатором канонического Wnt-сигналинга, с определением процента позитивных клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализациями белка. Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Полученные результаты

Исследование пролиферативной активности хромаффинных клеток в период полового созревания показало, что их численность невелика и составляет порядка 2-3%. К 70-м суткам, когда рост надпочечника прекращается, она снижается до 1,5%.

Иммуногистохимическое выявление тирозингидроксилазы, являющейся маркером высокой степени дифференцировки хромаффинных клеток, показало очень высокую

экспрессию этого фермента у 100% хромаффинных клеток, то есть низкодифференцированных клеток мы не обнаруживали.

Однако дополнительно мы провели иммуногистохимическое исследование для поиска клеток ранних предшественников, экспрессирующих транскрипционный фактор *Ascl1*, обеспечивающий дифференцировку предшественников шванновских клеток в хромаффинные. Клеток, синтезирующих данный фактор, не было обнаружено.

Следующим мы исследовали динамику активации канонического Wnt-сигналинга. Wnt-сигналинг влияет на многие аспекты развития и функции нервной системы. Белки Wnt активируют множество сигнальных путей и индуцируют разнообразные клеточные процессы, включая пролиферацию и дифференцировку клеток, изменения транскрипции генов, перестройки цитоскелета и др. Нами продемонстрировано, что β -катенин экспрессируется хромаффинными клетками надпочечников в постнатальном развитии. Следует отметить, что с возрастом общее количество β -катенин-позитивных клеток не изменяется, а число клеток с транслокацией β -катенина в ядро после завершения роста органа увеличивается, то есть после остановки роста происходит усиление активации канонического Wnt-сигналинга в хромаффинных клетках. То есть существовать возможность индукции клеточного деления и дифференцировки.

В нейрогенезе и формировании нейронных паттернов во время развития нервной системы важную роль играет сигнальный путь *Sonic hedgehog (Shh)* [6]. Экспрессия *Shh* активируется в нейронах во время ишемии/гипоксии, а ингибирование пути *Shh* усугубляет ишемическое повреждение нейронов мозга у крыс, что указывает на роль *Shh* в регенерации нервной ткани. Ранее обнаружено, что механически конститутивная активация передачи сигналов *Shh* коррелирует с активностью Wnt-сигналинга. При иммуногистохимическом исследовании гистологических препаратов мы продемонстрировали наличие *Shh*-положительных хромаффинных клеток с ядерной локализацией, число которых увеличивалось с возрастом к моменту завершения роста надпочечника.

Немаловажным вопросом является способность хромаффинных клеток экспрессировать эмбриональные факторы плюрипотентности в постнатальном развитии. Факторы транскрипции *POU5F1* или *Oct4* и *Sox2* экспрессируются на самых ранних стадиях эмбриогенеза млекопитающих [7,8]. *Sox2* также имеет решающее значение для поддержания плюрипотентности, но необязателен для ее установления во время эмбриогенеза, возможно, из-за дублирования с другими членами семейства *Sox*. В настоящей работе мы продемонстрировали, что транскрипционный фактор *Oct4* также синтезируется и в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников в процессе постнатального развития.

Завершение периода роста надпочечников сопровождалось закономерным снижением числа делящихся клеток. Высокий уровень экспрессии тирозингидроксилазы, обнаруживаемый во всех без исключения хромаффиноцитах, указывает на их терминальную дифференцировку и значительную функциональную активность как в пубертатном, так и постпубертатном периодах. Это означает, что выявленные и *Ki-67*-, β -катенин, *Shh*- и *Oct4*-позитивные клетки, являются высокодифференцированными хромаффиноцитами. Наличие и *Oct4* - и *Shh*-позитивных клеток указывает на возможность их дедифференцировки. Для того, чтобы доказать связь активации экспрессии вышеупомянутых факторов с прекращением роста и переходом к этапу самоподдержания популяции хромаффинных клеток понадобилась модель дисрегуляции морфогенеза.

Нами была использована оригинальная разработанная модель на основе наших исследований эндокринных дисрапторов – веществ, способных нарушать любые этапы синтеза гормонов и их взаимодействия с клетками-мишенями, действуя в низких дозах, аналогичных физиологическим концентрациям эндогенных гормонов. В качестве эндокринного дисраптора нами был использован дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), воздействию которого организм начал подвергаться с момента зачатия и в течение всего пренатального и постнатального развития. Это приводило к изменению темпов развития надпочечников [9,10]. До пубертатного периода мозговое вещество развивалось нормальными темпами, но с началом

полового созревания пролиферативная активность хромаффинных клеток снижалась, что к постпубертатному периоду, что обуславливало меньшие размеры мозгового вещества. А к 70-м контрольным суткам, когда рост надпочечников завершается, наоборот, начиналась активация ростовых процессов за счет усиления пролиферативной активности клеток. То есть модель заключалась в замедлении и ускорении морфогенетических процессов.

У крыс, которые подвергались воздействию низких доз ДДТ на 42-е сутки мы обнаружили нормально развитое мозговое вещество и пониженную пролиферацию клеток в сочетании с более высоким уровнем клеток, синтезирующих антипролиферативный фактор Нех. То есть начиналось торможение роста. И к 70-м суткам объем мозгового вещества не увеличился, но активировались процессы пролиферации. Исследование показало, что в период торможения роста на фоне пониженной пролиферативной активности и более высоких показателей численности клеток, синтезирующих антипролиферативный фактор PRH отмечаются тенденции к увеличению активации канонического Wnt-сигналинга и значительному увеличению численности Sonic Hedgehog-положительных хромаффиноцитов и Oct4-клеток. Никаких ранних предшественников мы не обнаруживали. Активация роста, наблюдавшаяся на 70-е сутки, сопровождалась уменьшением числа клеток, синтезирующих антипролиферативный фактор PRH и снижением количества клеток с активацией канонического Wnt-сигналинга по сравнению с возрастным контролем. В растущем мозговом веществе обнаруживалось значительно меньшее число Oct4- и Sonic Hedgehog-позитивных клеток. Низкодифференцированные предшественники также отсутствовали и все хромаффинные клетки экспрессировали тирозингидроксилазу.

Выводы

Таким образом, были получены данные, на основании которых существующая концепция регенерации мозгового вещества была дополнена новым положением: поддержание тканевого гомеостаза в мозговом веществе надпочечников в постнатальном онтогенезе может происходить не только за счет пролиферации хромаффинных клеток, но также и за счет создания пула высокодифференцированных хромаффиноцитов, готовых к дальнейшей дедифференцировке.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: на основании проведенных экспериментов установлены ранее неизвестные механизмы регенерации хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников.

Литература

1. Яглов В.В., Яглова Н.В. *Основы цитологии, эмбриологии и общей гистологии. программное учебное пособие: для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности "Ветеринария" / Сер. Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений. М.: КолосС, 2008.*
2. Tischler, A.S., DeLellis, R.A., Nunnemacher, G., Wolfe, H.J., 1988. Acute stimulation of chromaffin cell proliferation in the adult rat adrenal medulla. *Lab. Invest.* 58 (6), 733–735.
3. Tischler, A.S., Ruzicka, L.A., Donahue, S.R., DeLellis, R.A., 1989. Chromaffin cell proliferation in the adult rat adrenal medulla. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7 (5), 439–448.
4. Verhofstad, A.A., 1993. Kinetics of adrenal medullary cells. *J. Anat.* 183 (Pt 2), 315–326.
5. Pignatelli D., Xiao F., Gouvtia A., Ferreira J., Vinson G. Adrenarche in the rat // *Journal of Endocrinology*. 2006. Vol. 191. N. 1. P. 301-308. doi: 10.1677/joe.1.06972
6. Wilson N.H., Stoeckli E.T. Sonic hedgehog regulates Wnt activity during neural circuit formation // *Vitamins and Hormones*. 2012. Vol. 88. P. 173–209. doi: 10.1016/B978-0-12-394622-5.00008-0
7. Wu G., Schöler H.R. Role of Oct4 in the early embryo development // *Cell Regen.* 2014. Vol. 3. N. 1. 7. doi: 10.1186/2045-9769-3-7

8. Schaefer T., Lengerke C. Sox2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond // *Oncogene*. 2020. Vol. 39. N. 2. P. 278–292. doi:10.1038/s41388-019-0997-x
9. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Tsomartova D.A., Yaglov V.V., Nazimova S.V., Tsomartova E.S., Timokhina E.P., Cheresheva E.V., Ivanova M.Y., Lomanovskaya T.A. Impact of Prenatal and Postnatal Exposure to Endocrine Disrupter DDT on Adrenal Medulla Function. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 4912. <https://doi.org/10.3390/ijms23094912>
10. Yaglova N.V., Nazimova S.V., Obernikhin S.S., Tsomartova D.A., Yaglov V.V., Timokhina E.P., Tsomartova E.S., Cheresheva E.V., Ivanova M.Y., Lomanovskaya T.A. Developmental Exposure to DDT Disrupts Transcriptional Regulation of Postnatal Growth and Cell Renewal of Adrenal Medulla. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 2774. <https://doi.org/10.3390/ijms24032774>

Сведения об авторах

Наталья Валентиновна Яглова

доктор мед. наук, зав. лабораторией, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия

Эл. почта: yaglova@mail.ru

Сергей Станиславович Обернихин

доктор мед. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия

Эл. почта: ober@mail.ru

Валентин Васильевич Яглов

доктор мед. наук, профессор, главный научный сотрудник, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

Светлана Владимировна Назимова

Канд. мед. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия

Эл. почта: pimka60@list.ru

Екатерина Петровна Тимохина

кандидат биол. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия

Эл. почта: rodich@mail.ru

Information about author

Nataliya Valentinovna Yaglova

Doctor of Science (Med.), Head of Department, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation E-mail: yaglova@mail.ru

Sergey Stanislavovich Obernikhin

Doctor of Science (Med.), Senior Scientist, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation E-mail: ober@mail.ru

Valentin Vasilyevich Yaglov

Doctor of Science (Med.), Professor, Principle Researcher, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation E-mail: vyaglov@mail.ru

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD (PhD (Med)), Senior Scientist, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation E-mail: pimka60@list.ru

Ekaterina Petrovna Timokhina

Ph.D.(Biol.), Senior Scientist, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation E-mail: ober@mail.ru

ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЙ ПОЗВОНОЧНИКА

В работе приводятся результаты исследований нарушений состояния мышечной системы позвоночника, предшествующих развитию остеохондроза позвоночника. Предлагаются методика тестирования и физические упражнения для реабилитации мышечной системы

Ключевые слова: спастические состояния мышц, функциональные пробы, физические упражнения, коррекция нарушений.

A.D. Cherkasov, A.B. Ilyin

Research FGBNU Institute of General Pathology and Pathophysiology

Research Institute of Sports and Sports Medicine

AGE DYNAMICS OF DEVELOPMENT OF SPINAL PATHOLOGIES

The paper presents the results of studies of disorders of the muscular system of the spine, preceding the development of osteochondrosis of the spine. It proposes a testing method and physical exercises for the rehabilitation of the muscular system.

Keywords: muscle spastic conditions, functional tests, physical exercises, correction of disorders.

Введение.

Боли в спине до недавнего времени отождествляли с остеохондрозом позвоночника. Остеохондроз позвоночника называли «Бичом XX века». Проблема остеохондроза позвоночника касается каждого человека, так как остеохондроз позвоночника считается одним из самых распространённых заболеваний человека. Остеохондрозу, по теории проф. Я.Ю. Попелянского, приписывается множество неврологических синдромов (комплексов симптомов) в позвоночнике и во всём теле. Термин "остеохондроз позвоночника" практически стал синонимом боли в спине. По этой теории остеохондроз позвоночника является нейро-ортопедическим заболеванием, то есть его лечением занимаются и невропатологи, и ортопеды, и нейрохирурги, и мануальные терапевты. «Первично это заболевание позвоночника, и значительная часть его клинических проявлений носит характер ортопедических синдромов» (вертебральные синдромы, по Я. Ю. Попелянскому) [4]. Развитие процесса приводит к воздействиям на нервные образования (и на питающие их сосуды) в позвоночном канале и межпозвонковых отверстиях, обуславливая неврологические синдромы – их компрессии или ишемии (синдромы, вертеброгенные по происхождению, но неврологические по своему характеру).

Количество дней нетрудоспособности вследствие болей в области опорно-двигательного аппарата и позвоночника лидирует в списке больничных листов. И, если раньше заболевания позвоночника относились к старшим возрастным группам, то ныне болезни, связанные с позвоночником, сильно помолодели. По данным московского центра мануальной терапии 70% людей нуждаются в услугах массажиста или мануального терапевта. Проф. Я.Ю. Попелянский заявляет: «По количеству дней нетрудоспособности среди всех хронических заболеваний человека на первом месте стоят радикулиты пояснично-крестцовые и шейно-грудные».

Ни гриппу, ни сердечно-сосудистым заболеваниям болезни позвоночника не уступают по величине материальных потерь, связанных с лечением и социальным обеспечением больных, которые несёт общество. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) констатирует: «... по статистике ВОЗ болями в позвоночнике страдает до 80% взрослого населения в период наиболее активной трудовой деятельности, начиная примерно с 25 лет».

В России в структуре заболеваемости с утратой трудоспособности взрослого населения более 50 % составляют заболевания периферической нервной системы – болевые

синдромы в спине и конечностях, на долю которых в амбулаторно-поликлинической практике приходится 76 % всех случаев и 71,9 % дней нетрудоспособности, а в неврологических стационарах соответственно – 55,5 % и 48,1 %. Высок также и процесс инвалидизации: среди инвалидов с заболеваниями периферической нервной системы в 80 % случаев наблюдаются вертеброгенные (вызванные заболеванием позвоночника) поражения. Кроме того, боли в спине и шее ограничивают жизнедеятельность, снижают качество жизни пациентов, изменяют психику и поведение людей. Более чем у половины пациентов, страдающих остеохондрозом позвоночника, имеются признаки хронического эмоционального напряжения.

Патология позвоночника занимает 5 место среди причин госпитализации и 3 место среди причин хирургического лечения. На конференции, проводимой ежегодно на кафедре нервных болезней 1-го Медицинского университета им. Сеченова, «Боль в спине – междисциплинарная проблема» в 2015 г. было принято решение не связывать более боль в спине с остеохондрозом позвоночника и называть боль в спине «неспецифическим болевым синдромом», причины которого неизвестны, и «специфическим болевым синдромом», вызванным грыжами межпозвонковых дисков. Соотношение между неспецифическим и специфическим болевыми синдромами это 80% и 20%. Таким образом, отечественная медицина до сих пор не знает причин болевых синдромов в позвоночнике.

В верхне-грудном отделе позвоночника последствием спастических состояний мышц являются вертебрально-кардиальные синдромы (ВКС), которые могут быть диагностированы и устранены [2, 3, 5]. Типичные проявления ВКС: стенокардия – боли в области сердца при физических нагрузках; синусовая аритмия; брадикардия; тахикардия (компенсаторная, снижающая сердечную недостаточность); кардиалгия – боли в области сердца; предсердная экстрасистолия; сердечная недостаточность – нехватка кислорода в состоянии покоя даже при наличии тахикардии; синдром ИБС при физических нагрузках при отсутствии органических нарушений коронарных артерий; сердечная недостаточность при низких физических нагрузках; спазмы коронарных артерий. Спастические состояния мышц позвоночника могут сохраняться длительное время. Следствием этого является остеохондроз позвоночника. Остеохондроз позвоночника возникает вследствие компрессии кровеносных сосудов, питающих позвонки, и нарушения их трофики [6, 7]. Остеохондроз позвоночника это необратимые дистрофические проявления в позвонках и межпозвонковых дисках. Спастические состояния межпозвонковых мышц, вызывающие остеохондроз позвоночника, при этом обратимы.

С остеохондрозом позвоночника в настоящее время связывают ряд хронических заболеваний. Это заболевания ЖКТ, почек и болевые синдромы в области сердца. Акад. А.Д. Сперанский разработал доктрину нейродистрофических нарушений, вызываемых нарушением состояния симпатической иннервации внутренних органов. Огромный экспериментальный материал, полученный во Всесоюзном Институте экспериментальной медицины, показал, что, воздействуя на проводимость симпатических нервов, можно вызвать любое хроническое заболевание внутренних органов [1].

Бывший министр образования РФ О.Ю. Васильева (09.10.2017), информировала, что внезапная сердечная смертность на уроках физкультуры в школах, ежегодно составляет более 200 учащихся, а в 2016/17 учебном году, 211 детей [9]. Кардиологи не могут дать объяснения этим трагическим событиям.

В предыдущих исследованиях показано, что остеохондроз позвоночника возникает вследствие компрессии кровеносных сосудов, питающих позвонки, и нарушения их трофики [5, 6]. Если при коронарографическом обследовании сердца в области позвоночника, из которой выходят сердечные симпатические нервы (область Th2 – Th5), обнаруживается остеохондроз позвоночника, то это означает, что в этой области имеются многолетние спастические состояния межпозвонковых мышц. Следовательно, компрессии подвергаются также симпатические сердечные нервы, управляющие, частотой сердечных сокращений, величиной сердечного выброса, метаболизмом миокарда и тонусом коронарных артерий.

Мы наблюдали много случаев нарушения сердечной деятельности, вызванные спастическими состояниями мышц позвоночника. Это были эпизоды брадикардии, вызванные

спазмами коронарных артерий, и единственный случай фибрилляции и остановки сердца. Обследование закончилось благополучно, сердце запустили. Парадоксальным в этом обследовании было прекрасное состояние коронарных артерий, но имел место сильный остеохондроз позвоночника в области выхода симпатических сердечных нервов из позвоночника.

Диагноз «Остеохондроз позвоночника» в 2020 г. был исключен из Международной Классификации Болезней 11 редакции как неврологическое заболевание. Но дистрофический процесс - остеохондроз позвоночника рассматривается нами как преждевременное старение костно-хрящевых тканей, мышц, кровеносной и нервной систем.

Таким образом, проблема нарушения сердечной деятельности, в решение которой спортивные специалисты призваны внести свою лепту, чрезвычайно актуальна и для спортсменов, и для школьников, занимающихся физической культурой. Открытым остается вопрос о возрастной динамике нарушений состояния мышц позвоночника, вызывающих нарушения в работе внутренних органов. В каком возрасте необходимо заниматься контролем за состоянием мышц позвоночника?

Цель работы – Поиск причин развития остеохондроза позвоночника и разработка методов его предотвращения. Выявление возрастной динамики развития патологических изменений в мышечном корсете позвоночника. Исследование функционального состояния мышечной системы позвоночника в разных возрастных категориях.

Материалы и методы.

Проводился анализ результатов МРТ позвоночника, применялись методы функциональных проб на латерофлексию, мануальное мышечное тестирование мышц позвоночника. При латерофлексии по меткам, поставленных анатомическим карандашом (или смываемым фломастером) на проекциях остистых отростков после фотографирования спины, измерялись углы изгибов в каждом сегменте позвоночника. Диаграммы, построенные на основе измеренных углов, позволили обнаружить и отобразить графически области позвоночника со сниженной подвижностью двигательных сегментов позвоночника.

Мануальная диагностика проводилась путем оказания давления с вибрацией на паравертебральные области спины на расстоянии 2 см от линии, соединяющей центры проекции остистых отростков. Давление оказывалось на участки межпозвонковых мышц, т.е. между остистыми и между поперечными отростками позвонков. Для коррекции состояния мышц применялись специальные физические упражнения, структурную основу которых составляют изгибы позвоночника в стороны и вперед - назад.

Проводилось исследование баскетболистов и пловцов в период 2016 года, сборных команд по водному поло, юношей ватерполистов в 2023 году, всего обследовано 125 спортсменов. Проведен анализ более 200 МРТ исследований патологических состояний позвоночника и более 60 коронарографических исследований, в которых авторы принимали участие.

Полученные результаты.

Возрастная динамика возникновения спастических состояний мышц позвоночника

Обследование подвижности позвонковых двигательных сегментов с помощью функциональных проб, мануальной диагностики позволили выявить спортсменов, испытывающих длительное время миофасциальные болевые синдромы (МФБС).

Мануальная диагностика с помощью вибрационного воздействия на паравертебральные области вызывала у них болевые ощущения в глубоких мышцах позвоночника – межпозвонковых мышцах. Обследование 30 юниоров по водному поло показало, что 10 спортсменов в возрасте от 13 до 18 лет имели нарушение подвижности сегментов позвоночника.

Мы приводим в качестве примера два крайних случая. В первом случае у спортсмена отсутствуют нарушения подвижности сегментов позвоночника (рис. 1А). Во втором случае позвоночник заблокирован во всех трех отделах (рис. 1Б).



Рис. 1. А. Пример измерения подвижности сегментов позвоночника. Спортсмен 16 лет имеет хорошую подвижность во всех отделах позвоночника. Угол наклона - 68 градусов.



Рис. 1. Б. Спортсмен 17 лет имеет области неподвижности во всех трех отделах позвоночника при латерофлексии и влево и вправо. Угол наклона - 24 градуса.

Также были обследованы 15 занимающихся и 15 не занимающихся спортом в возрасте от 18 до 30 лет. 50% обследованных, имели проблемы с межпозвонковыми мышцами.

Были также обследованы 37 добровольцев в возрасте от 40 до 55 лет. В этой возрастной группе две трети, из которых имели области с отсутствием подвижности в верхнем и среднем отделах позвоночника.

Среди 20 испытуемых в возрасте свыше 55 лет области с полной неподвижностью сегментов позвоночника были обнаружены у трех четвертых испытуемых. Одновременно оставшиеся испытуемые имели общее возрастное снижение гибкости позвоночника.

Связь нарушений сердечной деятельности со спастическими состояниями межпозвонковых мышц

Мы наблюдали многие случаи нарушения сердечной деятельности, вызванные компрессией симпатических сердечных нервов в результате развития спастических состояний в межпозвонковых мышцах позвоночника. Это были аритмии, предсердная экстрасистолия, брадикардия и сердечная недостаточность. Мы приводим всего один пример с мужчиной 24 лет, у которого после перетренированности в тренажерном зале возникла отдышка даже при небольших физических нагрузках. Мы начали с ним заниматься реабилитацией в апреле 2025 г. Нарушение в работе сердца возникло более четырех лет назад. Частота сердечных сокращений в покое составляет 75 ударов в минуту. Пульс плохо прощупывается.

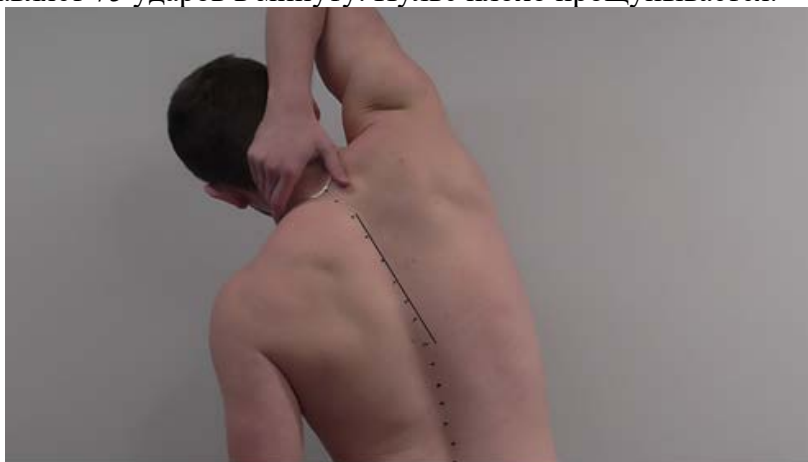


Рис. 2. Латерофлексия влево, мужчина 24 года. Шесть позвонков со второго по седьмой лежат на одной прямой.



Рис. 3. Латерофлексия вправо, мужчина 24 года. На одной линии лежат только 3 позвонка со второго по четвертый.

Мануальная диагностика выявила болевой синдром в правой паравертебральной зоне верхне-грудного отдела позвоночника. В левой паравертебральной зоне болевой синдром отсутствовал. Исследование подвижности сегментов позвоночника показала, что изгиб влево значительно меньше, чем изгиб вправо (рис. 2, рис. 3). Спастические состояния межпозвонковых мышц возникли по правой стороне позвоночника. Это вызывает компрессию симпатических сердечных нервов и как следствие сердечную недостаточность. Серия сеансов специального массажа глубоких мышц позвоночника значительно улучшило состояние нашего пациента. Его перестала мучить отдышка при небольшой физической нагрузке. Так как эти спастические состояния существуют уже более 4 лет, то этому пациенту требуется более продолжительная реабилитация, а именно: несколько серий массажа.

Результаты МРТ исследования состояния мышечного корсета позвоночника.

Был проведен анализ 200 МРТ обследований пациентов в возрасте от 17 до 60 лет с болями в различных отделах позвоночника.

В качестве примера рассмотрим МРТ футболиста, мужчины 23 лет, с болями в средне-грудном отделе позвоночника (рис. 4). Диск между 8-м и 9-м грудными позвонками имеет сниженную толщину и разрушенное пульпозное ядро. Диски между 5-м и 6-м, а также между 6-м и 7-м позвонками имеют начальную стадию остеохондроза. На основании мануального обследования можно сделать вывод, что боли в средне-грудном отделе позвоночника, длящиеся около трех лет, вызваны спастическим состоянием межпозвонковых мышц: межкостистых, межпоперечных и поперечно-остистых. Эти глубокие мышцы позвоночника в области болевого синдрома имеют темный фон, вызванный присутствием большего количества воды в мышцах. Это либо продолжительный спазм, либо воспалительный процесс, переходящий в отек.



Рис. 4. МРТ исследование грудного отдела позвоночника мужчины 23 лет.

Спастические состояния межпозвонковых мышц позвоночника предшествуют дистрофическим процессам в межпозвонковых дисках и телах позвонков. Начальные дистрофические процессы в позвоночнике являются следствием спастических состояний мышц в этом отделе, имевших место задолго до обследования.

Далее приводим МРТ грудного отдела позвоночника гандболистки 17 лет, в течение трех лет страдавшей болями в спине (рис. 5). На этом снимке присутствуют начальные проявления остеохондроза в области 12-го грудного позвонка, выраженные в небольшом снижении толщины диска, изменении его структуры — разрушается пульпозное ядро и возникают неровности на поверхности позвонка, примыкающего к этому диску. Это начальная стадия грыжи Шморля — внедрение диска в тело позвонка. В области 5 – 7 грудных позвонков обнаружены спастические состояния межпозвонковых мышц.

Спастические состояния мышц позвоночника в средне-грудном отделе предшествуют дистрофическим процессам в дисках и позвонках в этой области. Начальные дистрофические процессы в ниже-грудном отделе позвоночника являются следствием спастических состояний мышц в этом отделе, имевших место еще до обследования.

Функциональные пробы на латерофлексию показали почти нулевую подвижность во всем верхне-грудном отделе позвоночника (рис. 6).



Рис. 5. МРТ исследование грудного отдела позвоночника спортсменки 17 лет.

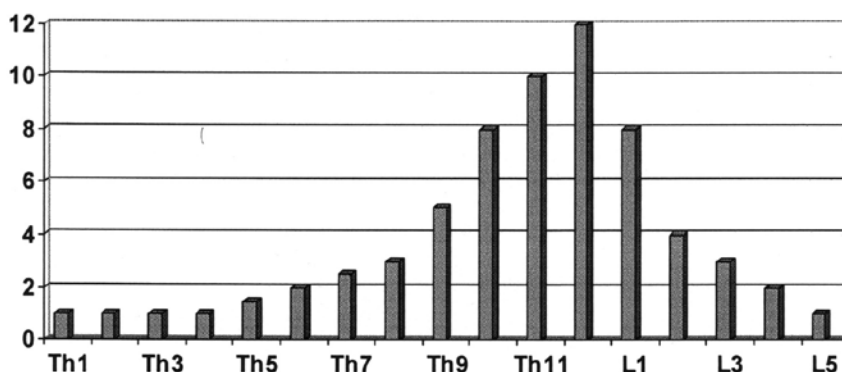


Рис. 6. Диаграмма подвижности сегментов позвоночника. Th1 – Th12 – грудные позвонки, L1 – L5 – поясничные позвонки.

Обсуждение

Остеохондроз позвоночника является проявлением преждевременного старения организма человека. С.П. Боткин еще более 100 лет назад создал концепцию преждевременного старения человека, причиной которого являются нарушения нервных механизмов, управляющих физиологическими процессами во внутренних органах. Согласно его представлениям и мнению ведущих геронтологов потенциал человеческой жизни составляет 120 – 140 лет. Причиной сокращения продолжительности жизни человека являются так называемые возрастные заболевания. На основании наших почти тридцатилетних исследований причиной возрастных заболеваний является остеохондроз позвоночника, нарушающий метаболизм и обновление тканей внутренних органов вследствие компрессии нервов симпатической нервной системы. Другая концепция преждевременного старения принадлежит И.И. Мечникову. По его концепции не старение вызывает возрастные заболевания, а, наоборот, хронические и возрастные заболевания приводят к преждевременному старению организма человека. Основным фактором преждевременного старения И.И. Мечников считал аутоинтоксикацию, вызванную нарушением очистительных механизмов организма человека, в основе которых лежат все те же нарушения в работе автономной (вегетативной) нервной системы.

Спастические состояния межпозвонковых мышц - это обратимые явления в отличие от остеохондроза позвоночника, и они могут быть предотвращены и устранены реабилитационными техниками: массажем глубоких мышц позвоночника и гимнастикой для позвоночника [11]. Применение этих профилактических и реабилитационных методов будет способствовать улучшению здоровья нации и долголетию граждан РФ.

Выводы.

1. Остеохондроз позвоночника является следствием развития долговременных спастических состояний в межпозвонковых мышцах позвоночника, приводящих к нарушению кровообращения в позвонках.
2. Остеохондроз позвоночника это не болезнь, а преждевременное старения костно-хрящевых тканей позвоночника и мышц позвоночника, вызванное нарушением трофики и обновления костных структур и самих межпозвонковых мышц.
3. Развитие остеохондроза начинается уже в подростковом возрасте, достигая 80% в пожилом возрасте.
4. Преждевременное старение позвоночника вызывает нарушение деятельности симпатической нервной системы, отвечающей за метаболизм и обновление тканей внутренних органов. Следствием этого являются хронические заболевания и сокращение продолжительности жизни человека.
5. Для предотвращения остеохондроза позвоночника программу физического воспитания школьников должны быть включены упражнения, предотвращающие и устраняющие спастические состояния межпозвонковых мышц.
6. Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

1. Остеохондроз позвоночника является фактором преждевременного старения организма человека и сокращения продолжительности жизни в следствие развития хронических заболеваний.
2. Развитие остеохондроза позвоночника может быть предотвращено или остановлено путем коррекции состояние мышц позвоночника.
3. Предотвращение остеохондроза позвоночника позволит увеличить продолжительность жизни каждого человека.

Литература

1. Ажипа Я.И. Трофическая функция нервной системы / Я.И. Ажипа. – М.: Наука, 1990.
2. Загорская Н.А., Волковитская А.Д. Комплексное лечение вертебрально-кардиального синдрома, обусловленного дорсопатиями / Н.А. Загорская, А.Д. Волковитская // XV-я конференция мануальных терапевтов. Бюллетень №7. – М., 2005. – С. 79-83.
3. Проскурин В.В. Диагностика и лечение вертеброгенных кардиалгий // Соматоневрологические синдромы: сборник научных трудов. – М.: РУДН, 1996. С. 89–95.
4. Черкасов А.Д. и др. Опыт наблюдения и устранения вертебрально-кардиальных синдромов в клинической практике и при занятиях физической культурой. Материалы III Международной научной интернет – конференции «Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы». 2014. С. 237-247.
5. Черкасов А.Д. Проблемы профилактики остеохондроза позвоночника при занятиях физической культурой и спортом. Вестник новых медицинских технологий. № 4. С. 52 – 59. Тула 2009 г.
6. Черкасов А.Д. Предотвращение остеохондроза позвоночника у подростков. Методические рекомендации для персонала детско-юношеских оздоровительных лагерей. «Издательские решения» По лицензии Ridero. 2021.
7. Maron, B. J. et al. Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the United States, 1980-2006. // Barry J. Maron , Joseph J. Doerer, Tammy S. Haas, David M. Tierney, Frederick O. Mueller / <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19221222/>
8. <https://uncutnews.ch/erschreckende-statistiken-die-zahl-der-sportler-die-ploetzlich-sterben-ist-um-3-800-gestiegen/>.
9. <https://ria.ru/20171009/1506476825.html>.
10. <https://goodsciencing.com>.
11. <https://healthsys.ru>.

Сведения об авторах

Черкасов Анатолий Данилович,
кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник ФГБНУ НИИ Общей
патологии и Патофизиологии,
Москва, Россия
E-mail: niiopp@mail.ru
E-mail: healthsys@mail.ru,

Ильин Александр Борисович,
к.п.н. ведущий научный сотрудник
НИИ спорта и спортивной медицины, до-
цент кафедры анатомии и биологической
антропологии,
ФГБОУ ВО «Российский университет
спорта ГЦОЛИФК», сайт: gtsolifk.ru
ideal122@yandex.ru,
Россия, Москва

Information about author

Cherkasov Anatoly Danilovich,
PhD, Senior Researcher at the Research FGBNU Institute of
General Pathology and Pathophysiology,
healthsys@mail.ru,
Russia, Moscow,
niiopp@mail.ru

Ilyin Alexander Borisovich,
PhD, leading researcher at the Research Institute of Sports
and Sports Medicine, Associate Professor of the Department
of Anatomy and Biological Anthropology, [ideal122@yan-
dex.ru](mailto:ideal122@yandex.ru), Russia, Moscow, Federal State Budgetary Educa-
tional Institution of Higher Education "Russian University of
Sport GTSOLIFK". gtsolifk.ru
Russia, Moscow

ПЕПТИД HLDF-6 ПРОЯВЛЯЕТ НЕЙРОПРОТЕКТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ.

Обзор посвящен анализу опубликованных данных по нормализующей и протекторной активности нейропротекторного пептида HLDF-6 при нейродегенеративных и цереброваскулярных заболеваниях. Пептид HLDF-6-H обладает терапевтическим потенциалом для создания на его основе фармацевтического препарата, предназначенного для лечения болезни Паркинсона.

Ключевые слова: пептид HLDF-6, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, тревога, депрессия, онкология, нейротрофические факторы, нейропротекторы.

Y.A. Zolotarev, A.K. Dadayan
¹ NRC «Kurchatov Institute»

PEPTIDE HLDF-6 EXHIBITS NEUROPROTECTIVE ACTIVITY IN NEURODEGENERATIVE DISEASES.

The review is devoted to the analysis of published data on the normalizing and protective activity of the neuroprotective peptide HLDF-6 in neurodegenerative and cerebrovascular diseases. The peptide HLDF-6-H has therapeutic potential for the creation of a pharmaceutical drug on its basis for the treatment of Parkinson's disease.

Keywords: HLDF-6 peptide, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, anxiety, depression, oncology, neurotrophic factors, neuroprotectors.

Нейродегенеративные и цереброваскулярные заболевания относятся к числу важнейших медико-социальных проблем современности, так как являются основной причиной смертности и инвалидизации населения России и зарубежных стран [1]. Существенным недостатком используемых для лечения этих заболеваний существующих фармацевтических средств является их недостаточная эффективность, привыкание и наличие нежелательных побочных эффектов [2]. Это служит причиной поиска новых высокоэффективных и малотоксичных препаратов. В последние годы пептиды, в результате их особых биохимических характеристик и терапевтического потенциала, вызывают значительный интерес для создания новых терапевтических препаратов с уникальными свойствами [3]. Короткоживущие регуляторные пептиды реализуют свое физиологическое действие в соответствии со своим триггерным механизмом через модулирование главных нейрорецепторных систем мозга [4]. В мире проводится активный поиск и разработка способов лечения нейродегенеративных и цереброваскулярных заболеваний с помощью пептидных препаратов. С этой целью были исследованы синтетические пептиды, структура которых аналогична фрагментам белкового фактора дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) [5]. Фактор дифференцировки HLDF является гликозилированным белком, содержащим 54 аминокислотных остатка. Фактор HLDF индуцирует дифференцировку по гранулоцитарному пути, а также проявляет ДНК/РНК-гидролизующую активность.

С помощью антител к синтезированному белковому фактору HLDF были установлены высокие уровни этого белка в гиппокампе и префронтальной коре самцов крыс линии Вистар [6]. Показано, что высокий уровень белка HLDF в сыворотке крови является новым маркером острых нарушений мозгового кровообращения и свидетельствует о меньшей тяжести и лучшем исходе из ишемического инсульта. [7]. Белковый фактор HLDF играет важную роль в функционировании гематоэнцефалического барьера. Иммунизация экспериментальных животных антителами белка HLDF приводит к геморрагическому инсульту вследствие

нарушения гематоэнцефалического барьера и разрушения эндотелиоцитов [8]. Белковый фактор HLDF обладает противоопухолевой активностью. Фактор дифференцировки HLDF оказывает влияние на продукцию цитокинов IL-1 β , TGF β 1, IL-8 и IFN γ иммунокомпетентными клетками периферической крови больных аденомами и аденокарциномами желудка. Было установлено, что в тех случаях, когда в слизистой оболочке желудка начинают появляться атипичные клетки, влияние фактора дифференцировки на способность иммунокомпетентных клеток продуцировать указанные цитокины достигает максимального уровня [9].

Нейропротекторный пептид HLDF-6 (TGENHR), соответствует фрагменту 41-46 белкового фактора дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) и полностью воспроизводит дифференцирующую и анти-пролиферативную активность HLDF [10]. Пептид HLDF-6 является представителем нового класса препаратов – пептидов-нейропротекторов и для него показана высокая нейропротекторная, нормализующая и ноотропная активность. В мире проводится активный поиск и разработка способов лечения нейродегенеративных и цереброваскулярных заболеваний с помощью пептидных препаратов. Однако ни одно из известных в настоящее время лекарственных средств на основе пептидов не имеет структурной гомологии с пептидом HLDF-6.

Пептид HLDF-6 проявляет мультитаргетную нейропротекторную активность, мишенями его фармакологической активности являются NMDA, метаботропная глутаматная, серотониновая и опиоидная системы. Установлена нейропротекторная и ноотропная активность пептида HLDF-6 на клеточных и экспериментальных моделях болезни Альцгеймера вызванных введением бета-амилоидного пептида A β 25–35 [11-13]. Пептид HLDF-6 реактивирует пониженные когнитивные функции экспериментальных животных, способствуя сохранению долговременной памяти и стимулирует нейростероидогенез в первичной культуре нейронов гиппокампа. При культивировании нейронов гиппокампа самцов крыс в присутствии β -амилоида было установлено, что нейропротекторная активность пептида HLDF-6 сопровождается увеличением пониженных уровней тестостерона и эстрадиола. Установлено, что гексапептид HDLF-6 нормализует поведенческие реакции и функции организма, зависящие от андрогенных гормонов и повышает сексуальную активность кастрированных самцов мышей путем модуляции активности 5-альфа-редуктазы [14]. 5-альфа-редуктаза играет важную роль в *de novo* синтезе нейростероидов в ЦНС. Наиболее значимый из них является аллопрегнанолон, который проявляет способность являться позитивным модулятором нейростероидного участка рецептора GABA-A [15].

Также была установлена нейропротекторная активность пептида HLDF-6 на трансгенной модели болезни Альцгеймера, в которой были использованы дабл-трансгенные мыши линии B6C3-Tg(APPswe,PSEN1de9)85Dbo (Tg+), экспрессирующие мутантный пресенилин человека и химерный амилоидный белок мышь/человек. Хроническое интраназальное введение пептида HLDF-6 в дозе 250 мкг/кг эффективно стимулирует выполнение когнитивных задач трансгенными мышами Tg+ в исследованной модели распознавание нового объекта и в модели пассивного избегания [16]. Нейропротекторная активность пептида HLDF-6 была установлена на модели ишемического инсульта. Пептид HLDF-6 защищает крыс при окклюзии сонных артерий также эффективно, как и препарат сравнения мексидол, который широко используется при лечении ишемического инсульта. Однако, пептид HLDF-6, по сравнению с ним, активен при 500 раз меньшей дозе и, в отличие от мексидола, кратное превышение эффективной физиологической дозы пептида HLDF-6 не токсично [17].

Для HLDF-6 в полном объеме с соблюдением международных правил GLP выполнены доклинические исследования в рамках создания препарата для лечения болезни Альцгеймера и ишемического инсульта. При проведении доклинических исследований пептида HLDF-6 было выполнено сравнительное изучение его амидной (TGENHR-NH₂) и кислотной (TGENHR) формы. Был сделан вывод о том, что амидная форма пептида HLDF-6 значительно превосходит кислотную форму пептида HLDF-6 по нейропротекторной и ноотропной активности. Амидная форма пептида HLDF-6 была выбрана для создания лекарственной формы препарата, предназначенного для лечения болезни Альцгеймера и ишемического инсульта.

Были выполнены исследования разнообразных форм общей и специфической токсичности, фармакокинетики, фармакодинамики, токсикокинетики и механизма действия пептида [18]. Было установлено, что основным процессом при протеолитическом гидролизе пептида кислотной формы HLDF-6 в плазме крови является его расщепление карбоксидипептидазой с образованием тетрапептида TGEN и дипептида HR [19], а гидролиз амидной формы пептида HLDF-6 происходит с N-конца пептидной цепи и основной вклад в этот процесс вносит фермент аминодипептидаза с образованием долгоживущего дипептида HR-NH₂. Период полудеградации амидной формы пептида HLDF-6 составляет 8 минут, что в 4 раза выше, чем у кислотной формы, составляющей 2 минуты [20]. Установлено, что лекарственная форма пептида HLDF-6 характеризуется высокой эффективностью, не обладает аллергентностью, мутагенностью, потенциальной канцерогенностью, иммунотоксическим действием, репродуктивной токсичностью, является безопасной в дозе, эквивалентной человеческой терапевтической и десятикратной терапевтической дозе (LD50 > 5000 мг/кг). Установлено, что амидная форма пептида HLDF-6 превосходит современные нейропротекторные и ноотропные лекарственные средства (нейромидин, мемантин, мексидол и пирацетам) по ноотропной и нейропротекторной активности [18].

Пептид HLDF-6 обладает высокой ноотропной активностью на неинвазивной модели «Закрытый крестообразный лабиринт». Пептид HLDF-6 (TGENHR-NH₂) дозозависимо увеличивает когнитивную активность при когнитивном дефиците экспериментальных животных. Пептид HLDF-6 увеличивает когнитивную активность у мышей Balb/c, обладающих когнитивным дефицитом, и не оказывает влияния на мышей C57Bl/6, с нормальным уровнем когнитивной активности [21]. С использованием меченого тритием пептида [³H]Ac-HLDF-6-NH₂ было впервые продемонстрировано, что на мембранных препаратах, приготовленных из головного мозга самцов крыс Вистар, имеются места высокоаффинного специфического связывания пептида HLDF-6 и его производных. Показано, что величина IC₅₀ для исходного пептида HLDF-6 составляет 1813 ± 0.19 нМ, тогда как у его содержащих защитную группировку производных амидной формы пептидов HLDF-6 (TGENHR-NH₂) и HLDF-6-H (TGEXHR-NH₂, где X = Hse) эта величина составляет 531 ± 0.15, и 574 ± 0.14 нМ, соответственно. Таким образом, у пептида HLDF-6 и его производных обнаружена общая мишень специфического связывания на мембранах головного мозга крыс. Введение амидной защиты в пептид HLDF-6 не только не лишило этих производных средства к местам специфического связывания на мембранах мозга, но и привело к увеличению сродства к местам связывания [³H]Ac-TGENHR-NH₂ в 3.4 и 3.3 раза, соответственно. Можно предположить, что большая величина специфического связывания для амидных форм пептидов HLDF-6 вносит свой вклад и в увеличение ноотропной и нейропротекторной активности, по сравнению с исходной, не содержащей защитных группировок формой пептида HLDF-6 [21].

Пептид HLDF-6 обладает высокой анксиолитической активностью. В тесте «Открытое поле» была изучена фармакодинамика многократного интраназального и внутрибрюшинного введения пептида HLDF-6 самцам мышей Balb/c, обладающих патологической тревожностью. Исследуемая амидная форма пептида HLDF-6 в дозе 0.3 мг/кг демонстрирует анксиолитический эффект, сравнимый, и в ряде случаев превосходящий активность препарата сравнения – диазепама в дозе 0.5 мг/кг. При этом мультитаргетный нейропротекторный пептид HLDF-6 селективно действует на животных при тревожных расстройствах, при этом он свободен от нежелательных побочных эффектов, присущих не селективно действующим бензодиазепинам. Нейропротекторный пептид HLDF-6 оказывает нормализующее влияние на животных при тревожной патологии и не проявляет нежелательную физиологическую активность в норме. Нейропротекторный пептид HLDF-6 обладает высокой активностью при патологии и отсутствием токсичности, что во многом связано с триггерным механизмом его действия. Было показано, что хроническое введение исследуемого пептида в дозе, эквивалентной человеческой терапевтической, фармакологически значимый селективный анксиолитический эффект развивается в течение 2-3 недель.

Было выполнено исследование влияния пептида HLDF-6 на нейромедиаторные

системы мозга, контролирующие уровень тревожности и исследовательской активности. Проведен анализ изменения плотности пАСh никотиновых, 5-HT₂ серотониновых, ГАМК-А и NMDA-глутаматных рецепторов в префронтальной коре и гиппокампе мозга мышей инбредных линий C57BL/6 и Balb/c с помощью радиорецепторного метода. Субхроническое системное введение пептида HLDF-6 (TGENHR-NH₂) в ежедневной дозе 100 мкг/кг приводит к снижению патологической тревожности и сопровождается увеличением пониженной плотности NMDA-глутаматных рецепторов гиппокампа мышей линии Balb/c, обладающих патологической тревожностью, до уровня мышей C57BL/6, с нормальным уровнем тревожности. Субхроническое 5-кратное введение пептида HLDF-6 не оказывало влияния на плотность ГАМК-А и никотиновых холинорецепторов, но сопровождалось неизбирательным снижением плотности 5-HT₂ серотониновых рецепторов лобной коры у обеих линий. Сделан вывод о том, что механизм формирования специфической фармакологической активности пептида HLDF-6 связан в первую очередь с воздействием на NMDA-глутаматергическую рецепторную систему гиппокампа, при участии 5-HT₂ серотониновых рецепторов в префронтальной коре [22].

Для пептидов характерны отсроченные эффекты, благодаря их регуляторной (триггерной) функции. Триггерный механизм действия нейроактивных регуляторных пептидов отличается от действия традиционных фармацевтических препаратов тем, что пептид вызывает быстрые по времени и длительно существующие перестройки в центральных регуляторных системах гомеостаза, после чего пептид за время около получаса полностью превращается в смесь природных аминокислот [3]. Позитивные нормализующие перестройки, происходящие под действием пептида в ЦНС, наблюдаются ещё в течение нескольких дней. Так, в поведенческих тестах на экспериментальной модели болезни Альцгеймера было установлено, что когнитивная активность HLDF-6-амида, измеренная через пять дней после субхронического введения пептида, превосходит активность традиционных лекарств, субхронически вводившихся ежедневно перед началом эксперимента [13].

Пептид HLDF-6 обладает противоопухолевой активностью. Исследования, проведенные на перевиваемой асцитной опухоли лимфолейкоза Р-388 и в культуре клеток, показали, что пептид HLDF-6 тормозил рост экспериментальной опухоли, снижая выживаемость опухолевых клеток и повышая цитотоксическую активность перитонеальных макрофагов в отношении клеток Р-388 *in vitro* [23]. Для пептида HLDF-6 установлена способность ингибировать пролиферацию и усиливать гибель клеток лимфосаркомы штаммов LS и RLS. Противоопухолевый эффект пептид HLDF-6 обусловлен его антипролиферативным и апоптогенным воздействием на клетки лимфосаркомы [24]. Пептид HLDF-6 модулирует активность клеток иммунной системы, взаимодействуя с эндогенной опиатной системой и повышая макрофагальную активность [25].

Пептид HLDF-6 проявляет способность преодолевать изменения в организме, вызванные старением. Возрастное снижение эректильной способности и сексуальной мотивации (либидо) представляет собой серьезную социальную проблему и одним из потенциальных подходов к лечению этого возрастного состояния здоровья является использование терапевтических пептидов для борьбы с окислительным стрессом и провоспалительными заболеваниями, связанными со старостью. Пептид HLDF-6-H предотвращает вызванное старением снижение либидо и потенции у самцов старых крыс и восстанавливает защиту от оксидативного стресса [26]. Причем, этот эффект обусловлен центральным нормализующим действием на гомеостаз, включая развитие противовоспалительного эффекта и нормализацию редокс гомеостаза и не связан с изменением уровней сексуальных гормонов. Поведенческие тесты показывают, что введение HLDF-6-H увеличивало общую половую активность у самцов крыс 20-месячного возраста. Количество наблюдаемых садок и интромиссий, а также количество успешных актов спаривания (интромиссий и эякуляций) были значительно выше в группе лечения по сравнению с контрольной группой. Количество интромиссий у контрольных 20-месячных крыс в среднем составляет 11.8 ± 3.0 за 30 минут, что согласуется с количеством интромиссий у здоровых взрослых самцов крыс, составляющим в среднем около 14 ± 1.5 за

30 минут [27]. Вместе с тем, этот параметр значительно выше в группе, получавшей пептид (18.3 ± 1.6 , $p < 0.05$). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что HLDF-6-Н стимулирует половую активность у старых самцов крыс. У старших крыс 26 - месячного возраста общая половая активность в контрольной группе снижалась по сравнению с более молодыми крысами, однако уровни половой активности в экспериментальных группах достоверно не различались между собой. Готовность самцов к спариванию в экспериментальной группе не изменилась, но значительно снизилась в контрольной.

Пептид HLDF-6-Н восстанавливает защиту от оксидативного стресса у старых животных, модулируя активности глутатион-S-пероксидазы и лейкоцитарной эластазы [26]. В сыворотке крови исследовались активности маркеров воспаления: лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) и $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора ($\alpha 1$ -ПИ), являющихся факторами врожденного и адаптивного иммунитета. ЛЭ принимает участие в дегенеративных и воспалительных заболеваниях, а $\alpha 1$ -ПИ относится к белкам острой фазы и является основным регулятором активности ЛЭ. Было установлено, что введение пептида HLDF-6-Н связано со значительным снижением активности лейкоцитарной эластазы с 863 ± 74 до 530 ± 114 nmol/min/ml ($p < 0.05$), но не оказывает влияния на активность ее ингибитора $\alpha 1$ -ПИ. Снижение активности эластазы после введения HLDF-6-Н свидетельствует о том, что этот пептид обладает противовоспалительными свойствами.

Пептид HLDF-6-Н показал свою перспективность для создания на их основе препаратов с антивозрастной активностью. Установлено, что HLDF-6, введенный крысам разного возраста, регулирует ритм синтеза белка в гепатоцитах, исправляя нарушения при старении [28]. HLDF-6 нормализует межклеточные взаимодействия и около часовые ритмы синтеза белка, значительно сниженные при старении. Регуляторный эффект пептида сохранялся по меньшей мере 2 дня после однократного введения крысе. Пептид HLDF-6 оказывает влияние на восстановление около часовых ритмов синтеза белка в гепатоцитах, нарушенное у старых животных [29]. Показано, что HLDF-6 проявляет этот нормализующий эффект через метаботропный глутаматный рецептор mGlu2/3. Блокирование этого рецептора антагонистом MCPG снимает положительный нормализующий эффект пептида. Известно, что активация метаботропных рецепторов приводит к уменьшению проявлений дисфункций в экспериментальной модели БП [30].

Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее распространенных хронических возрастных нейродегенеративных заболеваний, которое характеризуется тремором покоя, брадикардией, ригидностью и снижением постурального рефлекса вследствие дегенерации дофаминергической нигростриатной системы [31]. Клинические проявления БП неизбежно прогрессируют от легкого тремора в покое до тяжелой инвалидности, включая такие немоторные симптомы, как тревога, депрессия, вегетативная недостаточность и когнитивные нарушения [32]. Моторное поведение является результатом взаимодействия целой цепочки структур, входящих в корково-стриарно-таламокортикальную петлю, образованную моторной корой, стриатумом, паллидумом, субталамическим ядром, таламусом и черной субстанцией. В реализации движения напрямую задействованы дофаминовая, глутаматная и ГАМК системы. При БП имеется множество патологических каскадов, связанных с развитием нарушений убиквитин-протеасомного пути, активацией микроглии и дисфункцией в митохондриях, которые приводят к эксайтотоксичности, активации NMDA-рецепторов, окислительному стрессу и апоптотической гибели клеток. В патогенезе БП присутствует гиперэкспрессия α -синуклеина, его агрегация в нейронах и образование телец Леви. Нейродегенерация в SNpc сопровождается нарушением баланса нейротрофинов, провоспалительных цитокинов и стероидов. БП на сегодняшний день относится к неизлечимым идиопатическим нейродегенеративным заболеваниям, и нахождение путей для преодоления дегенерации нигростриатной системы при БП является по-настоящему актуальным. [33].

В мире пока не создано препарата, способного хотя бы остановить прогрессирование этого заболевания [34]. Синтетический инновационный нейропротекторный пептид HLDF-6-Н представляет интерес для решения этой проблемы. Патогенез БП связан с одновременным

повреждением нервной, эндокринной и иммунной систем. По этой причине достичь успеха в лечении БП можно при использовании мультитаргетного нейропротекторного препарата, оказывающего регуляторное воздействие на все эти системы. Снижение уровня дофамина в стриатуме является ключевым фактором патогенеза БП и коррелирует с тяжестью заболевания. Установлено, что свойствами мультитаргетного нейропротектора обладает синтетический нейропротекторный пептид HLDF-6-H, хроническое интраназальное применение которого приводит к нормализации уровня дофамина в стриатуме и двигательной активности на экспериментальной модели БП [35].

Снижение уровня DA в стриатуме является ключевым фактором патогенеза БП и коррелирует с тяжестью заболевания. Поэтому уровень DA в стриатуме используется в качестве основного параметра для описания степени повреждения для МФТП модели БП и для характеристики специфической активности препаратов антипаркинсонического действия. На модели досимптомной стадии БП через три недели после введения МФТП концентрация DA в стриатуме снизилась на 58%, с 66.7 до 28.2 нмоль/г ткани ($t = 18.8$, $p < 0.0001$). Результатом трехнедельного приема HLDF-6-H стало достоверное повышение концентрации DA на 55% до 43.6 нмоль/л. г ткани ($t = 8.6$, $p < 0.001$). Таким образом, в результате применения пептидов уровень DA в стриатуме снижался у пораженных мышей и корректировался при применении HLDF-6-H, что является отражением восстановительного процесса в нигростриарной системе. В результате хронического введения HLDF-6-H, наряду с повышением уровня DA, корректировались измененные при поражении МФТП концентрации метаболитов в стриатуме. Полученные результаты подтверждают антипаркинсонический эффект HLDF-6-H [35].

Участие метаболитных глутаматных рецепторов в реализации физиологических эффектов HLDF-6 может оказаться важным фактором в проявлении его антипаркинсонической активности. Это связано с тем, что на нейронах стриатума происходит конвергенция аксонов нигральных дофаминергических нейронов и кортикальных глутаматергических нейронов. При БП развивается дефицит DA, что приводит в стриатуме к нарушению баланса активности между GABA-ергическими нейронами прямого и непрямого пути. Дефицит DA приводит к тому, что GABA-ергические стриопаллидарные волокна прямого пути свою ингибиторную активность снижают, а волокна непрямого пути ее увеличивают. В конечном счете, следствием гиперактивности GABA-ергических нейронов непрямого пути является чрезмерное ингибирование моторной коры субталамическими ядрами и развитие двух основных симптомов БП - брадикинезии и ригидности [36].

Задача анализа двигательных дисфункций на досимптомной стадии БП до последнего времени оставалась нерешенной. В новом поведенческом тесте «Решетка» удалось решить эту задачу. Тест «Решетка», является компьютеризированной установкой, включающей камеру с сетчатым дном размером 500 на 100 мм. После помещения в эту камеру экспериментального животного камера может переворачиваться в вертикальное или горизонтальное (кверху сетчатым дном) положение. Оценивается перемещение животного по сетчатой поверхности и время нахождения животного на горизонтальной решетке. С использованием теста «Решетка» было установлено, что значимый нейропротекторный эффект от применения пептида HLDF-6-H развивается в течение 3 недель. В результате хронического интраназального введения мультитаргетного нейропротекторного пептида HLDF-6-H наблюдается, как восстановление нарушенных поведенческих функций животных, так и достоверное восстановление уровней дофамина в стриатуме и эстрадиола в сыворотке крови [35].

В настоящее время причины БП остаются неизвестными, но есть данные о том, что дегенерация нигростриарных дофаминергических нейронов сопровождается повышением уровня провоспалительных цитокинов и снижением уровня нейротрофических факторов. В группе «Токсин» через три недели после введения МФТП наблюдалось снижение уровня мРНК нейротрофина BDNF на 21% в целом мозге мышей. Интраназальное введение HLDF-6-H в течение трех недель привело к повышению уровня мРНК нейротрофина BDNF на 45% ($F = 4.48$, $p < 0.001$). Трансформирующий фактор роста TGF β 1 играет роль регулятора дифференцировки нервных и иммунных клеток, инициирует апоптоз большинства типов клеток и

участвует в патогенезе БП. В группе «Токсин» через три недели после введения МФТП наблюдалось повышение уровня мРНК TGF β 1 на 22% ($F = 2.55$, $p = 0.05$). На этом фоне трехнедельное интраназальное введение HLDF-6-H приводит к снижению на 18% ($F = 2.24$, $p = 0.10$,) уровня мРНК TGF β 1 [35]. Таким образом, в результате применения HLDF-6-H происходит нормализация уровней мРНК нейротрофина BDNF и TGF β 1 $\square\square$ измененных в результате действия токсина МФТП.

Некоторые цитокины, наряду с иммунотропными, обладают нейротропной активностью и могут регулировать синтез нейротрофинов в центральной нервной системе, оказывая тем самым защитное действие [37]. В настоящее время накоплен большой объем данных об участии воспаления в БП, и, в частности, у больных БП обнаружено повышение уровней воспалительных цитокинов в нигростриальной области [38, 39]. Более того, показано, что БП сопровождается не только воспалительными процессами в мозге, но и повышением уровней циркулирующих маркеров воспаления. Так, у больных БП в сыворотке крови отмечаются повышенные уровни таких ключевых про- и анти-воспалительных цитокинов, как IFN-gamma, IL-1beta, IL-6, IL-10, TNF-alpha и TGF-beta1, что свидетельствует о наличии системного воспалительного ответа при БП [38, 40-42]. При этом обнаружены корреляции между уровнями ряда цитокинов в сыворотке крови и степенью выраженности и/или стадией БП [40, 42]. В экспериментальных моделях БП введение МФТП животным также вызывает повышение уровней циркулирующих про-воспалительных цитокинов [43]. Введение МФТП в группе «Токсин» через три недели привели к снижению уровня мРНК IL1 $\square\square$ и IFN $\square\square$ на 40% и 31% ($F = 2.81$, $p = 0.027$) в целом мозге мышей. На этом фоне три недели интраназального введения HLDF-6-H приводили к 100% и 40% повышению уровней IL-1 $\square$ ($F = 3.16$, $p = 0.011$) и мРНК IFN $\square\square$ ($F = 3.84$, $p = 0.002$), соответственно [35]. Таким образом, в результате применения HLDF-6-H происходит повышение уровней мРНК IL1 $\square\square$ и IFN $\square\square$ сниженных в результате действия токсина МФТП.

В период манифестации клинической стадии БП возникают моторные симптомы, такие как брадикинезия и/или тремор покоя, и/или мышечная ригидность. На более поздних стадиях присоединяется снижение постурального рефлекса по типу неустойчивости и падения вследствие нигростриарной дофаминергической дегенерации [31]. Нейропатология начальной стадии БП часто включает немоторные расстройства, которые охватывают различные аспекты жизнедеятельности и проявляются на доклинической стадии БП за много лет до развития классических двигательных нарушений. К немоторным дисфункциям относят такие проявления, как эмоциональные (тревога, депрессия, апатия, ангедония), вегетативные (обонятельные дисфункции, констипация, астения, инсомния и дневная сонливость, болевые ощущения) и когнитивные (легкие или умеренные, брадифрения) [32, 44].

Установлено, что на МФТП модели досимптомной стадии БП, в результате одновременного действия токсина МФТП и трехкратного стрессирующего влияния теста «Вынужденное плавание» (ВП) наблюдается развитие депрессивно-подобного синдрома, который блокируется пептидом HLDF-6-H [44]. Время иммобилизации животных группы «Токсин» достоверно превышает этот параметр у животных группы «Контроль». Время иммобилизации мышей группы «Токсин» повышается в 1.5 раза ($p < 0.05$), по отношению к контролю, под действием токсина и снижается практически до уровня контроля после хронического интраназального применения пептида в дозе 300 мкг/кг, ежедневно, в течение трех недель (141 ± 17 , $204 \pm 20^*$ и 172 ± 11 сек в группах «Контроль», «Токсин» и «Пептид», соответственно, $p < 0.05$). При тестировании на первой и второй неделях после введения токсина подобных отличий не наблюдалось [45].

Все нейродегенеративные заболевания сопровождаются развитием нейровоспаления, ассоциированного с развитием воспалительных реакций в кровяном русле. Оценка развития нейровоспаления при развитии депрессии на МФТП модели БП проводилась по активности маркеров ЛЭ и α 1-ПИ в сыворотке крови. На рассмотренной МФТП модели БП установлено, что противовоспалительное действие HLDF-6-H связано со снижением активности ЛЭ. Время иммобилизации мышей в тесте ВП положительно коррелирует с уровнем ЛЭ ($r = +$

0.81, $p = 0.015$) и отрицательно с $\alpha 1$ -ПИ ($r = -0.79$, $p = 0.012$). Из корреляционной зависимости следует, что проявление депрессии снижается при снижении активности ЛЭ в сыворотке крови [45].

Развитие депрессии на МФТП модели влияет на уровни провоспалительных цитокинов в отделах мозга. При развитии депрессии на МФТП модели БП происходит повышение уровня мРНК про-воспалительного интерлейкина IL-1 β в гипофизе на 28% в группе «Токсин» от контроля ($p < 0.05$). Уровень мРНК IL-1 β в гипофизе в группе 2Пептид» в результате применения пептида HLDF-6-Н достоверно не отличается от контроля. Время иммобилизации в тесте ВП положительно коррелирует с повышением уровня мРНК IL-1 β ($r = +0.68$, $p = 0.016$) в гипофизе. Из корреляционной зависимости следует, что при повышении концентрации IL-1 β в гипофизе проявление депрессии усиливается, а действие пептида направлено на его нормализацию. При развитии депрессии на МФТП модели, уровень мРНК фактора некроза опухоли α (TNF- α) в среднем мозге и гипоталамусе увеличивается на 17 и 19% в группе «Токсин» и снижаются до уровня контроля под действием пептида. Уровни мРНК TNF- α в среднем мозге и гипоталамусе положительно коррелируют со временем иммобилизации мышей в тесте ВП ($r = +0.56$, $p = 0.048$) и ($r = +0.80$, $p = 0.005$), соответственно. Из корреляционных зависимостей следует, что при повышении уровня мРНК TNF- α в среднем мозге и гипоталамусе проявление депрессии усиливается, а действие пептида направлено на его нормализацию [45].

Пептид HLDF-6-Н восстанавливает в нигростриатной системе уровень IL-1 β , обладающего наряду с иммуотропной и нейротропной активностью, регулируя синтез нейротрофинов в ЦНС и стимулируя аксоногенез на МФТП модели БП [37]. Восстановление аксонов SNpc нейронов приводит к росту дофамина в стриатуме и сопровождается купированием симптомов БП. Через три недели после введения МФТП наблюдалось снижение уровня мРНК IL-1 β в стриатуме и среднем мозге мышей на 15 и 24%, соответственно. Введение HLDF-6-Н приводило к повышению уровня мРНК IL-1 β в среднем мозге мышей на 28% ($p < 0.05$). Уровень мРНК IL-1 β в стриатуме отрицательно коррелирует со временем иммобилизации в тесте ВП ($r = -0.659$, $p = 0.020$). Таким образом, повышение уровня мРНК IL-1 β в нигростриарной системе сопровождается снижением проявления депрессии. Ранее было установлено, что протекторное влияние пептида HLDF-6-Н на МФТП модели досимптомной стадии БП также сопровождается восстановлением пониженных уровней мРНК IL-1 β и мРНК IFN γ в целом мозге мышей [37].

Хроническое лечение пептидом HLDF-6-Н при развитии депрессии на МФТП модели БП оказывает влияние на измененные уровни нейротрофических факторов и ростовых факторов в отделах мозга. Одним из ключевых отделов мозга при развитии стресса и депрессии является гипофиз. В гипофизе животных группы «Токсин» по сравнению с контролем произошло некоторое снижение мРНК BDNF. В результате применения пептида в течение трех недель, уровень мРНК BDNF в гипофизе в группе «Пептид» увеличился на 41% ($p < 0.05$), по сравнению с группой «Токсин». При этом в гипофизе уровень мРНК BDNF отрицательно коррелировал со временем иммобилизации в тесте ВП ($r = -0.69$, $p = 0.019$). Из корреляционной зависимости следует, что при повышении уровня мРНК BDNF в гипофизе проявление депрессии снижается, и действие пептида HLDF-6-Н направлено на нормализацию проявлений депрессии [45].

Хроническое лечение пептидом HLDF-6-Н при развитии депрессии на МФТП модели БП оказывает влияние на систему кортикостероидов и половых гормонов. При развитии депрессии на МФТП модели БП происходит снижение уровней эстрадиола и кортизола, а действие HLDF-6-Н приводит к их восстановлению. По сравнению с группой «Контроль», через три недели после введения МФТП происходит снижение уровня кортизола и эстрадиола на 42 и 28%, соответственно ($p < 0.05$). По сравнению с группой «Токсин», три недели интраназального введения HLDF-6-Н приводит к повышению уровней кортизола и эстрадиола на 41 и 26%, соответственно ($p < 0.05$). Для мышей получавших пептид, время иммобилизации в тесте ВП, отрицательно коррелирует с кортизолом ($r = -0.78$, $p = 0.022$) и с эстрадиолом (r

= - 0.73, $p = 0.015$). Из корреляционной зависимости следует, что при повышении уровней кортизола и эстрадиола в кровяном русле, проявление депрессии снижается, и действие пептида HLDF-6-N направлено на нормализацию проявлений депрессии. В результате применения пептида HLDF-6-N наблюдается значительное, на 46% ($p < 0.05$) увеличение в кровяном русле уровня прогестерона, обладающего высокой нейропротекторной активностью. Время иммобилизации мышей в тесте ВП отрицательно коррелирует с уровнем прогестерона ($r = -0.67$, $p = 0.011$). Из корреляционной зависимости следует, что при повышении уровня прогестерона в кровяном русле, проявление депрессии снижается, и действие пептида HLDF-6-N направлено на нормализацию проявлений депрессии.

Таким образом, в результате исследований на экспериментальной модели БП было установлено нейропротекторное, нормализующее, антидепрессантное и противовоспалительное действие HLDF-6-N. Хроническое интраназальное применение HLDF-6-N на экспериментальной модели БП приводит к нормализации локомоторной активности, уровней моноаминов, нейротрофинов и цитокинов в отделах мозга, уровней стероидов в кровяном русле и сопровождается снижением воспалительных реакций. Результатом применения пептида HLDF-6-N является купирование патологических симптомов БП в нервной, эндокринной и иммунной системе [45].

Заключение

Пептид HLDF-6 проявляет широкую фармакологическую активность в отношении NMDA, метаботропной глутаматной, серотониновой и опиоидной систем, оказывая нейропротекторное, ноотропное, анксиолитическое, дифференцирующее, противоопухолевое и антивозрастное действие на экспериментальных моделях нейродегенеративных и цереброваскулярных заболеваний. Пептид HLDF-6-N проявляет нейропротекторную, антидепрессантную и противовоспалительную активность и обладает терапевтическим потенциалом для создания на его основе фармакологического препарата, предназначенного для лечения болезни Паркинсона

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература.

1. Steinmetz J.D., Seeher K.M., Schiess N., Nichols E., Cao B., Dua T., et al. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 // *The Lancet Neurology*. 2024. V. 23. No. 4. P. 344–381.
2. Prince M., Albanese E., Guerchet M., Prina M. // *World Alzheimer Report*. 2014. Website www.alz.co.uk/worldreport.
3. Lei Wang, Nanxi Wang, Wenping Zhang, Xurui Cheng, Zhibin Yan, Gang Shao, Xi Wang, Rui Wang and Caiyun Fu. Therapeutic peptides: current applications and future directions. // *Sign. Transduc. and Targ. Ther.* 2022. V. 7: 48.
4. Ashmarin I.P., Rud'ko O.I., Danilova R.A., et al. Postponed effect of cholecystokinin fragments 30–33 (CCK-4), and 31–33 (CCK-3), on albino rats behaviour. // *Neuroscie. Research. Commun.* 2004. V. 34. № 3. P. 165.
5. Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M. A new human leukemia cell 8.2 kDa differentiation factor: Isolation and primary structure determination. // *FEBS Lett.* 1994. V. 356. № 2–3. P. 327.
6. Sewell R.D.E., Gruden M.A., Pache D.M., et al. The Precursor of Differentiation Factor HLDF and Ribosomal Protein RPS21 Have a Common N-Terminal Sequence. // *J. Psychopharmacol.* 2005. V. 19. P. 602.
7. Шерстнев В.В., Юрасов В.В., Широков Е.А., Грудень М.А., Яковлева Н.Е., Костанян И.А., Шетова И.М., Денищук И.С., Губская О.Б., Елистратова Е.И., Скворцова В.И. Protein HLDF and antibodies to it as molecular pathogenetic factors and new markers of acute cerebrovascular disturbances. // *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С.Корсакова*. 2004. № 12. С. 53.

8. Гапон М.В., Драницына С.М., Минкевич Н.И., Грудень М.А., Бабиченко И.И., Костанян И.А. *Experimental Model of Hemorrhagic Stroke: Rabbit Immunization with HL-60 Promyelocytic Cell Differentiation Factor*. // Бюл. Экспер. Биол. Мед. 2006. Т. 141. № 2. С. 237.
9. Соснина А.В., Михайлова Е.С., Морозов Д.В., Аутенилюс А.И., Вараксин Н.А., Шпагина Л.А., Воробьева Е.Е., Ракитина Т.В., Липкин В.М. // Медиц. Иммунол. 2015. Т. 17. №. 2. С. 135.
10. Костанян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницына С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М. Биологически активный фрагмент фактора дифференцировки клеток линии HL-60. Идентификация и свойства. // Биоорг. химия. 2000. Т. 26. № 7. С. 505.
11. Костанян И.А., Жохов С.С., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Сурина Е.А., Бабиченко И.И., Шерстнев В.В., Липкин В.М. Нейропротекторное действие пептида HLDF-6 на нейроны гиппокампа крыс на модели болезни Альцгеймера *in vivo* и *in vitro*. // Биоорг. химия. 2006. Т. 32. № 4. С. 399.
12. Сторожева З.И., Прошин А.Т., Жохов С.С., Шерстнев В.В., Родионов И.Л., Липкин В.М., Костанян И.А. Гексапептиды HLDF-6 и PEDF-6 восстанавливают память у крыс при хроническом введении β -амилоидного пептида A β (25-35) в желудочки мозга. // Бюл. Эксп. Биол. Мед. 2006. Т. 141. № 3. С. 292.
13. Bogachouk A.P., Storozheva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Yu.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A. and Lipkin V.M. Comparative study of the neuroprotective and nootropic activities of the carboxylate and amide forms of the HLDF-6 peptide in animal models of Alzheimer's disease. // J. Psychopharmacol. 2016, V. 30. N. 1. P. 78.
14. Rzhovsky D.I., Zhokhov S.S., Babichenko I.I., Goleva A.V., Goncharenko E.N., Baizhumanov A.A., Murashev A.N., Lipkin V.M., Kostanyan I.A. HLDF-6 peptide affects behavioral reactions and organism functions dependent on androgen hormones in normal and castrated male mice. // Regul. Peptides. 2005. V. 127. № 1. P. 111.
15. Finn D.A., Beadles-Bohling A.S., Beckley E.H., et al. A New Look at the 5 α -Reductase Inhibitor Finasteride. // CNS Drug Reviews. 2006. V. 12. № 1. P. 53.
16. . Богачук А.П., Сторожева З.И., Телегин Г.Б., Чернов А.С., Прошин А.Т., Шерстнев В.В., Золотарев Ю.А., Липкин В.М. Специфическая активность амидной формы пептида HLDF-6: изучение на трансгенной модели болезни Альцгеймера. // Act. Natur. 2017. Т. 9. № 3 С. 68.
17. Костанян И.А., Сторожева З.И., Семёнова Н.А., Липкин В.М. Пептид HLDF-6 уменьшает когнитивные дисфункции и поражение мозга, вызванные хронической ишемизацией головного мозга крысы. // Докл. Акад. Наук., 2009. Т. 428, № 4, С. 565.
18. Липкин В.М., Золотарев Ю.А., Азев В.Н., Ржевский Д.И., Телегин Г.Б., Сторожева З.И., Ковалев Г.И., Мурашев А.Н., Богачук А.П. Разработка нового нейропротектора на основе пептида HLDF-6. // «Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии»: Материалы Международной конференции IT + M&Eс. 2016. С. 89-99.
19. Золотарев Ю.А., Ковалёв Г.И., Дадаян А.К., Козик В.С., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Липкин В.М. Исследование фармакокинетики и фармакодинамики амидной формы нейропротекторного пептида HLDF-6 с использованием равномерно меченных изотопами водорода соединений. // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / под ред. М.В. Угрюмова. – М. : в 2-х томах - М.: Научный мир. 2014. С 763-777.
20. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Кост Н.В., Воеводина М.Э., Соколов О.Ю., Козик В.С., Шрам С.И., Азев В.Н., Бочаров Э.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Мясоедов Н.Ф. Количественный анализ пептида HLDF-6-амида и его метаболитов в тканях лабораторных животных с использованием меченных тритием и дейтерием производных. // Биоорг. Хим. 2015. Т. 41, № 6. С. 644-656
21. Ковалёв Г.И., Васильева Е.В., Салимов Р.М., Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Богачук А.П., Липкин В.М. Влияние субхронического введения пептида HLDF-6 на эффективность исследовательского поведения мышей линий C57Bl/6 и Balb/c. // Биоорг. хим., 2021. Т. 47, № 1, С. 144.
22. Zolotarev Yu.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasileva E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., Lipkin V.M. and Myasoedov N.F. Anxiolytic activity

- of the neuroprotective peptide HLDF-6 and its effects on brain neurotransmitter systems in BALB/c and C57BL/6 mice. // *J. Psychopharmacol.*, 2016. 30. № 9. P. 922.
23. Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Устименко С.Ю., Самуков В.В., Костянян И.А., Масычева В.И. Исследование противоопухолевой активности шестичленного фрагмента фактора дифференцировки клеточной линии HL-60 на экспериментальной модели гемабластома. // *Вопр. Онколог.* 2009. Т. 55. № 6. С. 757.
24. Батенева А.В., Бабенко О.А., Даниленко Е.Д., Порываев В.Д., Карпышев Н.Н., Гончарова Е.П., Костянян И.А., Масычева В.И. Исследование противоопухолевых свойств липосомальной формы фрагмента фактора дифференцировки HLDF в культуре клеток. // *Экспер. Клин. Фармакол.*, 2010. Т. 73. № 2. С. 18.
25. Даниленко Е.Д., Факина В.А., Масычева В.И., Самуков В.В., Костянян И.А. Модуляция пептидом HLDF6 функциональной активности макрофагов на фоне введения агонистов опиатных рецепторов. // *Мед. Иммунол.* 2005, Т. 7. № 1. С. 77.
26. Sokolov O.Yu., Prokhorova T.A., Tereshkina E.B., Zozulya S.A., Simonov A.N., Kost N.V., Dadayan A.K., Bogachouk A.P., Zolotarev Yu.A. Neurotropic peptide HLDF-6-amide reduces age-related decline in sexual activity in old male rats. // *Exper. Gerontol.* 2021. V. 149. 111329.
27. Ågmo A., Berenfeld R. Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: Role of opioids and dopamine. // *Behav Neurosci.* 1990. V. 104. №1. P. 177.
28. Qitao R., Hanyu L., Yuji I., Wenbo Q., Tomas P.A., Jackson R. L., Norman W., Van Remmen H., Richardson A. Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. // *J. Gerontol.* 2007. V. 62, №9. P. 932.
29. Бродский В.Я., Золотарев Ю.А., Мальченко Л.А., Андреева Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Козик В.С., Мясоєдов Н.Ф. Пептиды семакс и HLDF 6, введенные крысам разного возраста, регулируют ритм синтеза белка в гепатоцитах, исправляя нарушения при старении. // *Онтогенез* 2020, Т. 51. № 2. С.113-120.
30. Бродский В.Я., Золотарев Ю.А., Мальченко Л.А., Андреева Л.А., Лазарев Д.С., Буторина Н.Н., Козик В.С., Мясоєдов Н.Ф. Нейропротекторные пептиды регулируют кинетику синтеза белка в гепатоцитах разного возраста. // *Онтогенез* 2019, том 50, № 5 С. 340-347.
31. Beurrier C, Lopez S, Révy D, et al. Electrophysiological and behavioral evidence that modulation of metabotropic glutamate receptor 4 with a new agonist reverses experimental parkinsonism. // *FASEB J.* 2009. V. 23. P. 3619–3628.
32. Magrinelli F., Picelli A., Tocco P. et al. Pathophysiology of motor dysfunction in Parkinson's disease as the rationale for drug treatment and rehabilitation. // *Parkinsons Dis.*, 2016. V. 10. P. 1-18.
33. Franke C., Storch A. Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease. // *Int. Rev. Neurobiol.*, 2017. Vol. 134. P. 947 Монография: Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / под ред. М.В. Угрюмова. – М.: в 2-х томах - М., Научный мир, 2014. ISBN 978-591522-400-0
34. Kalia L.V., Lang A.E. Parkinson's disease // *Lancet.* 2015. V. 386, No 9996. P. 896-912.
35. Zolotarev Yu.A., Shram S.I., Dadayan A.K., Dolotov O.V., Markov D.D., Nagaev I.Yu., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Sokolov O.Yu., Kost N.V. HLDF-6 peptides exhibit neuroprotective effects in the experimental model of preclinical Parkinson's disease // *Neuropeptides.*, 2022. V. 96. 10228715.
36. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. // *Neuroscience.* 2011. V. 181. P. 175–188.
37. Ho A and Blum M. Induction of Interleukin-1 Associated with Compensatory Dopaminergic Sprouting in the Denervated Striatum of Young Mice: Model of Aging and Neurodegenerative Disease. // *J. Neuroscience* 1998. V. 18. P. 5614–5629.
38. Rocha N.P., de Miranda A.S., and Teixeira A.L. Insights into Neuroinflammation in Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies // *Biomed Res Int.* 2015. 628192.
39. Nagatsu T, Sawada M. Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. // *Curr Pharm Des.* 2005. V. 11. №. 8. P. 999-1016.
40. Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, Onofri M. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. // *Brain Behav. Immun.* 2009. №. 1. P. 55-63.

41. Williams-Gray C.H., Wijeyekoon R., Yarnall A.J., Lawson R.A., Breen D.P., Evans J.R., Cummins G.A., Duncan G.W., Khoo T.K., Burn D.J., Barker R.A. Serum immune markers and disease progression in an incident Parkinson's disease cohort (ICICLE-PD). // *Mov Disord.* 2016. V. 31. №.7. P. 995-1003
42. Koziorowski D, Tomasiuk R, Szlufik S, Friedman A. Inflammatory cytokines and NT-proCNP in Parkinson's disease patients. // *Cytokine.* 2012. V. 60 №. 3. P. 762-766.
43. Zhou T.T., Zu G., Wang X., Zhang X.G., Li S., Liang Z.H., Zhao J. Immunomodulatory and neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 in the MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) - induced mouse model of Parkinson's disease. // *Int. Immunopharmacol.* 2015. V. 29. №. 2. P. 334-343.
44. . Braak H., Del Tredici K., Rüb U., et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. // *Neurobiology of Aging.* 2003. 24. P. 197–211.
45. Золотарев Ю.А., Долотов О.В., Марков Д.Д., Шрам С.И., Дадаян А.К., Кост Н.В, Соколов О.Ю., Зозуля С.А., Баймеева Н.В., Шубина Е.Н. Нейропротекторный эффект пептида HLDF-6-Н при болезни Паркинсона. // «Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии»: Материалы Международной конференции IT + M&Ec. `2024. С. 32–41.

Сведения об авторах

Юрий Александрович Золотарев

доктор хим. наук, профессор. Ведущий научный сотрудник ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»

Москва, Россия

Эл. почта: zolyural@yandex.ru

Дадаян Александр Каренович

Кандидат химических наук. Старший научный сотрудник. ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»

Москва, Россия

Эл. почта: dak72@rambler.ru

Information about author

Yuri Alexandrovich Zolotarev

Doctor of Science (Chem.), Professor, Leading Researcher

NRC «Kurchatov Institute»,

Moscow, Russian Federation

E-mail: zolyural@yandex.ru

Dadayan Alexandr Karenovich

PhD, Cand. of Sci. (Chem.) Senior Researcher

NRC «Kurchatov Institute»,

Moscow, Russian Federation

E-mail: dak72@rambler.ru

УДК 616-092.9

ГРНТИ 76.03

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.34-40

О.П.Чжу, Д.Э. Аравияшвили, Н.С. Руденко, И.И.Маринич

Курчатовский комплекс медицинской приматологии

ВОЗМОЖНОСТИ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ СТАРЕНИЯ НА ПРИМАТАХ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ СОСТОЯНИЯ ОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА

В статье проводится оценка некоторых показателей состояния оксидативной системы организма как одной из составляющих комплексного описания модели старения нечеловекообразных приматов, являющихся генетически, морфологически и физиологически наиболее близкими к человеку животными.

Ключевые слова: оксидантная система организма, маркеры, модели старения, приматы

POSSIBILITIES OF STUDYING AGING PROCESSES IN PRIMATES BY INDICATORS OF THE STATE OF THE OXIDANT SYSTEM OF THE ORGANISM

The article assesses some indicators of the state of the oxidative system of the body as one of the components of a comprehensive description of the aging model of non-human primates, which are genetically, morphologically and physiologically the closest animals to humans.

Keywords: oxidant system of the body, markers, aging models, primates

Введение.

Старение — это сложный процесс, который имеет множество различных определений, каждое из которых отражает различные аспекты старения. Выделяют такие термины, как биологическое, успешное, преждевременное, активное старение и другие. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определяет его следующим образом: на биологическом уровне старение — это результат воздействия самых различных молекулярных и клеточных повреждений, которые накапливаются с течением времени.

Работы современных ученых продемонстрировали тесную взаимосвязь между окислительным стрессом, воспалением и старением, на основании которой была предложена окислительно-воспалительная теория старения или окислительно-воспалительного старения: старение — это потеря гомеостаза из-за хронического окислительного стресса, который особенно влияет на регуляторные системы, такие как нервная, эндокринная и иммунная системы. Последующая активация иммунной системы вызывает воспалительное состояние, которое создает порочный круг, в котором хронический окислительный стресс и воспаление подпитывают друг друга, и, следовательно, увеличивает возрастную заболеваемость и смертность [1].

Экспериментальное моделирование патологий человека на животных имеет большое значение для медицины, в частности для изучения патогенеза заболеваний со свободно-радикальной природой. Основной причиной таких заболеваний является нарушение баланса между антиоксидантной системой (АОС) и её антагонистом — оксидативной системой (ОС) организма. Патологические состояния возникают, когда концентрация радикалов во внутренней среде биосистемы и плотность потока активных частиц на наружную поверхность клеточных мембран заметно меняются в сторону увеличения [2].

Ученые уже давно разочарованы ограничениями стандартных лабораторных моделей, когда дело доходит до понимания старения человека и его влияния на человеческий мозг. Мыши живут всего несколько лет, и этого недостаточно, чтобы накопить большую часть повреждений, которые, как считается, вызывают некоторые нейродегенеративные заболевания у людей. Другие животные, такие как некоторые приматы, не относящиеся к человекообразным, могут быть более удачными моделями для других аспектов старения мозга.

Процесс старения людей во многом аналогичен старению других видов приматов. В связи с полной корреляцией механизмов старения у приматов и человека логичным явилось использование в качестве моделей нечеловекообразных приматов, которые являются генетически, морфологически и физиологически наиболее близкими к человеку животными, с учетом того, что использование человекообразных приматов исключается по этическим соображениям.

До настоящего момента нет комплексного описания и соответственно модели старения нечеловекообразных приматов, что не позволяет использовать данную модель старения для испытания лекарственных препаратов, предотвращающих возрастные патологии человека.

В Курчатовском комплексе медицинской приматологии имеются группы нечеловекообразных приматов достигшие преклонного возраста (20-30 летних — эквивалентно 70-100 лет человека), что дает принципиальную возможность исследовать старение и создавать модель старения. Анализ публикаций за последние 20 лет не позволил найти работы, описывающие старение животных, достигших преклонного возраста эквивалентному человеку старше 60

лет.

В качестве маркеров состояния оксидативной системы организма в работе были выбраны следующие.

Малоновый диальдегид (МДА) – продукт конечного окисления липидов. При изучении редокс-баланса у пациентов с возрастными и нейродегенеративными патологиями концентрация МДА в плазме в два раза выше, чем у лиц из группы контроля.

Супероксиддисмутаза (СОД) – ферментативный компонент антиоксидантной системы организма. При изучении редокс-баланса у пациентов с возрастными и нейродегенеративными патологиями активность СОД в эритроцитах в десять раз меньше, чем у лиц из группы контроля.

Компоненты белковых фракций, в том числе, церулоплазмин (ферроксидаза, содержащая медь) – ферментативный компонент антиоксидантной системы организма. При изучении редокс-баланса у пациентов с возрастными и нейродегенеративными патологиями концентрация церулоплазмينا в плазме в два с половиной раза меньше, чем у лиц из группы контроля.

Каталаза – ферментативный компонент антиоксидантной системы организма. При изучении редокс-баланса у пациентов с возрастными и нейродегенеративными патологиями активность каталазы в эритроцитах в два раза меньше, чем у лиц из группы контроля.

Частота хромосомных aberrаций и разрывов ДНК, которые увеличиваются с возрастом, что в свою очередь свидетельствует о возрастном ухудшении процессов репарации ДНК, в том числе и под действием свободно-радикальной процессов.

Цель работы.

Провести оценку некоторых показателей состояния оксидативной системы организма как одной из составляющих комплексного описания модели старения нечеловекообразных приматов.

Материалы и методы.

В соответствии планом работы субъектами исследования были макаки яванские в возрасте 4-8 лет (6 самок, 7 самцов) и в возрасте 20-30+ лет (6 самок, 5 самцов), а также павианы гамадрилы (два самцы) в возрасте от 27 до 33 лет, макаки резусы (три самцы) в возрасте от 21 до 25 лет, рожденные в вольерах питомника Курчатковского комплекса медицинской приматологии НИЦ «Курчатowski институт» (ККМП). Объектами исследования были образцы биологического материала (цельная кровь, сыворотка, плазма, гемолизат, костный мозг).

В качестве показателей оксидативного стресса были выбраны продукт конечного окисления липидов малоновый диальдегид (МДА), ферментативные компоненты антиоксидантной системы организма супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза, состав белковых фракций и частота хромосомных aberrаций.

Измерение малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа типа «1100 Series» фирмы Agilent с диодно-матричным детектором. Для обнаружения МДА проводили дериватизацию с использованием тиобарбитуровой кислоты. Продуктом реакции является триметиновый комплекс, имеющий характерную розовую окраску с $\lambda_{\max} = 532 \text{ nm}$ [3].

Определение активности СОД проводили в эритроцитарном гемолизате по методике ингибирования реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии СОД, вследствие дисмутации супероксидных анион-радикалов, которые являются продуктом одного из этапов окисления и одновременным участником его последующих стадий [4]. Об интенсивности аутоокисления адреналина судят по динамическому нарастанию поглощения при длине волны 347 нм, обусловленному накоплением продукта окисления, и опережающим по времени образованием адrenoхрома (с максимумом поглощения при 480 нм).

Определение активности каталазы проводили методом, основанным на образовании окрашенного в желтый цвет комплекса неразрушенной в ходе каталазной реакции перекиси водорода с молибдатом аммония. Измеряли экстинкцию опытной и контрольной проб на спектрофотометре при длине волны 400 нм против дистиллированной H₂O в кювете с

толщиной слоя 1,0 см [5].

Компоненты белковых фракций определяли методами биофизической акустики путем измерения резонансных частот и дальнейшей математической обработки информации. Метод определения белковых фракций базируется на измерении скорости ультразвука в сыворотке и в модифицированной сыворотке крови (не содержит β - и γ -глобулины).

Для культивирования клеток использовали стандартный полумикрометод культивирования лимфоцитов периферической крови человека с некоторыми модификациями. Количественную оценку числа хромосом проводили методом определения митотической активности, модального числа хромосом клеток и определением полиплоидных клеток в исследуемом материале. Митотическую активность клеток в культурах периферической крови обезьян определяли на рутинно окрашенных препаратах, при подсчете 1000 клеток. Для определения модального числа хромосом анализировали 100 рутинно окрашенных метафазных пластинок. Долю полиплоидных клеток определяли в выборке 1000 рутинно окрашенных метафазных пластинок на 3-4 препаратах.

Полученные результаты.

Повышенное содержание МДА в биологических жидкостях может указывать на повреждение клеток и тканей, а также на наличие или риск развития различных заболеваний, связанных с оксидативным стрессом, таких как сердечно-сосудистые заболевания, диабет и другие. Метод ВЭЖХ позволил достаточно точно и с хорошей воспроизводимостью определить концентрации МДА и жирорастворимых витаминов в крови приматов, что невозможно было сделать методами иммуноферментного анализа.

При анализе полученных значений для макак яванских различного пола и возраста видно, что у возрастных животных (МДА самки = 1,060 мкмоль/л, МДА самцы = 0,787 мкмоль/л), данный показатель выше, чем у молодых (МДА самки = 0,789 мкмоль/л, МДА самцы = 0,583 мкмоль/л) независимо от пола. При этом анализе значений по медиане выборки можно отметить, что у самок данный показатель выше, чем у самцов в аналогичной возрастной категории.

Избыток СОД приводит к накоплению перекиси водорода в мозговой ткани, что наблюдается при старении, таким образом можно объяснить раннее старение больных с синдромом Дауна. Активность фермента нарастает преимущественно в начальный период патологических процессов. Впоследствии в стадии декомпенсации активность СОД начинает снижаться. Также снижение активности фермента отмечается при острой печеночной недостаточности, у лиц с патологией иммунной системы, в частности при иммунодефицитах и аутоиммунных заболеваниях.

У млекопитающих дефицит каталазы связан с пониженной способностью детоксифицировать АФК в различных клетках и тканях, приводящей к или связанной с целым рядом пагубных для здоровья состояний, включая преждевременное старение, диабет, сердечно-сосудистые заболевания, болезнь почек, образование опухолей, бесплодие и поседение волос.

Анализ полученных данных активности ферментов супероксиддисмутазы и каталазы показал следующее: активность СОД у мужских особей выше, чем у женских, при этом у молодых самцов показатель выше, чем у пожилых (активность СОД самки возрастные = 2483,755 Умин/гНб, активность СОД самцы возрастные = 2719,379 Умин/гНб, активность СОД самки молодые = 1976,930 Умин/гНб, активность СОД самцы молодые = 2895,126 Умин/гНб). Активность каталазы у молодых самцов тоже выше, чем у зрелых. У самок данный показатель практически не зависит от возраста (рис. 1).

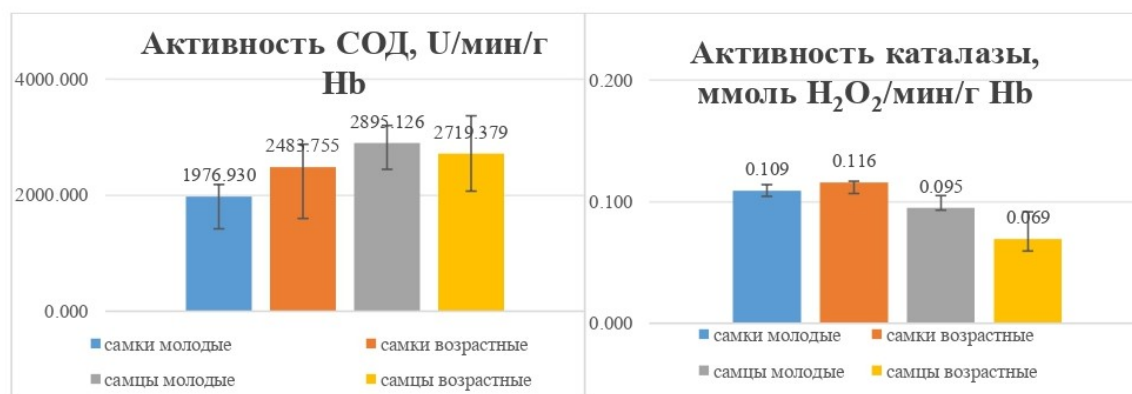


Рис.1. Активности ферментов супероксиддисмутазы и каталазы у макак яванских различного пола и возраста

Альбумины – это наиболее распространенные белки в крови и составляют около 60% всех белков в плазме. Они имеют высокий уровень растворимости в воде и служат для переноса многих веществ в организме, таких как гормоны, лекарства и другие биологически активные вещества.

Глобулины – это группа белков, которые имеют меньшую растворимость в воде, чем альбумины. Они подразделяются на альфа-1, альфа-2, бета-1, бета-2 и гамма-глобулины. Каждая из этих групп глобулинов содержит белки с различной функцией и химической структурой.

Содержание общего белка в группе возрастных животных выше, чем в группе молодых (самцы – 71,15 г/л и 63,08 г/л, соответственно; самки – 75,07 г/л и 66,94 г/л, соответственно). Процентное содержание альбумина в составе белковых фракций уменьшается с возрастом (самцы – 46,82 % и 52,83 %, соответственно; самки – 49,65 % и 51,43 %, соответственно).

Фракция α -1-глобулинов представлена α -1-антитрипсином, α -1-липопротеидом и кислым α -1-гликопротеидом. Увеличение содержания данных белков наблюдается при острофазном ответе на воспалительный процесс, патологии печени и всех процессах тканевого распада или клеточной пролиферации. Содержание α -1-глобулинов в группе возрастных животных выше, чем в группе молодых (самцы – 5,67 % и 4,96 %, соответственно; самки – 5,67 % и 5,07 %, соответственно).

Фракция γ -глобулинов – представлена иммуноглобулинами IgA, IgM, IgG. Повышенное содержание γ -глобулинов наблюдается при всех реакциях иммунной системы, с увеличением выработки антител и аутоантител. Снижение концентрации γ -глобулинов может быть связано с первичной или вторичной гипогаммаглобулинемией, т.е. состояниями, приводящими к истощению иммунной системы. Содержание γ -глобулинов в группе возрастных животных выше, чем в группе молодых (самцы – 23,81 % и 19,54 %, соответственно; самки – 23,22 % и 20,29 %, соответственно).

В области глобулярных фракций может быть обнаружено появление отдельной полосы (М-градиент, моноклональный белок), состоящей из белков, производимых злокачественными клонами В-лимфоцитов, характерными для миеломной болезни. Кроме того, М-белок может быть выявлен при хронических гепатитах, циррозе печени, а также у людей престарелого возраста без клинической патологии.

Все проанализированные кариотипы клеток показали значительную стабильность по числу хромосом, а именно модальное число хромосом преимущественно было диплоидным: $2n=42$ (рис. 2).

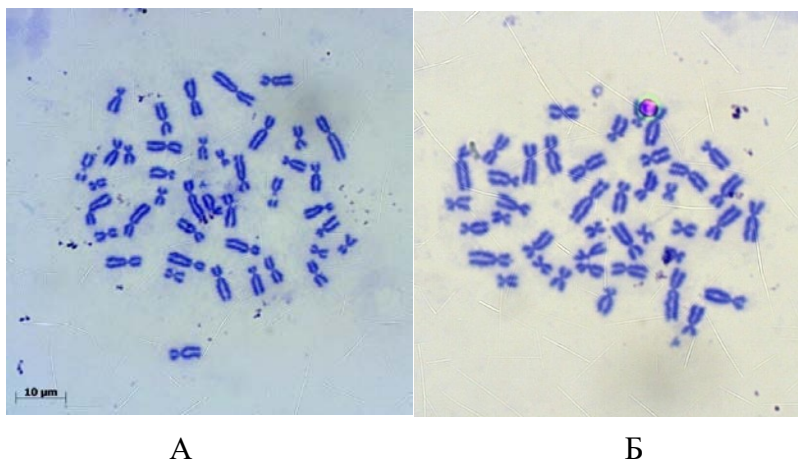


Рис.2. Кариотипы павиана гамадрила (А) и макаки резуса (Б)

Небольшой интервал изменчивости хромосом (1-4 хромосомы), наблюдаемый в культурах клеток, был обусловлен случайными потерями хромосом в процессе кариотипирования и варьировал в зависимости от возраста, не превышая модального числа хромосом.

Процент клеток с полиплоидизацией варьировал среди обезьян согласно возрасту, в то же время митотический индекс не был высоким, что соответствует установленным данным о снижении роста клеток в процессе старения.

Количественная оценка хромосом в культуре клеток лимфоцитов возрастных приматов (павианы гамадрилы, макак резус) показала увеличение с возрастом интервала изменчивости числа хромосом (от 1 до 4 при подсчете 100 клеток), уменьшение митотической активности (от 8 до 4 при подсчете 100 клеток).

Выводы.

Оценка некоторых показателей состояния оксидативной системы организма по продуктам перекисного повреждения клетки и активности ферментов антиоксидантной системы организма показала, что с возрастом увеличивается содержание окисленных форм, в частности МДА. Активность СОД выше у мужских особей любого возраста. Активность каталазы изменяется с возрастом только у самцов в сторону уменьшения, так же, как и активность СОД.

Сравнительный анализ маркеров окислительного стресса и состава белковых фракций показал повышенную реакцию иммунной системы и наличие воспалительных процессов у возрастных животных.

Кроме того, результаты проведенного исследования показали, что структурные aberrации хромосом относятся к тому типу генетических нарушений, которые несомненно, вносят свой вклад в многофакторный процесс старения у приматов

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

1. проведена оценка некоторых показателей состояния оксидативной системы организма как одной из составляющих комплексного описания модели старения нечеловекообразных приматов;
2. выявлены зависимости изменения показателей состояния оксидативной системы организма в зависимости от возраста и пола.

Литература.

1. Гомазков О. А. Клеточные и молекулярные принципы старения мозга / О. А. Гомазков // Успехи современной биологии. 2012. В. 132, №2. С. 141–154.
2. Листов М. В. Концентрация свободных радикалов в организме млекопитающих в условиях изменения активности супероксид-генерирующей и антиоксидантной систем / М. В. Листов, А. И. Мамыкин // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2014. № 1 (45). С. 121–126.

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

3. Шантырь И. И. и др. Оценка оксидативного стресса у сотрудников ГПС МЧС России и основные направления его коррекции: методические рекомендации: Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины // СПб.: ВЦЭРМ. 2019. 55 с.
4. RU 2144674 C1, 2000 / Сирота Т.В. Опубл. 20.01.2000, Бюлл. № 2.
5. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы/ М.А. Королюк, Л.Н. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.

Сведения об авторах

Чжу Ольга Петровна

К.х.н., заведующий лабораторного отделения Приматологического исследовательского центра
Курчатовский комплекс медицинской приматологии
Сочи, Россия
Эл. почта: olga.chzhu@mail.ru

Аравиашвили Дарежджан Эстатовна

К.б.н., ведущий научный сотрудник
Курчатовский комплекс медицинской приматологии
Сочи, Россия
Эл. почта: dar.arav@yandex.ru

Руденко Наталья Сергеевна

К.б.н., врач-биохимик лабораторного отделения Приматологического исследовательского центра
Курчатовский комплекс медицинской приматологии
Сочи, Россия
Эл. почта: lab-rns@mail.ru

Маринич Игорь Игоревич

Аспирант
Курчатовский комплекс медицинской приматологии
Сочи, Россия
Эл. почта: igormarinich1@yandex.ru

Information about author

Chzhu Olga Petrovna

Candidate of Chemical Sciences, Head of the Laboratory
Department of the Primatological Research Center
Kurchatov complex of medical primatology
Sochi, Russia
E-mail: olga.chzhu@mail.ru

Araviashvili Daredjan Estatovna

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher
Kurchatov complex of medical primatology
Sochi, Russia
E-mail: dar.arav@yandex.ru

Rudenko Natalia Sergeevna

Candidate of Biological Sciences, biochemist of the laboratory department of the Primatological Research Center
Kurchatov complex of medical primatology
Sochi, Russia
E-mail: lab-rns@mail.ru

Marinich Igor Igorevich

Postgraduate student
Kurchatov complex of medical primatology
Sochi, Russia
E-mail: igormarinich1@yandex.ru

УДК 616-092.9
ГРНТИ 76.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.40-45

Н.С. Руденко, О.П. Чжу, Д.А. Душин
Приматологический исследовательский центр
Курчатовский комплекс медицинской приматологии

РЕФЕРЕНСНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У НИЗШИХ ОБЕЗЬЯН

Статья посвящена определению референсных интервалов основных гематологических показателей для повышения точности медико-биологических исследований на макаках и павианах.

Ключевые слова: приматы, референсные интервалы, гематология.

REFERENCE INTERVALS OF HEMATOLOGICAL INDICATORS IN LOWER MONKEYS

The article is devoted to determining the reference intervals of the main hematological parameters to improve the accuracy of biomedical research on macaques and baboons.

Keywords: *primates, reference ranges, hematology*

Введение

Низшие узконосые приматы или нечеловекообразные обезьяны широко используются в качестве моделей для исследований в биологии и медицине [1, 2]. Сходства в физиологии и анатомии приматов наиболее приближены к человеку. Также, как у человека у этих животных наблюдается высокая чувствительность к различным заболеваниям. Среди популярных видов приматов, используемых в исследованиях, выделяются Макаки-резусы (*Macaca mulatta*), Макаки Яванские (*Macaca fascicularis*) и Павианы Анубисы (*Papio anubis*).

Мониторинг состояния здоровья этих животных играет важную роль в оценке качества проводимых экспериментов. Одними из основных показателей являются гематологические характеристики, однако на их интерпретацию влияют различные факторы - возраст, пол, общее состояние, рацион питания, стрессовые ситуации, медицинские манипуляции и многое другое. Чтобы обеспечить адекватность медицинских процедур и достоверность научных выводов, необходимо знать точные референсные интервалы гематологических параметров.

Согласно рекомендациям международных организаций (например, CLSI, документ C28-A3, 2008) [3] и российских стандартов (ГОСТ Р 53022–2008) [4], лаборатории обязаны устанавливать собственные референсные диапазоны лабораторно измеренных величин. Обычно такие интервалы определяются путем статистического анализа образцов здоровых особей.

Большинство стандартных методов предполагает нормальность распределения данных, что зачастую неверно применимо к данным большинства гематологических измерений [5]. В связи с этим рекомендуется использование непараметрических подходов для определения референсных интервалов.

Материалы и методы

Исследование проводилось на трех видах низших приматов: Макака-резус, Макака Яванская и Павиан Анубис. В анализе учитывались пол и вид животных, общее количество, которых составило 329 особей, из них: самцы Макака-резус (*Macaca mulatta*) – 99, самки – 46, самцы Макака Яванская (*Macaca fascicularis*) – 57, самки – 65, самцы Павиана Анубиса (*Papio anubis*) – 45, самки – 17. Все животные содержались в условиях специализированного питомника Курчатовского Комплекса Медицинской приматологии Научно-исследовательского центра (ККМП НИЦ Курчатовский институт).

Образцы венозной крови собирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтом К2-ЭДТА и исследовали на гематологическом анализаторе HumaCount 30TS производства Human (Германия). Этот прибор позволяет анализировать до 22 параметров гемограммы, используя методику автоматического счета клеток по принципу Култера (кондуктометрия) и фотометрию для измерения концентрации гемоглобина.

На анализаторе определялись следующие основные показатели: общее количество лейкоцитов (WBC, $10^9/\text{л}$) с определением количества клеток лейкоцитарной формулы, количество эритроцитов (RBC, $10^{12}/\text{л}$), концентрация гемоглобина (HGB, г/л), гематокрит (HCT, %), тромбокрит (PCT, %), средний объем эритроцитов (MCV, фл), среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCT, пг), средняя концентрация гемоглобина в клетках (MCHC, г/л), количество тромбоцитов (PLT, $10^9/\text{л}$), средний объем тромбоцитов (MPV, фл).

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проведен с использованием программного пакета Statistica®

Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

(StatSoftInc.). Поскольку большинство исследуемых показателей не демонстрировали нормального распределения при расчете референсных интервалов использовались непараметрические методы, рекомендованные международными и российскими нормативными актами. Для каждой величины определены средние значения (X_{cp}), стандартные отклонения (SD), медианы (P50) и ключевые процентиля распределения (2,5%, 5%, 25%, 75%, 95%, 97,5%). Эти расчетные данные отражают границы нормального диапазона значений для каждого показателя. В результате обработки данных получены таблицы референсных интервалов для всех изучаемых параметров.

Результаты

Ниже представлены выявленные референсные интервалы основных гематологических показателей трех исследуемых видов приматов.

Статистические данные обнаружили выраженную межвидовую вариацию большинства параметров. Так, Макаки-резусы характеризуются наибольшей концентрацией гемоглобина (HGB, г/л) среди остальных исследуемых видов (Таб. 1). Павианы Ануписы демонстрируют самые высокие показатели среднего объема эритроцитов (MCV, фл) (Таб. 2). Макаки Яванские имеют наибольшее разнообразие значений для общего количества тромбоцитов (PLT, 10^9 /л) (Таб. 3).

Отличия между полами показывают, что у самцов Макаки-резус более низкие значения среднего объема эритроцитов (MCV, фл), гематокрита (HCT, %) и тромбоцитов (PLT, 10^9 /л) по сравнению с самками. Показатели среднего объема эритроцитов (MPV, фл) и тромбоцит (PCT, %) у самцов Павианов Ануписов отличаются меньшими величинами по сравнению с самками. У Яванских макак различия по полу в изучаемых показателях менее выражены, хотя наблюдается тенденция к повышению количества тромбоцитов (PLT, 10^9 /л) у самок.

Эти различия подчеркивают необходимость учета индивидуальных особенностей при формировании нормальных диапазонов для конкретных исследовательских целей.

Таблица 1. Основные гематологические показатели исследуемых Макак-резусов (*Macaca mulatta*)

Параметр	Пол	X_{cp}	95%ДИ	SD	P2,5	P5	P25	P50	P75	P95	P97,5
WBC, 10^9 /л	♂	11,47	1,03	5,24	5,46	5,81	7,75	10,01	13,62	21,44	24,43
	♀	12,81	2,22	7,67	5,02	5,27	7,15	10,98	15,14	26,15	35,20
LYM, 10^9 /л	♂	3,76	0,61	3,09	1,19	1,31	2,06	2,73	4,11	10,19	12,95
	♀	2,64	0,50	1,72	0,34	0,58	1,54	2,25	2,87	6,29	6,92
MID, 10^9 /л	♂	1,88	0,27	1,36	0,68	0,84	1,23	1,53	2,07	3,70	4,87
	♀	2,27	0,77	2,67	0,59	0,66	1,12	1,56	2,19	4,74	6,06
GRA, 10^9 /л	♂	5,83	0,68	3,45	1,45	2,03	3,46	4,83	7,61	12,67	14,31
	♀	7,90	1,79	6,20	1,55	2,07	4,28	6,52	8,90	17,45	25,51
HGB, г/л	♂	136,44	3,55	18,01	95,45	105,60	126,00	137,00	146,00	166,00	167,55
	♀	113,67	5,69	19,68	78,38	82,25	103,00	114,50	124,75	145,00	148,50
MCT, пг	♂	22,96	0,56	2,84	19,88	20,21	22,10	23,13	24,39	26,01	27,34
	♀	22,11	1,03	3,57	9,71	19,29	21,47	22,70	23,29	24,49	26,03
MCHC, г/л	♂	342,73	7,38	37,46	323,63	326,17	336,21	345,46	353,88	373,40	383,54
	♀	342,67	16,12	55,77	146,39	324,90	336,98	346,00	355,20	390,59	403,41
RBC, 10^{12} /л	♂	6,08	0,29	1,48	4,62	4,78	5,51	5,93	6,32	7,23	7,39
	♀	5,37	0,53	1,85	3,71	3,91	4,71	5,06	5,56	7,05	12,18
MCV, фл	♂	66,99	0,76	3,87	59,32	59,98	64,48	67,57	69,29	73,18	73,63
	♀	64,67	0,92	3,17	57,38	58,08	63,15	64,59	66,75	69,46	69,51
HCT, %	♂	40,70	2,00	10,15	28,32	31,58	37,21	40,07	42,20	47,89	50,86
	♀	34,89	3,79	13,13	22,69	24,29	28,83	33,12	35,83	46,98	84,23
PLT 10^9 /л	♂	357,56	26,03	132,16	126,70	188,60	270,50	343,00	419,50	618,80	646,55
	♀	436,39	39,39	136,31	251,75	287,75	351,75	410,00	488,25	666,00	761,38
PCT, %	♂	0,30	0,02	0,10	0,12	0,17	0,25	0,29	0,36	0,48	0,52
	♀	0,37	0,03	0,09	0,23	0,25	0,31	0,34	0,41	0,55	0,59
MPV, фл	♂	8,73	0,24	1,22	6,58	6,95	7,90	8,60	9,47	10,58	11,09
	♀	8,61	0,51	1,78	6,80	6,89	7,76	8,23	9,30	10,07	10,08

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

Таблица 2. Основные гематологические показатели исследуемых Павианов Анубисов (*Papio Anubis*)

Параметр	Пол	X _{ср}	95%ДИ	SD	P2,5	P5	P25	P50	P75	P95	P97,5
WBC, 10 ⁹ /л	♂	8,68	0,85	2,92	4,42	4,66	6,70	8,29	9,94	14,47	15,76
	♀	9,04	1,46	3,06	5,31	5,36	6,69	8,01	11,91	14,04	14,07
LYM, 10 ⁹ /л	♂	2,11	0,25	1,18	0,79	0,94	1,38	1,68	2,40	3,93	5,05
	♀	2,75	0,78	1,65	0,97	1,02	1,57	2,29	3,32	5,86	6,23
MID, 10 ⁹ /л	♂	1,45	0,19	1,20	0,64	0,69	0,90	1,13	1,53	2,81	3,98
	♀	2,22	0,95	2,00	0,54	0,56	0,95	1,25	3,41	5,70	6,67
GRA, 10 ⁹ /л	♂	5,12	0,55	2,38	1,16	1,25	3,89	5,20	6,44	9,42	9,95
	♀	4,07	1,20	2,53	0,76	0,77	1,90	3,83	5,65	8,17	8,42
HGB, г/л	♂	114,84	2,86	18,04	102,10	103,20	109,00	115,00	122,00	137,40	138,00
	♀	116,65	3,58	7,52	103,00	105,00	113,00	117,00	121,00	128,40	129,20
MCT, пг	♂	25,04	0,26	1,18	23,70	23,75	24,19	24,89	25,56	27,56	28,46
	♀	25,30	0,42	0,88	24,15	24,16	24,68	25,11	25,70	26,88	26,98
MCHC, г/л	♂	336,64	2,42	10,99	316,00	318,85	330,35	335,81	343,25	352,57	365,14
	♀	345,75	7,69	16,18	329,93	329,95	336,59	341,15	352,30	373,23	384,91
RBC, 10 ¹² /л	♂	4,59	0,13	0,76	3,90	4,00	4,32	4,59	4,91	5,61	5,64
	♀	4,61	0,11	0,22	4,24	4,30	4,47	4,62	4,70	4,96	5,01
MCV, фл	♂	74,40	0,71	2,89	69,21	69,67	72,28	73,93	76,57	78,62	80,09
	♀	73,24	0,87	1,83	69,26	70,27	72,92	73,26	74,59	75,40	75,65
HCT, %	♂	34,14	0,91	5,49	29,96	30,46	32,37	34,22	36,12	40,39	40,68
	♀	33,76	0,96	2,02	30,13	30,38	32,13	33,93	35,14	36,33	36,62
PLT, 10 ⁹ /л	♂	269,13	16,67	78,80	54,00	132,60	235,00	285,00	304,00	388,60	405,60
	♀	313,29	40,63	85,46	178,00	178,00	263,00	318,00	343,00	465,20	467,60
PCT, %	♂	0,24	0,01	0,06	0,05	0,13	0,21	0,24	0,28	0,33	0,34
	♀	0,26	0,03	0,06	0,16	0,17	0,24	0,27	0,30	0,36	0,37
MPV, фл	♂	8,95	0,39	1,62	6,56	6,96	7,84	8,52	10,19	11,95	12,32
	♀	8,55	0,48	1,01	6,83	6,87	7,88	8,49	9,13	10,02	10,07

Таблица 3. Основные гематологические показатели исследуемых Макак Яванских (*Macaca fascicularis*)

Параметр	Пол	X _{ср}	95%ДИ	SD	P2,5	P5	P25	P50	P75	P95	P97,5
WBC, 10 ⁹ /л	♂	15,95	1,87	7,21	5,29	7,39	10,67	15,13	18,12	26,77	32,13
	♀	15,14	1,53	6,28	6,73	7,01	10,55	13,13	19,33	26,68	28,15
LYM, 10 ⁹ /л	♂	5,62	0,90	3,45	1,26	1,61	3,67	4,89	6,26	13,48	14,02
	♀	3,41	0,52	2,12	0,93	1,29	2,05	2,65	4,52	6,70	8,40
MID, 10 ⁹ /л	♂	2,06	0,23	0,89	0,54	0,81	1,37	2,10	2,56	3,41	4,17
	♀	1,93	0,18	0,73	0,83	1,05	1,36	1,77	2,48	3,31	3,41
GRA, 10 ⁹ /л	♂	8,27	1,13	4,34	2,13	2,73	5,38	7,64	10,28	15,90	17,05
	♀	9,81	1,20	4,93	3,84	4,09	6,28	8,53	12,85	20,10	21,63
HGB, г/л	♂	121,47	4,52	17,39	105,00	107,40	116,00	120,00	127,00	149,20	152,40
	♀	117,49	7,34	30,20	86,00	88,20	102,00	116,00	124,00	141,80	145,20
MCH, пг	♂	18,88	0,52	1,99	16,46	16,70	18,11	18,75	19,71	21,93	22,26
	♀	19,58	1,62	6,66	13,16	17,00	17,71	18,78	19,83	23,05	26,75
MCHC, г/л	♂	338,17	7,08	27,28	324,12	325,75	335,86	342,16	346,74	351,58	354,83
	♀	344,64	28,16	115,83	240,31	315,10	331,16	338,32	345,22	353,79	370,17
RBC, 10 ¹² /л	♂	6,53	0,36	1,39	5,06	5,20	5,93	6,41	6,95	7,82	9,16
	♀	6,31	0,50	2,05	4,04	4,23	5,33	6,14	6,73	7,98	10,47
MCV, фл	♂	55,99	1,28	4,95	48,50	48,73	53,94	54,85	56,63	65,30	67,65
	♀	56,95	1,44	5,94	50,34	50,73	52,96	55,75	57,97	68,74	69,73
HCT, %	♂	36,50	2,35	9,07	29,96	31,10	33,48	35,43	37,29	44,96	49,81
	♀	35,77	3,12	12,83	24,99	25,19	31,33	35,01	37,15	42,26	55,35
PLT, 10 ⁹ /л	♂	328,79	28,88	111,26	155,20	163,20	275,00	328,00	402,00	508,60	543,00
	♀	387,65	38,30	157,57	165,00	187,20	283,00	366,00	449,00	692,20	765,40
PCT, %	♂	0,29	0,03	0,10	0,13	0,15	0,23	0,29	0,35	0,45	0,48
	♀	0,32	0,03	0,11	0,16	0,18	0,24	0,32	0,38	0,51	0,54
MPV, фл	♂	8,97	0,24	0,91	7,25	7,47	8,40	9,15	9,50	10,33	10,40
	♀	8,57	0,25	1,03	6,69	6,95	7,83	8,70	9,16	10,08	10,83

Выводы

1. С помощью непараметрических методов статистики были установлены диапазоны для основных гематологических показателей в образцах крови трех наиболее часто используемых в лабораторных исследованиях низших приматов.
2. При интерпретации результатов особенно важно учитывать возраст, пол, и условия содержания приматов
3. Наблюдаются значительные различия в параметрах между разными видами приматов, особенно в уровне лейкоцитов (WBC, $10^9/\text{л}$), среднем объеме эритроцитов (MCV, фл) и концентрации гемоглобина (HGB, г/л).
4. Выявлены некоторые различия между самцами и самками в пределах одного вида, особенно в содержании гемоглобина и средних объемах эритроцитов.
5. Определённые референсные интервалы обеспечивают инструмент для раннего выявления возможных патологий и предотвращения ошибок при анализе данных.

Заключение

Проведенное исследование позволило установить референсные интервалы основных гематологических показателей у трех видов низших приматов. Это может существенно улучшить качество медицинских услуг животным-моделям и повысить надежность выводов в рамках дальнейших исследований. Настоящие результаты демонстрируют важность тщательного контроля факторов, влияющих на лабораторные показатели, и предлагают эффективные подходы к их учету и анализу.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие результаты:

1. Были установлены диапазоны для основных гематологических показателей в образцах крови низших обезьян, питомника Курчатовского Комплекса Медицинской приматологии Научно-исследовательского центра (ККМП НИЦ Курчатовский институт), используемых в лабораторных исследованиях.
2. Наблюдаются значительные различия в параметрах гематологических показателей между разными видами приматов.

Литература

1. Chen, H. Langermans, J. *Nonhuman Primate Models in Preclinical Research. Volume 2. Disease Models.* Nova Science Publishers: New York, NY, USA, 2021.
2. Friedman, H., Ator, N., Haigwood, N., Newsome, W., Allan, J.S., Golos, T.G., Kordower, J.H., Shade, R.E., Goldberg, M.E., Bailey, M.R., et al. *The critical role of nonhuman primates in medical research.* *Pathog. Immun.* 2017, 2, 352–365. [CrossRef] [PubMed]
3. CLSI. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory. Approved Guideline—Third Edition.* Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.
4. ГОСТ Р 53022–2008. *Клинические лабораторные исследования. Правила установления референсных интервалов.* М.: Стандартинформ, 2008.
5. М.С. Казакова, С.А. Луговская. *Референсные интервалы при применении современных гематологических анализаторов.* М.С. Казакова, С.А. Луговская. *Клиническая лабораторная диагностика*, № 9, 2014, стр.-11

Сведения об авторах

Руденко Наталья Сергеевна

К.б.н., врач-биохимик лабораторного отделения
Приматологического исследовательского центра
Курчатовский комплекс медицинской приматологии
Сочи, Россия,
Эл. почта: lab-rns@mail.ru

Чжу Ольга Петровна

К.х.н., заведующий лабораторного отделения Приматологического исследовательского центра
Курчатовский комплекс медицинской приматологии
Сочи, Россия
Эл. почта: olga.chzhu@mail.ru

Information about author

Rudenko Natalya Sergeevna

Candidate of Biology Sciences, Biochemist doctor
Laboratory Department of the Primatological Research Center
Kurchatov complex of medical primatology Sochi,
Sochi, Russia, E-mail: lab-rns@mail.ru

Chzhu Olga Petrovna

Candidate of Chemical Sciences, Head of the Laboratory Department of the Primatological Research Center
Kurchatov complex of medical primatology
Sochi, Russia, E-mail: olga.chzhu@mail.ru

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

Душин Давид Антонович
Лаборант лабораторного отделения
Приматологического исследовательского центра
Курчатовский комплекс медицинской приматологии
Сочи, Россия
Эл. почта: davdushin.edu@gmail.com

Dushin David Antonovich
Laboratory assistant
Laboratory Department of the Primatological Research Center
Kurchatov complex of medical primatology
Sochi, Russia
E-mail: davdushin.edu@gmail.com

УДК 617.616.15-092(075.8)
ГРНТИ 76.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.45-50

^{1,2}Бердыш Д.С., ^{1,2}Павленко С.Г., ^{1,3}Ильченко Г.В.,
³Евглевский А.А., ³Кудрявцева Е.В.

¹НОЧУ ВО «Кубанский медицинский институт»

Г. Краснодар

²ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет»

Г. Майкоп

³ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

Г. Краснодар

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ПЕКТИНОВОГО ГЕМОСТАЗА

В данной статье проанализированы морфологические результаты пектинового гемостаза почек и печени в эксперименте на лабораторных крысах линии «Westar». Представлены ключевые морфологические и цитологические данные исследования гемостатических и репаративных свойств порошков яблочного и цитрусового пектина.

Ключевые слова: пектины, гемостаз, репарация, морфология.

УДК 617.616.15-092(075.8)

^{1,2}Berdys D.S., ^{1,2}Pavlenko S.G.,

^{1,3}Ilchenko G.V.,

³Evglevsky A.A. ³Kudrjavitcheva E.V.

¹Kuban Medical Institute ,
Krasnodar

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
Maikop State Technological University ,
Maikop

³Kuban State Medical University ,
Krasnodar

MORPHOLOGICAL VERIFICATION OF PECTIN HEMOSTASIS

This article analyzes the morphological results of pectin hemostasis of the kidneys and liver in an experiment on laboratory rats of the Westar line. The key morphological and cytological data from the study of hemostatic and reparative properties of apple and citrus pectin powders are presented.

Key words: pectin, hemostasis, reparation, morphology

Введение

В настоящее время существует множество химических и биологических методов для достижения гемостаза. Основные группы гемостатиков включают: стимуляторы синтеза и

образования тромбоцитов (такие как этамзилат и соли кальция), коагулянты (прямые, например, фибриноген и тромбин, и непрямые, такие как Викасол и фитоменадион, а также ингибиторы фибринолиза (аминокапроновая кислота и аминометилбензойная кислота) [1].

Этамзилат воздействует на механизмы адгезии и агрегации тромбоцитов, активируя фактор III в области повреждения мелких сосудов, что способствует снижению кровотоочивости. Он широко используется в акушерстве, гинекологии, урологии, стоматологии и офтальмологии, а также при паренхиматозных и капиллярных кровотечениях, тромбоцитопатиях, кишечных и легочных кровотечениях. Этамзилат также применяется после трансуретральной резекции предстательной железы и для профилактики перивентрикулярного кровотечения у недоношенных новорожденных [1, 2].

Отдельной категорией гемостатических препаратов являются гемостатические губки, которые изготавливаются из биоразлагаемых полимеров с добавлением веществ для улучшения их функциональных свойств.

Губки на основе хитозана активируют адгезию тромбоцитов через электростатическое взаимодействие с эритроцитами, что ускоряет их прилипание. Хитозановая губка может стимулировать спонтанную агглютинацию крови, выработку тромбина и образование новой ткани для заживления. Этот тип губок обладает высокой биoadгезией, биосовместимостью, гемостатической активностью и бактериостатическими свойствами, а также способствует уменьшению размеров рубцов. Эффективность хитозановых губок была исследована на множестве животных моделей. Например, композитные губки на основе хитозана (такие как пористая губка из N-алкилированного хитозана/оксида графена) остановили кровотечение за 134 ± 17 секунд, в то время как контрольная группа (стандартные медицинские марли) справилась с этой задачей за $338,29 \pm 35,90$ секунд [3, 4].

Пектины представляют собой полисахариды, которые являются одними из сложных структурно функциональных полисахаридов в клеточных стенках высших растений и некоторых водорослей. Основу пектинов составляют производные полигалактуроновой кислоты [5, 6].

Пектиновые вещества включают в себя различные формы, такие как растворимый пектин, протопектин, соли пектиновой кислоты.

При растворении в воде молекулы пектина подвергаются сольватации, что приводит к образованию вязких растворов. Вязкость этих растворов зависит от нескольких факторов: молекулярной массы пектина, pH и температуры среды, а также природы экстрагента и времени экспозиции. Эти характеристики делают пектины интересными для применения их в различных областях медицины и фармацевтики, включая использование в качестве гемостатических агентов [7, 8].

Методы и материалы

В проведенных экспериментах на лабораторных крысах осуществлялись хирургические операции, включающие секторальные резекции печени и почек. После выполнения резекций раны закрывались пектиновым порошком, при этом органы не ушивались. Для сравнения эффективности гемостаза использовались гемостатическая губка и термическая коагуляция.

По завершении экспериментального периода извлекались органы, которые затем подвергались гистологической верификации. Этот подход позволял оценить эффективность применения пектинов в качестве гемостатического средства, а также сравнить его с традиционными методами гемостаза, такими как гемостатическая губка и термокоагуляция. Гистологическое исследование обеспечивало возможность детального анализа процессов заживления тканей и оценки возможных морфологических изменений, связанных с применением различных методов гемостаза. Все эксперименты проводились на лабораторных крысах с соблюдением всех норм, установленных 20-й статьей Модельного закона Межпарламентской Ассамблеи государств-участников Содружества Независимых Государств «Об обращении с животными».

Результаты

На седьмые сутки (рис. 1) после начала эксперимента в контрольной группе животных,

подвергшихся термическому воздействию для остановки кровотечения из раны почки, наблюдается накопление тканевого детрита с выраженной инфильтрацией мононуклеаров. На границе тканевых структур почек, частично сохранивших свою архитектуру, фиксируются деструктивные изменения в почечных канальцах и клубочках, находящихся в фазе альтерации. Сосуды полнокровны, а в некоторых зонах отмечается имбибция межклеточного вещества эритроцитами. Тканевая организация почки остается сохранной, при использовании пектина (рис. 2) явления альтерации клеток как в канальцах, так и в клубочках умеренны, наблюдается незначительное расширение полости капсулы Шумлянско-Боумена.

На четырнадцатые сутки в контрольной группе (рис. 3) в зоне термического воздействия постепенно восстанавливается тканевая организация почек, хотя деструктивные изменения в почечных канальцах сохранены. Явления отека межклеточного вещества остаются выраженными, также заметны изменения альтерации клубочкового аппарата. При использовании гемостатической губки в качестве средства для остановки кровотечения наблюдается значительное восстановление тканевой структуры коркового вещества почек, однако сохраняется отек межклеточного вещества и деструкция канальцевого аппарата клубочков. В случае применения пектина (рис. 4) тканевая организация паренхимы почки остается интактной, а явления альтерации клеток практически отсутствуют. Формируется хорошо заметная соединительнотканная структура, отделяющая зону регенерации.

На двадцать первые сутки эксперимента в контрольной группе животных (рис. 5) отмечается незначительное восстановление тканевой организации почек, хотя отеки межклеточного вещества все еще присутствуют. При использовании гемостатической губки также фиксируются умеренные признаки деструкции коркового вещества почек. В то же время при применении пектиновых препаратов для остановки кровотечения тканевая организация паренхимы интактна (рис. 6).

При сравнительном анализе в образцах ткани на третьи сутки печени с гемостатической губкой фиксируются шоковые состояния, вакуольная дистрофия и стаз. Зона контакта между губкой и паренхимой печени инфильтрирована макрофагами и нейтрофилами с выраженным воспалительным компонентом (рис. 7). При гистологической верификации образцов печени с использованием пектиновых порошков наблюдается выраженная фагоцитарная активность, ткань инфильтрирована макрофагами. Экссудативная реакция проявляется слабо и содержит низкое количество нейтрофилов; умеренно выражена инфильтрация тучными клетками (рис. 8).

На седьмые сутки в зоне репарации при гемостазе гемостатической губкой сохранен воспалительный компонент, ткань печени инфильтрирована макрофагами и нейтрофилами (рис. 9). При использовании пектиновых порошков отмечается выраженная фагоцитарная активность, экссудативная реакция отсутствует. Активно пролиферируют фибробласты во всем репаративном слое, наблюдается выраженное прорастание коллагеновых волокон, видна мезенхимальная ткань в зоне репарации (признаки восстановления капсулы). Пектин располагается островковыми фрагментами и погружен в цитоплазму макрофагов. В ткани печени сохраняется дольковое строение, но оно выражено слабо; ядерно-цитоплазматическая диссоциация отсутствует, наблюдается активный митоз (рис. 10).

На четырнадцатые сутки в тканях с пектиновыми порошками фагоцитарная активность выражена слабо; резко увеличивается пролиферация фибробластов и активное коллагеновое прорастание. Формируется плотный мезотелиальный слой с кровеносными сосудами. Пектин представлен одиночными зернами в цитоплазме макрофагов. В ткани печени четко прослеживается дольковое строение, признаки дисциркуляторных расстройств отсутствуют (рис. 11).

Выводы:

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: использование порошков пектинов в качестве гемостатического средства для остановки кровотечения из ран паренхиматозных органов является эффективным методом. Пектин обеспечивает высокую скорость образования прочного кровяного сгустка на поверхности

поврежденного органа, достигая стойкого гемостаза.

Кроме того, применение порошков цитрусового и яблочного пектинов способствует значительному увеличению скорости репарации тканей. При этом не наблюдается воспалительных реакций и аллергических реакций в тканях, а восстановление интактности органа происходит в течение трех дней. В ходе серии экспериментов на ранах паренхиматозных органов пектины продемонстрировали свою надежность и высокое качество как в гемостазе, так и в процессе репарации. Эти результаты подчеркивают потенциал пектинов как эффективных гемостатических агентов.

Приложение 1

**К статье Морфологическая верификация пектинового гемостаза
Бердыш Д.С., Павленко С.Г., Ильченко Г.В.,
Евглевский А.А.³Кудрявцева Е.В**

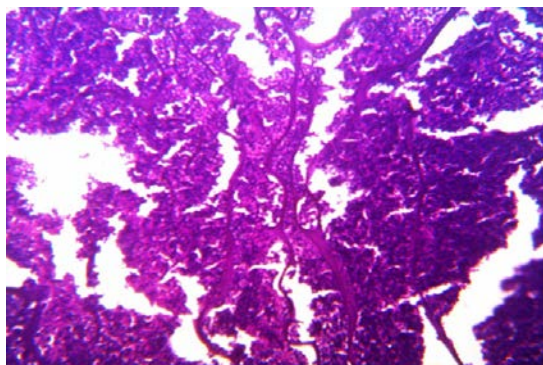


**Рис. 1. Почка. Термокоагуляция.
7-е сутки 200х.**

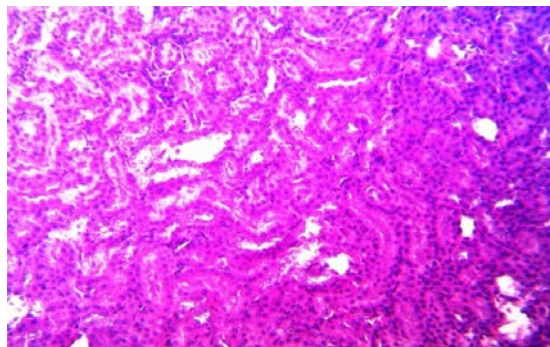


**Рис. 2. Почка. Пектиновый гемостаз.
7-е сутки. 200х.**

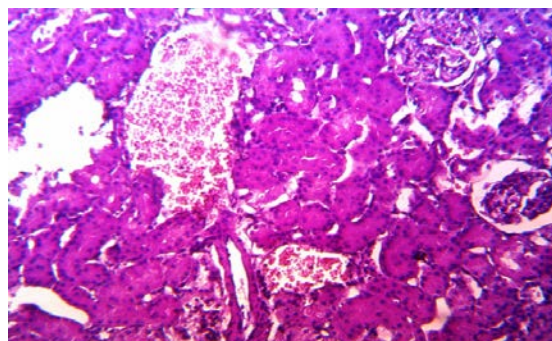


**Рис. 3. Почка. Термокоагуляция.
14-е сутки 200х.**

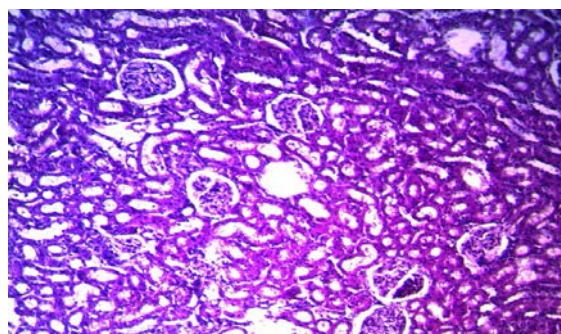


**Рис. 4. Почка. Пектиновый гемостаз.
14-е сутки. 200х.**

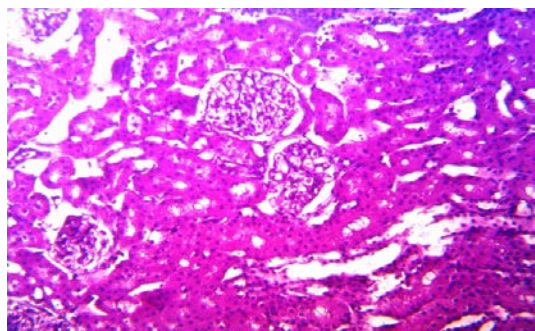


**Рис. 5. Почка. Термокоагуляция.
21-е сутки 200х.**

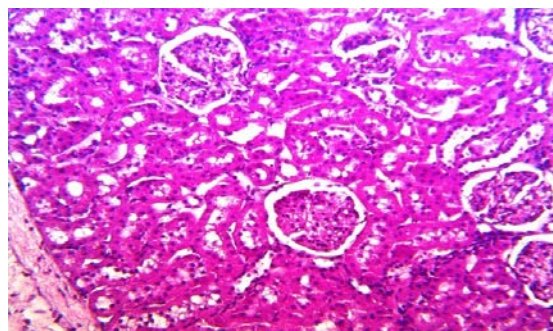


**Рис. 6. Почка. Пектиновый гемостаз.
21-е сутки. 200х.**

Приложение 2

**К статье Морфологическая верификация пектинового гемостаза
^{1,2}Бердыш Д.С., ¹Павленко С.Г., ¹Ильченко Г.В.,
Евглевский А.А., Кудрявцева Е.В.**

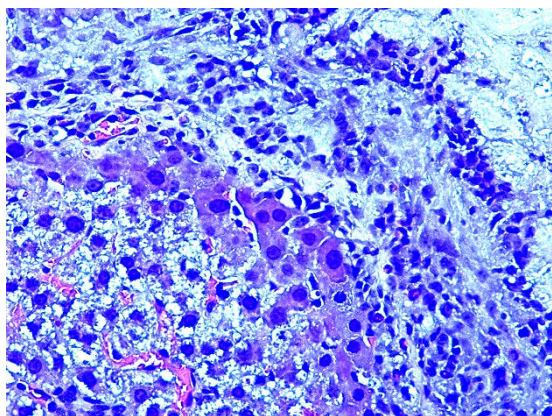


*Рис. 7. Печень. Гемостатическая губка.
3-и сутки. 200х.*

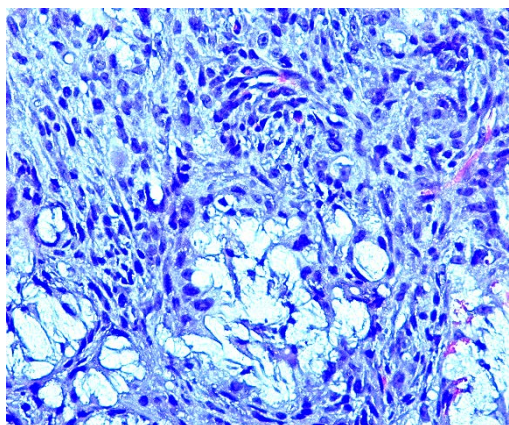


*Рис. 8. Печень. Пектиновый гемостаз.
3-и сутки 200х.*

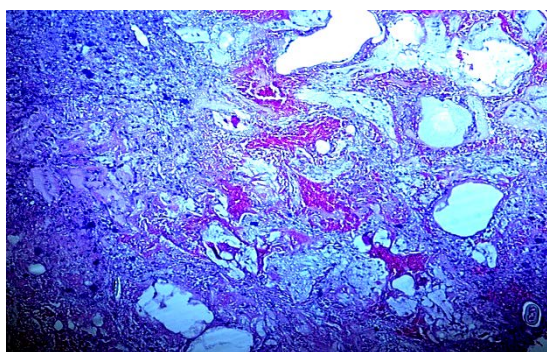


*Рис. 9. Печень. Гемостатическая губка.
7-е сутки. 200х.*

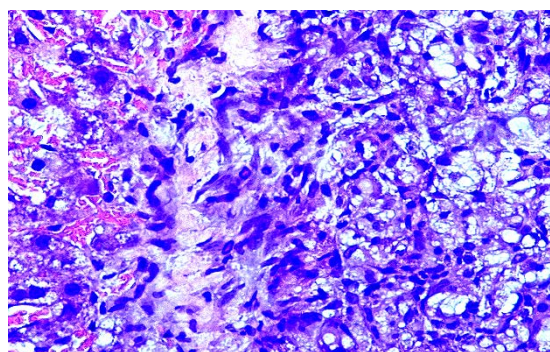


*Рис. 10. Печень. Пектиновый гемостаз.
7-е сутки. 200х.*

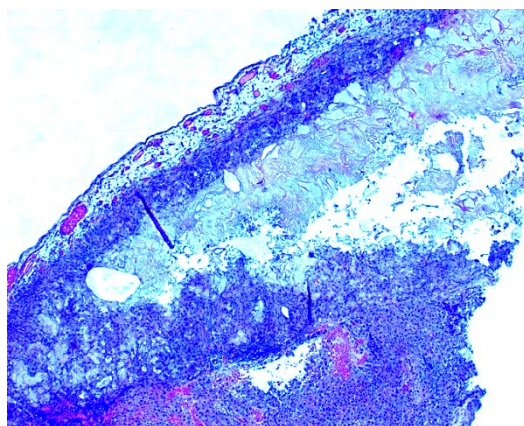


Рис. 11. Печень. Пектиновый гемостаз. 14-е сутки. 200х.

Список литературы

1. Nepal A., Tran H.D.N., Nguyen N.T., Ta H.T. Advances in haemostatic sponges: Characteristics and the underlying mechanisms for rapid haemostasis // *Bioact Mater.* 2023. Vol. 27. P. 231-256.
2. Zhang Y., Guan J., Wu J., Ding S., Yang J., Zhang J., Dong A., Deng L. N-alkylated chitosan/graphene oxide porous sponge for rapid and effective hemostasis in emergency situations // *Carbohydr Polym.* 2019. Vol. 219. P. 405-413.
3. Deng Y., Yang X., Zhang X., Cao H., Mao L., Yuan M., Liao W. Novel fenugreek gum-cellulose composite hydrogel with wound healing synergism: Facile preparation characterization and wound healing activity evaluation // *Int J Biol Macromol.* 2020. Vol. 160. P. 1242-1251.
4. Imani R., Rafienia M., Emami S.H. Synthesis and characterization of glutaraldehyde-based cross-linked gelatin as a local hemostat sponge in surgery: an in vitro study // *Biomed Mater Eng.* 2013. Vol. 23. № 3. P. 211-224.

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

5. Икласова А.Ш., Сакипова З.Б., Бекболатова Э.Н. Пектин: состав, технология получения, применение в пищевой и фармацевтической промышленности // Вестник КазНМУ. 2018. № 3.
6. Зайко Г.М., Тамова М.Ю. Получение очищенного пектина для использования в лечебных и профилактических целях // Известия вузов. Пищевая технология. 1998.
7. Yang X., Liu W., Xi G., Wang M., Liang B., Shi Y., Feng Y., Ren X., Shi C. Fabricating antimicrobial peptide-immobilized starch sponges for hemorrhage control and antibacterial treatment // Carbohydr Polym. 2019. Vol. 222. P. 115012.
8. X. Yang, W. Liu, N. Li, M. Wang, B. Liang, I. Ullah, A.L. Neve, Y. Feng, H. Chen, C. Shi Design and development of polysaccharide hemostatic materials and their hemostatic mechanism Biomater. Sci., 5 (12) (2017), pp. 2357-2368

Сведения об авторах

Бердыш Денис Сергеевич, ассистент кафедры хирургических болезней
НОЧУ ВО «Кубанский медицинский институт»; преподаватель кафедры физиологии и общей патологии
ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет»
E-mail: drberdysh@dk.ru

Павленко Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедрой хирургических болезней
НОЧУ ВО «Кубанский медицинский институт»; профессор кафедры факультетской хирургии
ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет».
E-mail: drpaulson@mail.ru,

Ильченко Галина Владимировна: кандидат исторических наук, доцент ректор
НОЧУ ВО «Кубанский медицинский институт»; доцент кафедры Общественного здоровья и здравоохранения
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»
E-mail: ilchenko-g-v@mail.ru,

Евглевский Андрей Александрович, кандидат мед. наук, доцент, доцент кафедры гистологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет», старший научный сотрудник ЦНИЛ
E-mail: evglander@mail.ru

Кудрявцева Екатерина Викторовна, студентка 6 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»
E-mail: katusha.kudryavceva77@gmail.com

Information about author

Berdysch Denis Sergeevich, assistant of department surgery diseases
of Privat Kuban medical Institut assistant of department physiology and general pathology of
State Maykop Thecnology University
E-mail: drberdysh@dk.ru,

Pavlenko Sergey Georgievich, doctor of medical science, professor, chief of department surgery diseases of Privat Kuban medical Institute, professor of department facultets surgery of State Maykop Thecnology University
E-mail: drpaulson@mail.ru,

Ilchenko Galina Vladimirovna, candidate of historical science, assistant of professor, rector of Privat Kuban medical Institute, assistant of professor of department public health and healthcare of State Kuban medical University
E-mail: ilchenko-g-v@mail.ru

Evglevsky Andrey Alexandrovich, candidate of medical science, assistant of professor of department histology of State Kuban medical University. Senior Researcher of Central Research Laboratory.
E-mail: evglander@mail.ru

Kudrjavitcheva Ekaterina Victorovna, student of 6 course faculty of medicine of State Kuban medical University
E-mail: katusha.kudryavceva77@gmail.com

КОРРЕКЦИЯ НЕФРОПАТИИ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Проведено исследование эффективности медикаментозной коррекции нефропатии на экспериментальной фруктоз-индуцированной модели метаболического синдрома. Сочетанное применение концентрата полифенолов лозы винограда и азилсартана обеспечивает более эффективное воздействие на разные патофизиологические звенья развития метаболического синдрома и хронической болезни почек.

Ключевые слова: метаболический синдром, хроническая болезнь почек, полифенольные концентраты.

A. A. Shevandova, L. E. Sorokina, A. V. Tkach, I.I.Fomochkina
"Vernadsky Crimean Federal University"
NRC «Kurchatov Institute» – «Magarach»

CORRECTION OF NEPHROPATHY IN METABOLIC SYNDROME

A study of the effectiveness of drug correction of nephropathy an experimental fructose-induced model of metabolic syndrome. The combined use of grapevine polyphenol concentrate and azilsartan provides a more effective effect on various pathophysiological links in the development of metabolic syndrome and chronic kidney disease.

Key words: metabolic syndrome, chronic kidney disease, polyphenolic concentrates.

Введение.

Согласно проведенным популяционным исследованиям последних лет доказана взаимосвязь между метаболическим синдромом (МС) и развитием хронической болезни почек (ХБП). У пациентов с МС риск возникновения ХБП повышается более чем 2,6 раза. Причем существует корреляция между количеством критериев МС и распространенностью ХБП. Так, у пациентов с тремя, четырьмя и пятью компонентами МС вероятность развития ХБП увеличивается соответственно в 3,4, 4,2 и 5,9 раза [1-3].

При этом механизмы формирования почечной дисфункции остаются не до конца изученными и являются предметом экспериментальных и клинических исследований. Основными известными факторами, участвующими в повреждении почек при МС, являются инсулинорезистентность, гипергликемия, дислипидемия, артериальная гипертензия, избыточная активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, низкоинтенсивное хроническое воспаление, эндотелиальная дисфункция, окислительный стресс, усиление активности факторов коагуляции и торможение фибринолитической системы [4-6].

Поиск терапевтических подходов для коррекции указанных патогенетических механизмов с целью предотвращения или замедления прогрессирования, снижения риска осложнений ХБП, остается одной из приоритетных задач современной медицины.

Цель работы. Оценить эффективность применения полифенольных концентратов, блокаторов ангиотензина-II 1 типа и сахароснижающих препаратов групп ингибиторов НГКТ-2 и ДПП-4 при нефропатии на экспериментальной фруктоз-индуцированной модели МС.

Материалы и методы.

Животные были разделены на 8 групп по 10 особей: контрольная группа, МС без коррекции, МС+БКЛВ (концентрат полифенолов лозы винограда безалкогольный пищевой), МС+КСВ (концентрат семян винограда безалкогольный пищевой), МС + азилсартан (блокатор рецепторов ангиотензина II 1 типа), МС+БКЛВ+азилсартан, МС+гозоглиптин (иДПП-4), МС+ипраглифозин (иНГКТ-2). Коррекция препаратами проводилась в течение 10 недель, начиная с 14 недели. Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica 10.0. Для сравнения групп был использован непараметрический критерий Манна-Уитни.

Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

Нами был проведен анализ соматометрических и биохимических исследований с целью верификации метаболического синдрома, а также исследование уровня концентрации общих маркеров почечного повреждения в периферической крови и моче при МС без и с коррекцией.

Полученные результаты.

Экспериментальное моделирование МС характеризовалось развитием характерных диагностических критериев МС: абдоминального ожирения, гипергликемии, гипертриглицеридемии, снижения уровня ЛПВП, гиперурикемии. Признаки почечной дисфункции характеризовались повышением уровня мочевины, креатинина, снижением уровня общего белка в крови и появление белка (протеинурия) в моче.

В группе крыс с МС без коррекции по сравнению с группой контроля масса висцерального жира увеличилась на 22,1% ($p<0,001$). Наиболее значимое снижение массы висцеральной жировой клетчатки отмечалось при коррекции КСВ в 1,7 раза ($p<0,001$) и БКЛВ в 1,46 раза ($p<0,001$) по сравнению с группой с индуцированным МС без коррекции соответственно.

К 24-й неделе эксперимента среднее значение уровня гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в крови крыс с МС без коррекции достигло 4,4 %, что на 11,4% ($p<0,01$) превысило средний уровень HbA1c в крови крыс контрольной группы.

Применение гозоглиптина и ипраглифозина привело к снижению уровня HbA1c в крови до 4,05%, что на 7,95% ($p<0,001$) ниже среднего уровня гликозилированного гемоглобина крови крыс группы МС без коррекции.

У животных из группы МС без коррекции уровень глюкозы к концу эксперимента превышал показатели группы контроля на 3,8% ($p<0,001$). На фоне коррекции БКЛВ уровень глюкозы в крови составил 2,37 ммоль/л. Это значение достоверно ниже по отношению к группам МС без коррекции (снижение на 39,7%, $p<0,001$) и к значениям крыс группы контроля (снижение на 34,6%, $p<0,001$).

Уровень ОХС в группе с МС без коррекции возрос на 50,7% ($p<0,001$), уровень ТГ - на 12,5% ($p<0,001$), при этом наблюдалось снижение уровня ЛПВП на 27,6% ($p<0,001$).

На фоне применения комбинации БКЛВ и азилсартана наблюдалось снижение уровня ОХС на 13,27% ($p<0,01$), уровня ТГ - на 19,05% ($p<0,001$), повышение ЛПВП на 66,7% ($p<0,001$) по сравнению с группой крыс с МС без его коррекции.

Применение БКЛВ привело к повышению ЛПВП на 78,57% ($p<0,001$) по сравнению с группой МС без коррекции. Однако его применение не вызвало значимые изменения значений ОХС и ТГ.

Коррекция азилсартаном привела к снижению уровня ОХС на 4,42% ($p<0,01$) и ТГ на 14,29% ($p<0,001$). При этом уровень ЛПВП повысился на 59,15% ($p<0,001$) по сравнению с группой МС без коррекции.

Применение гозоглиптина вызвало снижение уровня ОХС на 4,42% ($p<0,01$) и ТГ на 17,46% ($p<0,001$). При этом уровень ЛПВП увеличился на 33,3% ($p<0,001$) по сравнению с группой МС без коррекции.

В группе крыс с МС без коррекции уровень мочевой кислоты возрос в 1,75 раз ($p<0,001$) по сравнению с группой контроля (218,41 ммоль/л и 125,17 ммоль/л соответственно).

Снижению уровня мочевой кислоты способствовало применение БКЛВ в комбинации с азилсартаном до 134,08 ммоль/л и КСВ до 138,12 ммоль/л - на 38,61% ($p<0,001$) и 36,76% ($p<0,001$) соответственно в сравнении с группой МС без коррекции

У животных с МС без коррекции по сравнению с контрольной группой уровень мочевины в крови был повышен на 12,04% ($p<0,001$), снижен общий белок на 16,85% ($p<0,001$). Применение препаратов полифенолов КСВ и БКЛВ способствовало снижению уровня мочевины соответственно на 28,26% и 20,20 % ($p<0,001$). Достоверно выраженное улучшение показателей общего белка отмечалось после использования гозоглиптина (увеличение на 26,31% ($p<0,001$)), КСВ (24,7% ($p<0,001$)) и ипраглифозина (23,04% ($p<0,001$)).

Уровень креатинина в группе крыс с МС без коррекции увеличился на 11,06% ($p<0,001$) по сравнению с группой контроля (82,66 ммоль/л и 74,43 ммоль/л соответственно).

Применение ипраглифлозина привело к снижению уровня креатинина до 72,98 ммоль/л, что составило 11,71% по сравнению с группой крыс с МС без коррекции.

При анализе показателей мочи в группе крыс с МС глюкозурия составила 14 ммоль/л, протеинурия - 0,10 г/л. Применение гозоглиптина и ипраглифлозина привело к нормализации показателей – отсутствию содержания глюкозы и белка в моче. Коррекция БКЛВ в комбинации с азилсартаном также способствовало отсутствию протеинурии.

Выводы.

Анализ соматометрических и биохимических данных свидетельствует об различном влиянии экспериментальных образцов на течение МС.

КСВ и БКЛВ облегчают некоторые проявления МС, а именно центральное ожирение, дислипидемию, гипергликемию, гиперурикемию, кроме того, снижают уровень мочевины, нормализуют показатели общего белка в крови.

Использование азилсартана продемонстрировало и подтвердило ранее описанные в литературе сведения о том, что сартаны улучшают показатели углеводного и липидного обмена, обладают нефропротективным действием, предотвращая ХБП.

Применение БКЛВ и азилсартана оказывает более выраженное положительное влияние на обмен углеводов и липидов, динамику функционального состояния почек.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: сочетанное использование комбинации азилсартана и полифенольного концентрата обеспечивает более эффективное воздействие одновременно на разные патофизиологические механизмы развития МС, чем каждый из препаратов отдельно, и оказывает суммарное нефропротективное воздействие.

Это позволяет говорить о перспективности использования данных препаратов как для лечения МС, так и для профилактики развития ХБП. Дальнейшее исследование сочетанного применения полифенольных концентратов с азилсартаном представляют интерес для выявления их комбинированного влияния на различные органы - мишени при МС.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 24-25-20132.

Литература.

1. Kovesdy C. P. *Epidemiology of chronic kidney disease: an update* // *Kidney Int Suppl.* 2022 T12. №1. P. 7-11. doi:10.1016/j.kisu.2021.11.003.
2. Chen J., Gu D., Chen C. S., et al. *Association between the metabolic syndrome and chronic kidney disease in Chinese adults* // *Nephrol Dial Transplant.* 2007. T.22. №4. P.1100-1106. doi: 10.1093/ndt/gfl759.
3. Chen J., Muntner P., Hamm L. L., et al. *The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults* // *Ann Intern Med.* 2004. №140(3). P. 167- 74. doi:10.7326/0003-4819-140-3-200402030-00007.
4. Ninomiya T., Kiyohara Y., Kubo M., et al. *Metabolic syndrome and CKD in a general Japanese population: the Hisayama Study* // *Am J Kidney Dis.* 2006. T. 48. №3. P. 383-391. doi:10.1053/j.ajkd.2006.06.003.
5. Шевандова А. А., Аметова Л. О., Сорокина Л. Е., Меджитов А. Л., Бычков М. Э., Фомочкина И. И. *Хроническая болезнь почек на фоне метаболического синдрома: комплексный взгляд на патофизиологию, диагностику и перспективы лечения*//*Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2024.T.14. № 3. С.86-95. doi:10.29039/2224-6444-2024-14-3-86-95.
6. Kurella M., Lo J.C., Chertow G.M. *Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults*// *J Am Soc Nephrol.* 2005. №16. С. 2134–2140. doi: 10.1681/ASN.2005010106

Сведения об авторах

Шевандова Алина Алексеевна

ассистент кафедры базисной и клинической фармакологии, Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский Институт им. С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»;

м.н.с., лаборатории аналитических исследований, инновационных и ресурсосберегающих технологий НИЦ «Курчатовский институт» – «Магарах»;

Ялта, Россия

Эл. почта: shevandova_a_a@mail.ru.

Сорокина Лея Евгеньевна

м.н.с., Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»; Симферополь, Россия.

Эл. почта: leya.sorokina@mail.ru.

Ткач Антон Владиславович

м.н.м. кафедры базисной и клинической фармакологии Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»;

Симферополь, Россия.

Эл. почта: v_veber00@mail.ru

Фомочкина Ирина Ивановна

доктор мед. наук, профессор зав. кафедрой базисной и клинической фармакологии Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского»;

Симферополь, Россия.

Эл. почта: fomochkina_i@mail.ru

Information about author

Shevandova Alina Alekseevna

Assistant Professor of the Department of Basic and Clinical Pharmacology, , Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University;

Simferopol, Russian Federation.

Junior Researcher, Laboratory of analytical research, innovative and resource-saving technologies NRC «Kurchatov Institute» – «Magarach»;

Yalta, Russian Federation.

E-mail: shevandova_a_a@mail.ru.

Sorokina Leya Evgenievna

Junior Researcher, Central Research Laboratory, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University;

Simferopol, Russian Federation

E-mail: leya.sorokina@mail.ru.

Tkach Anton Vladislavovich

Junior Researcher of the Department of Basic and Clinical Pharmacology, , Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University;

Simferopol, Russian Federation

E-mail: leya.sorokina@mail.ru.

Fomochkina Irina Ivanovna

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Basic and Clinical Pharmacology, Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I.

Georgievsky, V. I. Vernadsky Crimean Federal University;

Simferopol, Russian Federation

E-mail: fomochkina_i@mail.ru

УДК 611.42
ГРНТИ 76.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.54-59

**В.В. Яглов¹, Э.С. Цомартова^{1,2}, С.С. Обернихин¹, Е.В. Черешнева²,
М.Ю. Иванова², Т.А. Ломановская², О.В. Паюшина²**

¹НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына
ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)

ПЕРИОДЫ НАИБОЛЬШЕЙ УЯЗВИМОСТИ ДЛЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТИМУСА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ

Определены периоды наибольшей уязвимости для функционирования тимуса крыс при развитии организма в условиях низкодозового воздействия эндокринного дисраптора ДДТ. Установлено, что наибольшие нарушения функциональных показателей появляются начиная с периода полового созревания.

Ключевые слова: тимус, пролиферация, пролиферативный ответ, периоды уязвимости, эндокринный дисраптор, ДДТ

V.V. Yaglov¹, E.S. Tsomartova^{1,2}, S.S. Obernikhin¹, E.V. Chereshneva²,
M.Y. Ivanova², T.A. Lomanovskaya², O.V. Payushina²

¹A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery"

²Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

PERIODS OF GREATEST VULNERABILITY FOR THYMUS FUNCTION WHEN EXPOSED TO THE ENDOCRINE DISRUPTOR DDT

The periods of the greatest vulnerability of the rat thymus functioning during the developmental exposure to low-doses of the endocrine disruptor DDT were determined. It was found that the greatest disturbances of functional indices appear from the period of puberty.

Key words: thymus, proliferation, proliferative response, periods of vulnerability, endocrine disrupter, DDT

Введение

Тимус является центральным органом иммунной защиты, формирующим Т-клеточное звено в периферических лимфоидных органах. Его возрастная инволюция происходит значительно быстрее, чем у других органов. Она начинается уже в периоде полового созревания [1]. Таким образом, период его развития и активного функционирования достаточно короток. Помимо этого, тимус чрезвычайно чувствителен к внешним воздействиям, приводящим его к акцидентальной инволюции. К таким воздействиям относятся инфекционные процессы, стресс, воздействие антропогенных факторов. Среди последних значительную часть составляют эндокринные дисрапторы [2]. В наших предыдущих работах мы показывали негативные последствия воздействия низких, являющихся фоновыми, доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на морфофункциональные характеристики тимуса взрослого организма [3]. В последние годы отмечается явная тенденция к росту иммунопатологий не только взрослого, но и детского организмов [4,5]. Вопрос о периодах чувствительности тимуса к воздействию эндокринных дисрапторов остается открытым, но именно его изучение может помочь в объяснении нарушений клеточного звена иммунитета.

Цель исследования – определить параметры морфологического и функционального состояния тимуса при развитии организма в условиях постоянного воздействия эндокринного дисраптора ДДТ как в пренатальном, так и постнатальном периодах и выявить периоды постнатального онтогенеза, когда в тимусе происходят наибольшие изменения.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар. Опытную группу (n=30) составило потомство самок, потреблявших вместо питьевой воды раствор *o,n*-ДДТ с концентрацией 20 мкг/л в течении всей беременности и лактации. Затем самцы крыс самостоятельно потребляли аналогичный раствор. Среднесуточное потребление ДДТ составило $2,7 \pm 0,2$ мкг/кг. Потомство мужского пола интактных самок (n=30) использовалось в качестве контроля. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила в следующие периоды постнатального развития: препубертатный возраст, пубертатный период, половозрелые. Определяли массу тела и массу тимуса, рассчитывали относительную массу тимуса. Получали культуру тимоцитов, в которой изучали пролиферативную активность клеток *ex tempore* и пролиферативный ответ на Т-клеточный митоген конканавалин [6]. Индекс стимуляции пролиферации в реакции бласттрансформации (ИП) определяли по формуле: ИП=КонА-стимулированная пролиферация клеток/пролиферация клеток в среде.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп проводили с помощью *t* критерия Стьюдента

Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и χ^2 . Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

У крыс контрольной группы масса тимуса увеличивалась с возрастом. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, характер изменения массы органа был аналогичным. Статистически значимых отличий в относительной массе тимуса обнаружено не было (рис.1).

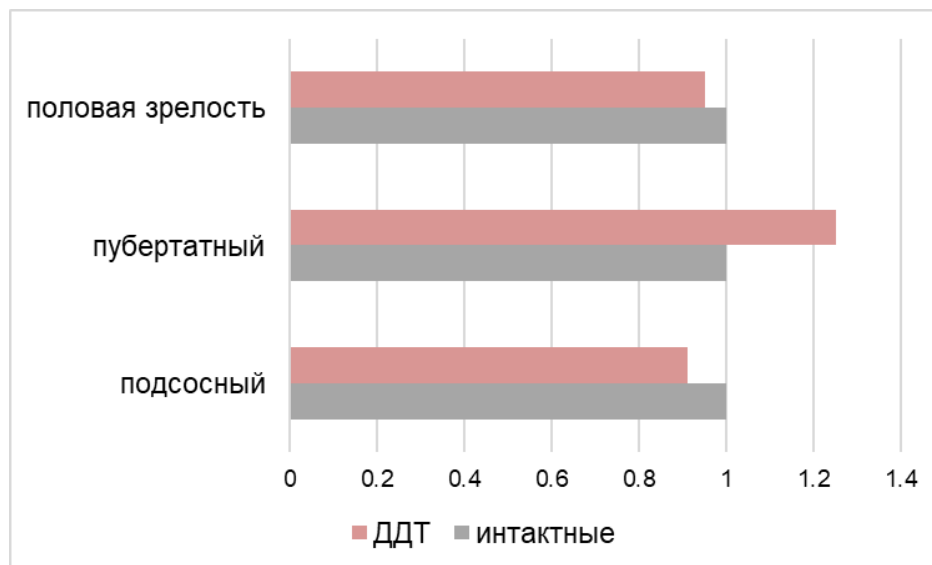


Рис. 1. Относительная масса тимуса крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ. Значения интактного контроля приняты за единицу.

Определение пролиферативной активности показало, что у крыс, развивавшихся при низкодозовом воздействии ДДТ, темпы пролиферации в подсосном периоде отставали от интактных животных. К пубертатному возрасту они достигли значений возрастного контроля, а после наступления половой зрелости многократно увеличились (рис. 2).

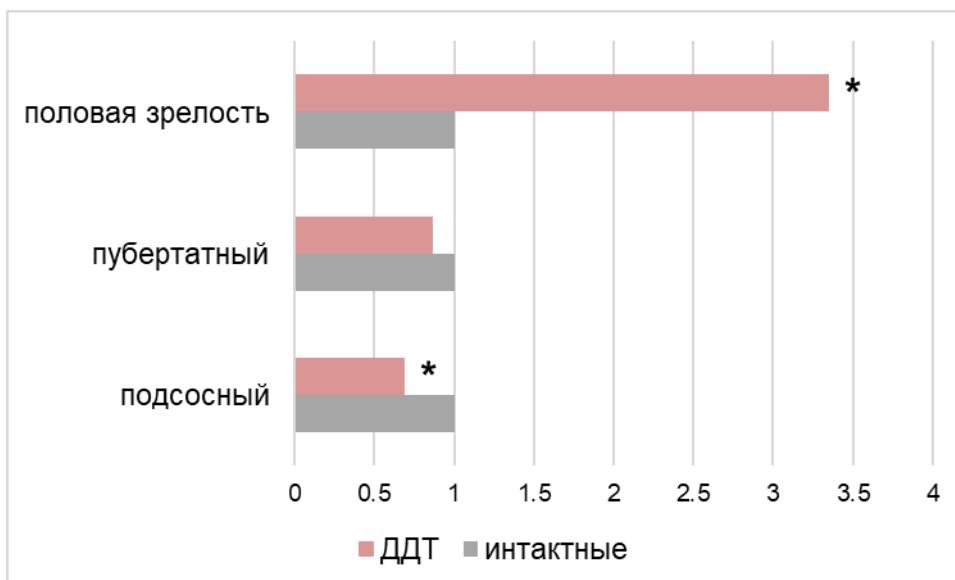


Рис. 2. Показатели пролиферации тимоцитов ex tempore крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ. Значения интактного контроля приняты за единицу.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Исследование пролиферативного ответа тимоцитов на Т-клеточный митоген конканавалин А показало, что на ранних этапах постнатального развития он сформирован аналогично

показателям интактных животных аналогичного возраста. Однако, по мере взросления он становился значительно меньше контрольных значений (рис. 3).

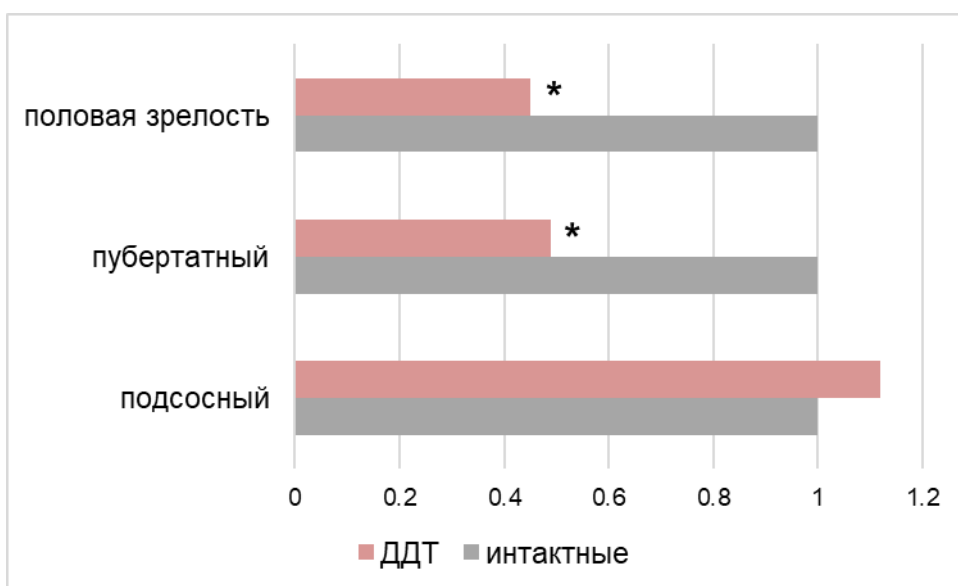


Рис. 3. Показатели индекса пролиферации тимоцитов в реакции бласттрансформации на введение Т-клеточного митогена конканавалина А у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ. Значения интактного контроля приняты за единицу.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Исследование показало, что воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах не нарушало макроанатомические параметры развития тимуса. Однако течение процессов пролиферации имело ряд отличий. Оно отставало в подсосном периоде и резко активировалось после завершения полового созревания, когда уже должна начинаться возрастная инволюция, сопровождающаяся снижением числа делящихся клеток в тимусе. Одновременно обращало внимание, что с пубертатного периода отмечался явный спад в формировании пролиферативного ответа на митоген. Это свойство появляется у лимфоцитов в процессе дифференцировки [7]. Рядом исследований было установлено, что снижение спонтанной пролиферации и увеличение пролиферативного ответа тимоцитов на митоген является показателем увеличения числа дифференцированных лимфоцитов в тимусе. Известно, что формирование ответа на митоген Т-лимфоцитами происходит у крыс и мышей после рождения [7]. Сопоставление показателей пролиферации *ex tempore* и пролиферативного ответа на митоген позволило предположить, что в процессе постнатального развития произошли изменения, приведшие к утрате способности тимоцитов отвечать на введение митогена пролиферацией, которая изначально у них присутствовала. Пониженная функциональная активность Т-клеток могла быть как следствием активного деления клеток в тимусе, то есть превалирования процессов пролиферации над дифференцировкой, так и обуславливать активацию тимопоэза для компенсации пониженной функциональной активности. То, что снижение пролиферативного ответа начиналось в пубертатном периоде на фоне нормальной пролиферативной активности явно указывает на то, что резкое увеличение деления клеток в тимусе являлось следствием их низкой функциональной активности, поскольку именно после достижения половой зрелости у крыс начинается период формирования иммунологической памяти [8].

Выводы

При развитии организма в условиях воздействия эндокринного дисраптора ДДТ наиболее выраженные изменения в тимусе происходят начиная с периода полового созревания и после его достижения, то есть этап формирования иммунологической памяти является наиболее чувствительным периодом уязвимости.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые показано, что функционировании тимуса крыс, развивающихся в условиях низкодозового воздействия ДДТ имеются периоды наибольшей уязвимости к воздействию эндокринного дисраптора.

Литература

1. Яглов В.В., Яглова Н.В. *Основы цитологии, эмбриологии и общей гистологии. программное учебное пособие: для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности "Ветеринария" / Сер. Учебники и учебные пособия для студентов высших учебных заведений. М.: КолосС, 2008.*
2. Gore A.C., Chappell V.A., Fenton S.E., Flaws J.A., Nadal A., Prins G.S., Toppari J., Zoeller R.T. EDC-2, The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals // *Endocr. Rev.* 2015. Vol. 36. N 6. P. E1-E150.
3. Родиченко Е.П., Яглова Н.В., Яглов В.В., Обернихин С.С. Влияние хронического воздействия низких доз ДДТ на морфофункциональное состояние тимуса крыс // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2013. Т.21. №2. С.36-42.
4. Kuo C.H., Yang S.N., Kuo P.L., Hung C.H. Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals // *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2012. Vol. 28, N 7, Suppl. P. S37-S42.
5. Li J., McMurray R.W. Effects of chronic exposure to DDT and TCDD on disease activity in murine systemic lupus erythematosus // *Lupus.* 2009. Vol. 18, N 11. P. 941-949.
6. Яглова Н.В., Обернихин С.С. Морфофункциональные изменения тимуса у потомства мышей в период полового созревания и у взрослых особей после однократного иммуностимулирующего воздействия на материнский организм в ранние сроки беременности // *Иммунология.* 2013. Т. 34, № 1. С. 15-19.
7. Holladay S., Smialowicz R. Development of the murine and human immune system: differential effects of immunotoxicants depend on time of exposure // *Environ. Health Perspect.* 2000. Vol. 108, Suppl. 3. P. 463-473.
8. Silva-Lima B., Due Theilade-Thomsen M., Carleer J., Vidal J.M., Tomasi P., Saint-Raymond A. Juvenile animal studies for the development of paediatric medicines: a description and conclusions from a european medicines agency workshop on juvenile animal testing for nonclinical assessors // *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 2010. Vol. 89, N 6. P. 467-473.

Сведения об авторах

Валентин Васильевич Яглов

доктор мед. наук, профессор, главный научный сотрудник,
НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

Москва, Россия

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

Элина Сослановна Цомартова канд. мед. наук, старший научный сотрудник, старший преподаватель, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

Москва, Россия, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Эл. почта: tselso@yandex.ru

Сергей Станиславович Обернихин

доктор мед. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

Москва, Россия

Эл. почта: ober@mail.ru

Information about author

Valentin Vasilyevich Yaglov

Doctor of Science (Med.), Professor,
Principle Researcher,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of
FSBSI "Petrovsky NRCS",
Moscow, Russian Federation
E-mail: vyaglov@mail.ru

Elina Soslanovna Tsomartova

PhD (Med.), Senior Researcher, Senior Lecturer, FSBSI
"Petrovsky NRCS", Russian Federation, Moscow; Senior
lecturer, Federal State Autonomous Educational Institution
of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State
Medical University of the Ministry of Health of the Russian
Federation (Sechenov University), Russian Federation

Sergey Stanislavovich Obornikhin

Doctor of Science (Med.),
Senior Scientist,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of
FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation
E-mail: ober@mail.ru

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

Елизавета Васильевна Черешнева к.м.н.,
доцент ФГАОУ ВО Первый МГМУ им.
И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченов-
ский Университет)
Эл. почта: yelizaveta.new@mail.ru

Марина Юрьевна Иванова
канд. мед. наук, доцент
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сече-
нова Минздрава России (Сеченовский Уни-
верситет)
Эл. почта: ivanova_m_y@mail.ru

Татьяна Александровна Ломановская
канд. мед. наук, старший преподаватель
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сече-
нова Минздрава России (Сеченовский Уни-
верситет)
Эл. почта: tatiana_80_80@inbox.ru

Паюшина Ольга Викторовна
Д.б.н., профессор, ФГАОУ ВО Первый
МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава Рос-
сии (Сеченовский Университет)
Эл. почта: payushina@mail.ru

Elizaveta Vasilyevna Chereshneva
PhD (Med.), Associate Professor, Federal State Autonomous
Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov
First Moscow State Medical University of the Ministry of
Health of the Russian Federation (Sechenov University)
e-mail: yelizaveta.new@mail.ru

Marina Yuryevna Ivanova
PhD (Med), Associate Professor, Federal State Autonomous
Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov
First Moscow State Medical University of the Ministry of
Health of the Russian Federation (Sechenov University)
e-mail: ivanova_m_y@mail.ru

Tatiana Alexandrovna Lomanovskaya
PhD (Med.), Senior Lecturer, Federal State Autonomous Ed-
ucational Institution of Higher Education I.M. Sechenov
First Moscow State Medical University of the Ministry of
Health of the Russian Federation (Sechenov University),
Russian Federation
e-mail: tatiana_80_80@inbox.ru

Payushina Olga Victorovna
Doctor of Science (Biol.), Professor, Federal State Autono-
mous Educational Institution of Higher Education I.M. Se-
chenov First Moscow State Medical University of the Minis-
try of Health of the Russian Federation (Sechenov Univer-
sity)
e-mail: payushina@mail.ru

УДК 611.41
ГРНТИ 76.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.59-63

**Б.Б.Гагулаева, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, С.В. Назимова,
Е.П. Тимохина, В.В. Яглов**
НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына
ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

**МИГРАЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ В СЕЛЕЗЕНКУ В ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ У
КРЫС, РАЗВИВАВШИХСЯ ПРИ НИЗКОДОЗОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ДИХЛОР-
ДИФЕНИЛТРИХЛОРЭТАНА**

Получены данные, на основании которых существующая концепция регенерации мозгового вещества была дополнена новым положением: поддержание тканевого гомеостаза в мозго-
вом веществе надпочечников в постнатальном онтогенезе может происходить не только
за счет пролиферации хромаффинных клеток, но также и за счет создания пула высокодиф-
ференцированных хромаффиноцитов, готовых к дальнейшей дедифференцировке.

Ключевые слова: нейтрофил, селезенка, миграция, ДДТ

	B.B. Gagulaeva, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, S.V. Nazimova, E.P. Timokhina, V.V. Yaglov A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery"

**NEUTROPHIL MIGRATION TO SPLEEN DURING POSTNATAL ONTOGENY IN
RATS DEVELOPMENTALLY EXPOSED TO LOW DOSES OF DICHLORODIPHENYL-
TRICHLOROETHANE**

The exiting concepts of adrenal medulla reparation and self-maintenance have been supplemented by a new position that the tissue homeostasis in the adrenal medulla during postnatal ontogeny is ensured both by cell proliferation and appearance of pool of highly differentiated adrenal cells ready to dedifferentiation.

Key words: neutrophil, spleen, migration, DDT

Введение

Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) является одним из наиболее распространенных персистирующих эндокринных дисрапторов, способных проникать через фетоплацентарный барьер [1-4]. Данные медицинской статистики показывают, что эндокринные дисрапторы вносят существенный вклад в увеличение числа заболеваний, обусловленных нарушениями функционирования иммунной системы [5,6]. Селезенка является крупнейшим органом иммунной защиты у человека и млекопитающих. В ней реализуются реакции клеточного и гуморального иммунитета. В селезенке существует сложная система клеточных взаимодействий, в которой важную роль играют нейтрофилы. Нейтрофилы появляются в селезенке после рождения, что связано с заселением кишечника микрофлорой и поступлением ее антигенов в системный кровоток. На ранних этапах нейтрофилы появляются в красной пульпе, а затем мигрируют в маргинальную зону, где участвуют в стимуляции синтеза нейтрализующих бактериальные антигены иммуноглобулинов В-клетками [7]. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что у новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ, темпы миграции нейтрофилов в селезенку замедлены, несмотря на нормальные анатомические параметры органа и опережающие темпы формирования лимфоидных образований [8-10].

Цель исследования – изучить особенности миграции нейтрофилов в селезенку крыс в постнатальном развитии в условиях низкодозового воздействия ДДТ.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 40 самцах крыс Вистар. Опытную группу (n=20) составило потомство самок, потреблявших вместо питьевой воды раствор *o,p*-ДДТ с концентрацией 20 мкг/л в течении всей беременности и молочного вскармливания. Потребление ДДТ самками составило $2,72 \pm 0,18$ мкг/кг, самостоятельное потребление потомством – $2,90 \pm 0,13$ мкг/кг/сут что соответствует уровню потребления данного вещества населением с продуктами питания с учетом различий в метаболизме ДДТ человека и крысы [11]. Отсутствие в корме и воде ДДТ и его метаболитов было подтверждено методом газожидкостной хроматографии. В качестве контрольной группы использовали интактных самцов (n=20). Животных выводили из эксперимента передозировкой хлороформного наркоза в возрасте 7-ми суток, что соответствует подсосному периоду, и 42-х суток (пубертатный период). Определяли массу тела и массу селезенки с помощью аналитических весов («Сартогосм», Россия), а также рассчитывали относительную массу органа. Селезенку фиксировали в жидкости Буэна и после стандартной проводки изготавливали срезы, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Для компьютерной морфометрии использовали программу «ImageScope» («Leica Microsystems», Германия). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm SEM$). Сравнение независимых групп проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и χ^2 . Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

У крыс контрольной группы подсосного возраста паренхима селезенки была представлена периартериолярными лимфоидными муфтами, вокруг которых начинала формироваться маргинальная зона. В красной пульпе содержалось большое количество гемопозитических клеток. нейтрофилы заселяли не только красную пульпу, но и мигрировали в формирующуюся маргинальную зону, что свидетельствует о начале формирования иммунного процесса.

Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

У животных, подвергавшихся воздействию ДДТ, маргинальная зона была более выражена. Нейтрофилы обнаруживались в селезенке на 7-м стуки, но в маргинальную зону еще не мигрировали, несмотря на ее более активное развитие, что указывает на замедление формирования реакции иммунокомпетентных органов на антигены. Гемопоэтические процессы протекали с одинаковой интенсивностью.

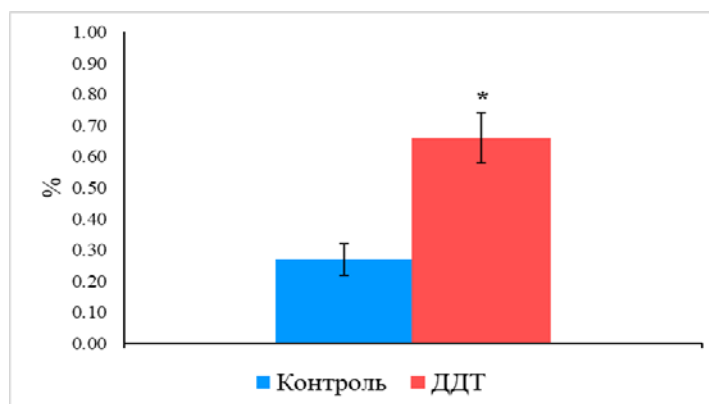


Рис. 1. Отличия в содержании нейтрофилов в красной пульпе в подсосном возрасте у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ, ($M \pm m$).

Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В пубертатном периоде у крыс контрольной группы в селезенке белая пульпа была представлена лимфатическими узелками и периартериолярными лимфоидными муфтами с хорошо сформированной маргинальной зоной. И в красной пульпе, и в маргинальной зоне содержались нейтрофилы.

У крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ, степень развития лимфоидных образований соответствовала возрастному контролю. Однако у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, подавляющее большинство лимфоидных узелков не имело герминативных центров. Маргинальная зона была хорошо развита и не отличалась степени развития, но количество нейтрофилов в ней было в четыре раза меньше, чем в контроле. При исследовании красной пульпы было выявлено высокое содержание гемопоэтических клеток и лейкоцитов, превышающее значения контроля в 1,5-2 раза. Содержание нейтрофилов в красной пульпе также было меньше, чем в контроле.

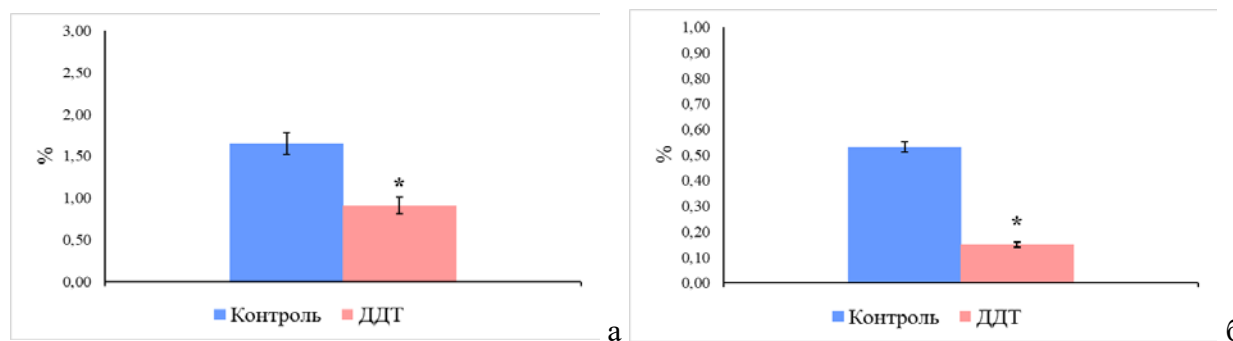


Рис. 2. Отличия в содержании нейтрофилов в красной пульпе (а) и маргинальной зоне (б) в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ, ($M \pm m$).

Примечания: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Исследование показало, что у крыс контрольной группы миграция нейтрофилов в селезенку увеличивается по мере взросления. Нейтрофилы мигрируют в красную пульпу, а затем в маргинальную зону, где участвуют в передаче сигнала лимфоцитам. У крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ, миграция нейтрофилов происходила в красную пульпу в подсосном периоде характеризовалась большими значениями, но это было вероятно связано с более медленной их миграцией из красной пульпы в маргинальную зону. Меньшее содержание нейтрофилов в пубертатном возрасте свидетельствует о замедлении процессов их миграции из системного кровотока, что в свою очередь свидетельствует о меньшей скорости формирования

межклеточного взаимодействия в иммунокомпетентных органах.

Выводы

Таким образом, у крыс, развивавшихся при низкодозовом эндокринного дисраптора ДДТ, в пубертатном периоде появляются признаки замедления миграции нейтрофилов в селезенку, а особенно в маргинальную зону, что указывает на отставание в развитии иммунной функции органа.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые установлено, что миграция нейтрофилов в селезенку в процессе постнатального развития чувствительна к действию эндокринного дисраптора ДДТ и замедляется с пубертатного периода.

Литература

1. Hao S., Li W.L., Liu L.Y., Zhang Z.F.; Ma W.L., Li Y.F. Spatial distribution and temporal trend of organochlorine pesticides in Chinese surface soil // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2023. Vol. 30. P. 82152–82161. doi:10.1007/s11356-023-28198-1
2. Mamontova E.A., Mamontov A.A. Persistent organic pollutants and suspended particulate matter in snow of eastern Siberia in 2009–2023: temporal trends and effects of meteorological factors and recultivation activities at former industrial area // *Toxics*. 2024. Vol. 12. N. 1. 11. doi:10.3390/toxics12010011
3. Zhang S., Zhao W., Yang C., Li Y., Liu M., Meng X.Z., Cai M. Assessment of currently used organochlorine pesticides in surface water and sediments in Xiangjiang river, a drinking water source in China: Occurrence and distribution characteristics under flood events // *Environ. Pollut.* 2022. Vol. 304. 119133. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119133
4. Veludo A.F., Martins Figueiredo D., Degrendele C., Masinyana L., Curchod L., Kohoutek J., Kukučka P., Martiník J., Přibyllová P., Klánová J., Dalvie M.A., Rössli M., Fuhrmann S. Seasonal variations in air concentrations of 27 organochlorine pesticides (OCPs) and 25 current-use pesticides (CUPs) across three agricultural areas of South Africa // *Chemosphere*. 2022. Vol. 289. 133162. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133162.
5. Gascon M., Morales E., Sunyer J., Vrijheid M. Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: a systematic review // *Environ. Int.* 2013. Vol. 52. P. 51-65. doi: 10.1016/j.envint.2012.11.005.
6. Kuo C.H., Yang S.N., Kuo P.L., Hung C.H. Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals // *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2012. Vol. 28. 7 Suppl. S37-42. doi: 10.1016/j.kjms.2012.05.008.
7. Puga I., Cols M., Barra C.M., He B., Cassis L., Gentile M., Comerma L., Chorny A., Shan M., Xu W., Magri G., Knowles D.M., Tam W., Chiu A., Bussel J.B., Serrano S., Lorente J.A., Bellosillo B., Lloreta J., Juanpere N., Alameda F., Baró T., de Heredia C.D., Torán N., Català A., Torreadell M., Fortuny C., Cusí V., Carreras C., Diaz G.A., Blander J.M., Farber C.M., Silvestri G., Cunningham-Rundles C., Calvillo M., Dufour C., Notarangelo L.D., Lougaris V., Plebani A., Casanova J.L., Ganai S.C., Diefenbach A., Aróstegui J.I., Juan M., Yagüe J., Mahlaoui N., Donadieu J., Chen K., Cerutti A. B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen // *Nat. Immunol.* 2011. V. 13 P. 170–180. doi:10.1038/ni.2194.
8. Яглова Н.В., Гагулаева Б.Б., Тимохина Е.П., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В. Отличия в развитии селезенки у новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном периоде // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023. Т. 176. №7. С. 128-132. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-176-7-128-132
9. Гагулаева Б.Б., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Изменения формирования селезенки в раннем постнатальном периоде у крыс, развивавшихся при низкодозовом воздействии эндокринного дисраптора ДДТ // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2023. Т.12. №4. С. 71-79.

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

10. Яглова Н.В., Гагулаева Б.Б., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Морфогенез селезенки в неонатальном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ // Известия РАН. Серия Биологическая. 2024. №3. С.307-317.
11. Yamazaki H., Takano R., Horiuchi K., Shimizu M., Murayama N., Kitajima M., Shonod F. Human blood concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) extrapolated from metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling // J. Health Sci. 2010. Vol. 56, N 5. P. 566-575.

Сведения об авторах

Гагулаева Белла Борисовна

Аспирант НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

Москва, Россия

Эл. почта: gagulati@yandex.ru

Наталья Валентиновна Яглова

доктор мед. наук, зав. лабораторией, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

Москва, Россия

Эл. почта: yaglova@mail.ru

Сергей Станиславович Обернихин

доктор мед. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

Москва, Россия

Эл. почта: ober@mail.ru

Светлана Владимировна Назимова

Канд. мед. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия

Эл. почта: pimka60@list.ru

Екатерина Петровна Тимохина

кандидат биол. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

Москва, Россия

Эл. почта: ober@mail.ru

Валентин Васильевич Яглов

доктор мед. наук, профессор, главный научный сотрудник, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

Москва, Россия

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

Information about author

Gagulaeva Bella Borisovna

Postgraduate student A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation

E-mail: gagulati@yandex.ru

Nataliya Valentinovna Yaglova

Doctor of Science (Med.), Head of Department, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation

E-mail: yaglova@mail.ru

Sergey Stanislavovich Obernikhin

Doctor of Science (Med.), Senior Scientist, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation

E-mail: ober@mail.ru

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD (PhD (Med)), Senior Scientist, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation

E-mail: pimka60@list.ru

Ekaterina Petrovna Timokhina

Ph.D.(Biol.), Senior Scientist, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation

E-mail: ober@mail.ru

Valentin Vasilyevich Yaglov

Doctor of Science (Med.), Professor, Principle Researcher, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation

E-mail: vyaglov@mail.ru

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫХ ЭМУЛЬСИЙ ОЗОНИРОВАННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА В ЛЕЧЕНИИ БУЛЛЕЗНО-ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ФОРМЫ РОЖИ.

В статье апробированы результаты лечения буллезно-геморрагической формы рожжи, правой голени, композитами на основе микрокапсулированного озонированного растительного масла.

Ключевые слова: озониды, масла, рожа, лечение, методы, случаи.

УДК: 617-089.844

E.A.Edygova,D.S.Berdysh,S.G.Pavlenko
Federal State Budgetary Educational Institution
of Higher Education
"MaikopStateTechnologicalUniversity",
Maikop

THE USE OF MICROCAPSULATED EMULSIONS OF OZONATED VEGETABLE OIL - IN THE TREATMENT OF BULLOUS HEMORRHAGIC ERYSIPELAS.

The article tests the results of treatment of bullous hemorrhagic form of erysipelas, right shin, with composites based on microcapsulated ozonated vegetable oil.

Keywords: ozonides, oils, erysipelas, treatment, methods, cases.

Введение

Рожа – это острое инфекционное заболевание кожи и подкожной клетчатки, вызываемое β -гемолитическим стрептококком группы А (*Streptococcus pyogenes*), реже другими стрептококками групп С и G. Характеризуется лихорадкой, интоксикацией и четко ограниченным очагом воспаления с яркой гиперемией и отеком [1].

При рожистом воспалении патогенез затрагивает многие системы организма, включая лимфатическую и кровеносную системы. Несмотря на увеличение абсолютного числа лейкоцитов и их активацию, наблюдается их морфофункциональная неполноценность. Накопление активных лейкоцитов при угнетении хемотаксиса ведет к системной воспалительной реакции.

Этиология и патогенез

Основным возбудителем рожжи является *Streptococcus pyogenes* (β -гемолитический стрептококк группы А – БГСА). Этот микроорганизм обладает широким спектром факторов патогенности, включая М-белки (обеспечивающие антифагоцитарную активность), стрептолизины, гиалуронидазу, стрептокиназу и другие ферменты, способствующие инвазии и распространению инфекции [2]. В редких случаях заболевание может быть вызвано стрептококками групп С (*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) и G (*S. anginosus*), а также стафилококками в ассоциации со стрептококками [3].

Патогенез рожжи включает несколько ключевых этапов:

1. Входные ворота инфекции – микротравмы кожи, трофические язвы, грибковые поражения стоп, опрелости, венозная недостаточность [4].

2. Адгезия и инвазия – стрептококки фиксируются к клеткам эпидермиса и дермы за счет поверхностных белков (М-протеины, фибронектин-связывающие белки) [5].

3. Развитие местного воспаления – под действием стрептококковых токсинов (стрептолизин О, пирогенные экзотоксины) происходит активация цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α),

что приводит к вазодилатации, повышению проницаемости сосудов и формированию отека [6]. 4. Генерализация инфекции – в 30–40% случаев наблюдается бактериемия, что способствует системной интоксикации и лихорадке [7].

5. Рецидивирующее течение – связано с формированием L-форм стрептококка и нарушением местного иммунитета (снижение уровня IgA в коже) [8].

Эпидемиология и распространенность в РФ

Рожа остается актуальной проблемой в России, занимая 4-е место среди гнойно-воспалительных заболеваний после фурункулеза, абсцессов и флегмон [9]. По данным Роспотребнадзора, заболеваемость в РФ составляет 12–20 случаев на 10 000 населения, причем отмечается рост частоты рецидивирующих форм (до 30% всех случаев) [10]. Наиболее высокая заболеваемость регистрируется в Северо-Западном и Центральном федеральных округах, что может быть связано с климатическими факторами и высокой распространенностью хронической венозной недостаточности среди населения [11].

Методы лечения

Основным методом лечения буллезно-геморрагической формы рожи является антибиотикотерапия. В случае выраженных острых проявлений пузыри вскрываются, геморрагический экссудат удаляется, а на пораженные участки накладываются повязки с 0,1% раствором риванола или 0,02% раствором фурацилина. Особое значение имеет местное лечение. В исследовании 10 пациентам с буллезно-геморрагической формой рожи, находившимся на амбулаторном лечении и подписавшим информированное добровольное согласие, в качестве ранозаживляющего средства было предложено озонированное льняное масло заменить.

Материалы и методы

Средний возраст пациентов составил 72 года, из них 8 мужчин и 2 женщины. Средняя продолжительность существования язвенных дефектов – 8 месяцев, площадь язв – 37,5 см² (35–40 см²).

Местное лечение проводилось путем нанесения озонированного масла во 2-й фазе раневого процесса, без использования других средств.



Фото 1. До начала лечения озонированным льняным маслом в композите.

Местный выраженный отек нижней конечности, участок кожи гиперемирован, имеются изъязвления.



1 сутки – после начала лечения озонированным маслом.

На макроскопическом уровне виден отек, расположенный на периферии от очага поражения, так же присутствует гиперемия участков кожи, и выраженный воспалительный инфильтрат.



7 сутки – после начала лечения озонированным маслом.

Гиперемия почти отсутствует, изъязвления умеренно выражены, видна пролиферация ткани вокруг наложенного масла, отечность нижней конечности отсутствует, воспаление умеренно выражено. Намечается тенденция к раневой контракции.



21 Сутки – после наложения озонированного льняного масла

Гиперемия почти не проявляется, пролиферация ткани заметно увеличилась, озонированное масло проявившееся как пленка отслаивается по мере продвижения пролиферативной ткани, отек присутствует, но меньше чем в выше перечисленных сутках, воспаления отсутствует, наблюдается биодеградация пленки.

Результаты исследования

В ходе лечения отмечалось активное разрастание грануляционной ткани, ускорение процессов регенерации, уменьшение размеров раневых дефектов и снижение экссудации.

Биодеградация озонированная льняная пленки наблюдалась на 3-е сутки, полное очищение язвенных дефектов – на 7-е сутки, развитие грануляций – на 14-е сутки, а полная эпителизация язвенных дефектов – на 19-21 день. Микроскопически отмечалось активное разрастание грануляционной ткани и уменьшение воспаления. В контрольных бактериальных посевах наблюдалась полная элиминация патогенной микрофлоры.

Заключение

Таким образом, применение озонированного льняного масла при лечении буллезно-геморрагической формы рожи продемонстрировало выраженный терапевтический эффект. Озонированное масло в композитах проявило высокую антибактериальную, сорбционную и защитную функции, способствуя ускоренной регенерации тканей. Использование озонированного льняного масла в местной терапии рожи представляется перспективным направлением лечения.

Список литературы

1. Симбирцев А.С., Беляева Т.В. Рожжа: современные аспекты этиологии, патогенеза и лечения // *Клиническая дерматология и венерология*. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 45-52.
2. Cunningham M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections // *Clin Microbiol Rev.* – 2000. – Vol. 13(3). – P. 470-511.
3. Брико Н.И. Стрептококковые инфекции: современные особенности // *Инфекционные болезни*. – 2019. – Т. 17, № 2. – С. 15-23.
4. Дмитриев Г.А. Рожжа: клиника, диагностика, лечение // *Лечащий врач*. – 2021. – № 5. – С. 67-72.
5. Bisno A.L., Stevens D.L. *Streptococcus pyogenes* // *Principles and Practice of Infectious Diseases*. – 2015. – P. 2285-2300.
6. Свистунов А.А. Роль цитокинов в патогенезе рожистого воспаления // *Иммунология*. – 2018. – Т. 39, № 4. – С. 210-215.
7. Козлов Р.С. Бактериemia при рожже: частота и клиническое значение // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2020. – Т. 65, № 7-8. – С. 34-40.

Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

8. Ершов Ф.И. Иммунопатогенез рецидивирующей рожи // Иммунология. – 2017. – Т. 38, № 3. – С. 156-162.
9. Данные Роспотребнадзора РФ // Заболеваемость гнойно-воспалительными болезнями кожи в РФ. – 2022.
10. Заплатников А.Л. Эпидемиология рожи в России // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2021. – Т. 26, № 2. – С. 89-95.
11. Региональные особенности заболеваемости рожей // Журнал инфектологии. – 2019. – Т. 11, № 4. – С. 78-84.

Сведения об авторах

Едыгова Азида Байзетовна

Ассистент кафедры морфологии ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет» г. Майкоп. Эл. Почта: Xxx.ea7@bk.ru

Бердыш Денис Сергеевич

Преподаватель кафедры общей хирургии ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет» г. Майкоп. Эл. Почта: drberdysh@bk.ru

Павленко Сергей Георгиевич

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет» г. Майкоп. Эл. Почта: drpaulson@mail.ru

Information about author

Edygova Azida Bayzetovna

Assistant Professor at the Department of Morphology of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Maikop State Technological University", Maykop.
E-mail: Xxx.ea7@bk.ru

Berdysh Denis Sergeevich

Lecturer of the Department of General Surgery of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Maikop State Technological University", Maykop.
E-mail: drberdysh@bk.ru

Pavlenko Sergey Georgievich

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Topographic Anatomy and Operative Surgery of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Maikop State Technological University", Maykop.
E-mail: drpaulson@mail.ru

УДК 575.17:599.9

ГРНТИ 34.23.35

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.68-73

И. Г. Удина¹, А. С. Грачева¹, М.А. Губина²,
Ю.А. Васильев³, **О. Л. Курбатова¹**

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

³ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НАСЕЛЕНИЯ МЕГАПОЛИСОВ ПО МАРКЕРАМ Y-ХРОМОСОМЫ

Изучен уровень генетической дифференциации по 18 STR и гаплогруппам Y-хромосомы в выборке мужчин старшего поколения Новосибирска, старшего, среднего и младшего поколения Москвы и выборки из Санкт-Петербурга под действием миграции. Значимые статистически различия между отдельными выборками и накопление «южных по происхождению» гаплогрупп за счет современных потоков мигрантов свидетельствуют о необходимости создания генетических и референтных баз данных для каждого мегаполиса.

Ключевые слова: Новосибирск, Москва, Санкт-Петербург, население, мегаполис, миграция, генофонд, STR, гаплогруппы Y-хромосомы, референтные базы данных.

**I. G. Udina¹, A. S. Gracheva¹, M.A. Gubina², Yu. A Vasiliev³,
O.L. Kurbatova¹**

¹ N.I. General Genetics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow

² Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian
Department of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

³ Kubanskii State Medical University, Krasnodar

DIFFERENTIATION OF POPULATION OF MEGALOPOLISES BY MARKERS OF Y-CHROMOSOME

In the samples from senior generations of Novosibirsk, senior, middle and younger generations from Moscow and in the sample from Saint-Petersburg, the genetic differentiation by 18 STR and haplogroups of Y-chromosome under action of migration was studied. Statistically significant differences between samples and accumulation of «Southern origin» haplogroups due to modern migrant flows evidence necessity of developing genetic and reference data bases for each megalopolis.

Key words: Moscow, Novosibirsk, Saint-Petersburg, population, megalopolis, migration, gene pool, Y-chromosome haplogroups, reference database.

Введение.

Вероятность случайного совпадения генотипа одного человека по ДНК-маркерам с генотипом другого человека в популяции вычисляется на основе данных о частотах ДНК-маркеров в конкретной популяции, для чего и создаются референтные базы данных по аутосомным STR-маркерам и маркерам мтДНК и Y-хромосомы [1-3]. Принадлежность к определенной гаплогруппе Y-хромосомы определяется по присутствию ключевой нуклеотидной замены (SNP) или нескольких в конкретных позициях [4]. В процессе передачи Y-хромосомы в поколениях происходит накопление спектра SNP, а также сцепленных STR-маркеров, что позволяет по STR-генотипу определять принадлежность к определенной гаплогруппе с помощью предикторов гаплогрупп Y-хромосомы [5]. Маркеры Y-хромосомы высоко информативны и применяются в судебной генетике [6]. Население мегаполисов представляют собой популяции смешанного типа с характерными особенностями генетико-демографических процессов [7]. Основным фактором динамики генофонда населения мегаполиса является миграция [8]. Население трех самых крупных мегаполисов было изучено на основе анкетирования и переписей населения для вычисления генетико-демографических параметров [9-11].

Целью нашего исследования является рассмотрение особенностей профиля частот 18 STR-гаплотипов и гаплогрупп Y-хромосомы и генетической дифференциации населения трех крупнейших мегаполисов Российской Федерации.

Материалы и методы.

Изучены представители старшего и среднего поколения Москвы и старшего поколения Новосибирска для изучения особенностей генофондов мегаполисов в Европейской части нашей страны и Сибири до начала современных потоков мигрантов с Кавказа, из Закавказья и Средней Азии после распада Советского Союза в 1991 г., а также представители молодого поколения Москвы, рожденного через поколение после 1991, и выборка из Санкт-Петербурга с широким диапазоном по годам рождения, включая родившихся после 1991 г. [9-11].

ДНК из биологических образцов выделена стандартным методом с применением набора реактивов фирмы «Изоген» (Москва). Для генотипирования образцов ДНК по 18 STR Y-хромосомы (DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS19, DYS385A, DYS385B, DYS456, DYS437, DYS438, DYS447, DYS448, DYS449, DYS391, DYS392, DYS393, DYS439, DYS635 и DYS576) применяли набор реагентов для амплификации 18 полиморфных STR-маркеров Y-хромосомы человека (COrDIS Ystr - Мультиплексный набор для амплификации 18 полиморфных STR -маркеров Y-хромосомы человека (ООО «Гордиз» (Москва)). Затем устанавливали принадлежность выявленного 18 STR-гаплотипа к гаплогруппе Y-хромосомы с

Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

помощью предиктора - Whit Athey's Haplogroup Predictor Athey [5]. Статистический анализ проведен в программах «WinPepi», «Arlequin 3.5.2.2», «GenAlEx 6,5», и MS Excel. От каждого лица, включенного в выборку, получено информированное согласие на использование биологического образца (крови) и генетико-демографических данных в анонимном виде в популяционном исследовании.

Полученные результаты.

Более 91% гаплогрупп Y-хромосомы по STR гаплотипу с помощью использованного предиктора определено с вероятностью 100%. Для остальных случаев дополнительно привлекали другие доступные в Интернете предикторы. Практически во всех случаях достигли определения гаплогруппы с вероятностью не менее 99%. Распределение гаплогрупп Y-хромосомы у жителей Москвы, Новосибирска и Санкт-Петербурга в целом соответствует русскому генофонду с наиболее распространенными гаплогруппами *R1a*, *R1b*, *E1b1b1*, *N*, *I1*, *I2* (в отдельных выборках дополнительно - *J1* и *J2*) с превалированием гаплогруппы *R1a* (табл. 1) [12-14, 15].

Для изученной выборки мужского населения г. Новосибирска характерно незначительное присутствие в генофонде «южных по происхождению» гаплогруппы Y-хромосомы (*G2a*, *G2c*, *J1*, *J2*, *L*, *O2*, *O3*, *Q*, *R2* и *T*), ранее выявленных в Москве и Санкт-Петербурге для более молодых поколений с частотой 21 и 16%, соответственно [9, 10] (табл. 1). В Новосибирске выявлены только *J1*, *J2* и *C3* (*M217*) с суммарной частотой (3,4%), что обусловлено принадлежностью рассматриваемой выборки к старшему поколению и практическим отсутствием в этом поколении мегаполиса мигрантов с Северного Кавказа, из Закавказья и Средней Азии.

Таблица 1.

Частоты гаплогрупп Y-хромосомы в населении трех мегаполисов

	Новосибирск		Москва 1*		Москва 2**		Санкт-Петербург	
Гаплогруппа	N***	f****	N	f	N	f	N	f
<i>E1b1b</i>	5	0.043	3	0.018	17	0.043	15	0.100
<i>I1</i>	9	0.078	10	0.059	21	0.053	14	0.093
<i>I2</i>	14	0.120	23	0.136	42	0.105	11	0.073
<i>N</i>	15	0.129	25	0.148	29	0.073	17	0.113
<i>R1a</i>	63	0.543	79	0.466	181	0.453	62	0.414
<i>R1b</i>	6	0.052	10	0.059	26	0.065	7	0.047
«южные по происхождению»	4	0.034	19	0.112	84	0.210	24	0.160
Всего	116	1.000	169	1.000	400	1.000	150	1.000

Примечание. * - Москва 1 – объединенная выборка из среднего и старшего поколения; ** - Москва 2 – выборка из младшего поколения Москвы; ***- N – количество выявленных гаплогрупп; ****- f-частота гаплогруппы

Различий по частотам 18 STR Y-хромосомы между старшим поколением Новосибирска и Москвы не выявлено, что подтверждает и оценка *Rst*, близкая к 0. В отличие от выборки из Новосибирска, для объединенной старшей и средней выборки из Москвы отмечено присутствие «южных по происхождению» гаплогрупп с частотой 11,2%, представлены гаплогруппы (*G2a*, *J1*, *J2*, *T*, *O2* и *Q*). Для старших поколений двух мегаполисов установлены достоверные различия по присутствию «южных по происхождению» гаплогрупп ($p=0.025$, $OR=0.28$ CI95% 0.07-0.88). Отмеченные особенности выборки из Москвы по сравнению с выборкой из Новосибирска указывают на более раннее (до 1991 г.) проникновение миграционных потоков в мегаполис, которые приносят отдельные «южные по происхождению» гаплогруппы. Полученные оценки хорошо согласуются с данными анкетирования о местах происхождения и этническом составе мигрантов рассматриваемых выборок. По профилю частот 18 STR Y-

хромосомы установлены достоверные различия по оценкам F_{st} между выборкой из старшего поколения Новосибирска и из младшего поколения Москвы, а также с выборкой из Санкт-Петербурга ($F_{st}=0,0087$, $p<0.01$ и $F_{st}=0,0087$, $p<0.05$, соответственно).

Выводы.

Установленные особенности профилей частот гаплогрупп в старшем поколении Новосибирска и объединенной выборкой из среднего и старшего поколения Москвы сближают их, но отличны от профилей частот гаплогрупп Y-хромосомы в младшем поколении Москвы и в выборке из Санкт-Петербурга, что подтверждено оценками R_{st} и генетических расстояний по М. Нею между изученными популяциями. Накопление «южных по происхождению» гаплогрупп Y-хромосомы ($G2a$, $G2c$, $J1$, $J2$, L , $O2$, $O3$, Q , $R2$ и T) в генофондах мегаполисов происходит за счет современной миграции из регионов Северного Кавказа, Закавказья и Средней Азии. Таким образом, необходимо создавать референтные базы данных по ДНК-маркерам для каждого мегаполиса с учетом возраста жителей, структуры миграции и географического положения мегаполиса, так как влияние последнего обусловлено геногеографическими особенностями распространения гаплогрупп Y-хромосомы [16, 17].

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты.

В старшем поколении мегаполисов как на территории Европейской части РФ (Москвы), так и на территории Сибири (Новосибирска) отмечено сходство в профилях гаплогрупп Y-хромосомы в целом соответствующих профилю русского генофонда [12].

По сравнению с более молодыми поколениями выявлена относительно более низкая частота «южных по происхождению» гаплогрупп Y-хромосомы ($G2a$, $G2c$, $J1$, $J2$, L , $O2$, $O3$, Q , $R2$ и T), характерных для современных потоков мигрантов, которая составила 11,2% в объединенной выборке из среднего и старшего поколения Москвы и старшего поколения Новосибирска - 3,4%, в младшем поколении Москвы - 21% и в Санкт-Петербурге - 16%. Накопление «южных по происхождению» гаплогрупп Y-хромосомы в генофонде мегаполисов с потоками мигрантов подтверждено данными анкетирования. Полученные данные об особенностях распространения гаплогрупп Y-хромосомы у жителей трех мегаполисов свидетельствуют о необходимости создания референтных баз данных для каждого мегаполиса, так как генофонд мегаполиса меняется под действием миграции, а ее параметры специфичны для каждого мегаполиса и отдельных поколений.

Авторы благодарят жителей мегаполисов, принявших участие в анкетировании и предоставивших свои биологические образцы для исследования. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследование одобрено Этическим комитетом ИОГен РАН. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие (в выборке новорожденных согласие было получено от их матерей). Демографические данные, полученные в результате анкетирования, и результаты исследования представлены и хранятся в анонимной (обезличенной) форме. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Исследование проведено в рамках темы государственного задания ИОГен РАН «Исследования полиморфизма на клеточном, организменном и популяционном уровне как основа создания генетических технологий».

Литература.

1. Цыбовский И.С., Веремейчик В.М., Котова С.А., Крицкая С.В., Евмененко С.А., Удина И.Г. Создание судебной референтной базы данных по 18 аутосомным STR для ДНК-идентификации в Республике Беларусь // Генетика. 2017. № 2. С. 249-258. DOI: 10.7868/S0016675817020138. (Tsybovskii I.S., Veremeichik V.M., Kotova S.A., Kritskaya S.V., Evmenenko S.A., Uдина I.G. Developing Forensic Reference Database by 18 Autosomal STR for DNA

- Identification in Republic of Belarus // Russian Journal of Genetics. 2017. V. 53. N. 2. P. 275–284. DOI: 10.1134/S1022795417020132)*
2. Willuweit S., Roewer L. The new Y chromosome haplotype reference database // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V.15. P. 43-48.
 3. Parson W., Dür A. EMPOP - a forensic mtDNA database // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007. V.1. No. 2. P. 88-92.
 4. Human Y-chromosome DNA haplogroup. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Human_Y-chromosome_DNA_haplogroup (дата обращения: 29.03.2024).
 5. Athey, T. W. Haplogroup prediction from Y-STR values using a Bayesian allele frequency approach. *J. Genet. Geneal.* 2006; 2:34–39.
 6. Удина И. Г., Грачева А. С., Курбатова О. Л. Научное и прикладное значение анализа изменчивости Y-хромосомы для криминалистики, этнодемографических исследований и исторических реконструкций // *Социальное пространство.* 2023. Т. 9. № 1. DOI: 10.15838/sa.2023.1.37.7 (Udina I.G., Gracheva A.S., Kurbatova O.L. Scientific and applied significance of the analysis of Y-chromosome variation for criminalistics, ethnodemographic studies and historical reconstructions // *Social Area.* 2023. V.9. N. 1. DOI: 10.15838/sa.2023.1.37.7)
 7. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Веремейчик В.М. Прудникова А.С., Атраментова Л.А., Цыбовский И.С., Удина И.Г. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов в связи с проблемой создания генетических баз данных // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 4. С. 513-522. DOI: 10.7868/S0016675813040085 (Kurbatova O.L., Pobedonostseva E.Y., Prudnikova A.S., Veremeichik V.V., Atramentova L.A., Tsybovskii I.S., Udina I.G. Genetic demography of populations of three megalopolises in relation to the problem of creating genetic databases // *Russian Journal of Genetics.* 2013. Т. 49. № 4. С. 448-456. doi. 10.1134/S102279541304008X)
 8. Курбатова О.Л., Янковский Н.К. Миграция – основной фактор популяционной динамики городского населения России // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 7. С. 831-851. (Kurbatova O.L., Yankovsky N.K. Migration as the Main Factor of the Russia's Urban Population Dynamics // *Russian J. Genetics.* 2016. V. 52. №7. - P. 726–745.) doi: 10.7868/S0016675816070067)
 9. Удина И. Г., Грачева А. С., Курбатова О. Л. Частоты гаплогрупп Y-хромосомы и процессы миграции в трех поколениях жителей Москвы // *Генетика.* 2022. Т. 58. №11. С. 1325-1333. DOI:10.31857/S001667582110121. (Udina I.G., Gracheva A.S. and Kurbatova O.L. Frequencies of Y-chromosome Haplogroups and Migration processes in three generations of Moscow Residents // *Russ. J. Genet.* 2022. Vol. 58. N 11. P. 1325-1333. DOI: 10.1134/s1022795422110114)
 10. Удина И. Г., Грачева А. С., Боринская С. А., Курбатова О. Л. Особенности распространения гаплогрупп Y-хромосомы в населении Санкт-Петербурга в связи с проблемой создания референтных баз данных // *Генетика.* 2023. Т. 59. № 11. С. 1319–1325. (Udina I. G., Gracheva A. S., Borinskaya S. A., and Kurbatova O. L. Distribution Peculiarities of Y-Chromosome Haplogroups in the Population of St. Petersburg in Connection with the Problem of Creation of Reference Databases // *Russian Journal of Genetics.* 2023. V. 59. N. 11. P. 1216–1221. ISSN 1022-7954. DOI: 10.1134/S1022795423110169)
 11. Udina I. G., Gubina M.A., Gracheva A. S. Distribution of 18 STR-Haplotypes of Y-Chromosome in Megacities in Connection with Creating Reference Databases. *Journal of Genetics and Genetic Engineering.* 2024. V. 6, 1, 16-19.
 12. Курбатова О.Л., Грачева А.С., Победоносцева Е.Ю., Удина И.Г. Генетико-демографические параметры населения г. Москвы. Миграционные процессы // *Генетика,* 2021. Т. 57. N. 12. С. 1438-1449. DOI: 10.31857/S0016675821120080 (Kurbatova O.L., Gracheva A.S., Pobedonostseva E.Yu., Udina I.G. Genetic and demographic parameters of the population of Moscow. Migration processes // *Russian Journal of Genetics,* 2021. V. 57. N. 12. P. 1443–1453. DOI: 10.1134/S1022795421120085)
 13. Курбатова О.Л., Удина И.Г., Грачева А.С., и др. Генетико-демографические параметры населения г. Санкт-Петербурга. Миграционные процессы // *Генетика,* 2019. Т. 55. № 9. С. 1071-1082. (Kurbatova O.L., Udina I.G., Gracheva A.S., et al. Genetic Demography of the Population of St. Petersburg: Migration Processes // *Russian Journal of Genetics.* 2019.V. 55. № 9. P. 1119-1129. DOI: 10.1134/S1022795419090084)
 14. Курбатова О.Л., Удина И. Г., Грачева А.С. и др. Генетико-демографические параметры населения г. Новосибирска // *Генетика,* 2018. Т. 54. Приложение. С. S74-S84. DOI: 10.1134/S0016675818130106

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

15. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на русской равнине. – М: Луч, 2007. – 416 с.
16. Балаганская О.А., Дамба Л.Д., Жабагин М.К., Агджоян А.Т., Юсупов Ю.М., Сабитов Ж.М., Богунов Ю.В., Балаганский А.Г., Султанова Г.Д., Долинина Д.О., Падюкова А.Д., Схалыхо Р.А., Маркина Н.В., Букин А.Г., Лавряшина М.Б., Балановская Е.В., Балановский О.П. Монгольский след в генофонде народов вдоль степной полосы Евразии // Современные проблемы науки и образования. 2016. №4. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24910> (дата обращения: 19.04.2024).
17. Карта географического распространения гаплогрупп Y-хромосомы на территории Евразии. URL: <https://i.imgur.com/4rsFqdk.jpg> (дата обращения: 29.03.2024).

Сведения об авторах

Удина Ирина Геннадьевна

д.б.н., доцент, г.н.с., рук. группы популяционной иммуногенетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

119991 Москва, ул. Губкина 3. <http://www.vigg.ru/>

Сл. тел. 8 (499) 1354226.

Моб. +7 9032774178

E-mail: irina_udina@mail.ru

Грачева Аlesia Сергеевна

к.б.н., с.н.с. лаборатории популяционной генетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Москва 119991, ул. Губкина д.3, ИОГен РАН. <http://www.vigg.ru/> Тел.сл. (499)1355111; Моб. +7 9150494412

E-mail: palesa@yandex.ru

Губина Марина Александровна

к.б.н., с.н.с. Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. Новосибирск, 630090, пр.ак. Лаврентьева, 10, <https://www.icgbio.ru/> тел. моб. +7 9139344328

E-mail: marina@bionet.nsc.ru

Васильев Юрий Анатольевич

ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины ФГБОУ ВО «Кубанский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России, Краснодар, 350063, ул. Седина, 4., <https://www.ksma.ru/> тел. +7 8612686229.

E-mail: yurii-59@mail.ru

Курбатова Ольга Леонидовна

д.б.н., г.н.с. лаборатории популяционной генетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Москва 119991, ул. Губкина д.3, ИОГен РАН. <http://www.vigg.ru/> Тел.сл. (499)1355111; Моб. +7 9150570962

E-mail: okurbat@list.ru

Information about author

Udina Irina Gennadyevna

doctor of biology sciences, chief researcher, head. of the group of population immunogenetics of Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, 119991, Gubkin Str., 3

E-mail: irina_udina@mail.ru

Gracheva Alesya Sergeevna

PhD, senior researcher of lab. population genetics of Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, 119991, Gubkin Str., 3

E-mail: palesa@yandex.ru

Gubina Marina Alexandrovna

PhD, senior researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva 10

E-mail: marina@bionet.nsc.ru

Vasiliev Yuri Anatolievich

assistant of the Department of public health, health and medical history of Kuban State Medical University, Krasnodar, 350063, Sedin Str., 4

E-mail: yurii-59@mail.ru

Kurbatova Olga Leonidovna

doctor of biology sciences, chief researcher of lab. population genetics of Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, 119991, Gubkin Str., 3

E-mail: okurbat@list.ru

ПРОТИВОАСТМАТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ ЗИЛЕУТОН ИНГИБИРУЕТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРАМИ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ, В МАКРОФАГАХ

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM показано, что специфический ингибитор 5-липоксигеназ – противоастматический агент зилеутон – значительно подавляет Ca^{2+} -ответы, индуцируемые иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном, в макрофагах. Полученные результаты свидетельствуют об участии 5-липоксигеназ в действии глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах, а также о нежелательности совместного применения в клинической практике препаратов глутоксим и моликсан и противоастматического агента зилеутона.

Ключевые слова: внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , перитонеальные макрофаги, глутоксим, моликсан, 5-липоксигеназы, зилеутон

L.S. Milenina¹, Z.I. Krutetskaya¹,
V.G. Antonov², N.I. Krutetskaya¹

¹Saint-Petersburg State University

² Saint-Petersburg State Pediatric
Medical University

ANTIASTHMATIC DRUG ZILEUTON INHIBITS Ca^{2+} RESPONSES, INDUCED BY IMMUNOMODULATORS GLUTOXIM AND MOLIXAN, IN MACROPHAGES

Using Fura-2AM microfluorimetry we have shown that 5-lipoxygenase specific inhibitor antiasthmatic agent zileuton significantly suppresses Ca^{2+} -responses induced by immunomodulators glutoxim and molixan in macrophages. The results suggest 5-lipoxygenase involvement in the effect of glutoxim and molixan on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages and indicate the inadvisability of a combined use in clinics of drugs glutoxim or molixan and antiasthmatic agent zileuton.

Key words: intracellular Ca^{2+} concentration, peritoneal macrophages, glutoxim, molixan, 5-lipoxygenases, zileuton

Введение.

Одной из основных систем поддержания редокс-статуса клетки является система глутатиона (глутатион/окисленный глутатион, GSH/GSSG). На основе GSSG синтезирован и введен в клиническую практику ряд препаратов, влияющих на редокс-статус клеток и вызывающих физиологически значимый эффект в организме человека и животных. Так, фармакологические аналоги окисленного глутатиона глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и моликсан® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина) используются как иммуномодуляторы и гемостимуляторы в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний, псориаза, лучевой и химиотерапии в онкологии [1]. Клинические исследования показали, что моликсан эффективен в профилактике и лечении коронавирусной инфекции COVID-19. Приводит к более быстрому регрессу тяжести заболевания в более легкую форму [2]. Однако тонкие молекулярные механизмы действия глутоксима и моликсана далеки от полного понимания и являются предметом активных исследований.

Ранее нами было впервые показано, что дисульфидсодержащие иммуномодуляторы глутоксим и моликсан увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргинчувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [3, 4].

В активации и функционировании иммунных клеток важную роль играет каскад

метаболизма полиненасыщенной арахидоновой кислоты [5, 6]. В макрофагах арахидоновая кислота окисляется преимущественно с участием циклооксигеназ и липоксигеназ [5, 6]. В функционировании перитонеальных макрофагов важную роль играют 5-липоксигеназы. Обнаружено, что 5-липоксигеназы и их продукты лейкотриены участвуют в патогенезе широкого спектра острых и хронических воспалительных заболеваний человека: астмы, атеросклероза, ревматоидного артрита, онкологических заболеваний и тяжелых пневмоний у пациентов с COVID-19 [7, 8].

Ферменты, принимающие участие в метаболизме арахидоновой кислоты, являются мишенями действия широкого спектра природных и синтетических фармакологических агентов. Такие соединения являются важным инструментом для исследования роли самой арахидоновой кислоты и продуктов её ферментативного окисления в процессах внутриклеточной сигнализации. Кроме того, в настоящее время многие фармакологические агенты, ингибирующие метаболизм арахидоновой кислоты, активно используются в медицине в терапии целого ряда воспалительных, аллергических и инфекционных заболеваний [7]. Так, давно известно, что продукты 5-липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты (лейкотриены) играют важную роль в патогенезе бронхиальной астмы [9]. Первым специфическим ингибитором 5-липоксигеназ, используемым для терапии хронической астмы, был препарат зилеутон (N-[1-(1-бензотиен-2-ил)этил]-N-гидроксимочевина, Zylflo®) [10]. Зилеутон уменьшает образование сульфидопептидных лейкотриенов и лейкотриена B₄, оказывает бронхорасширяющее действие и предупреждает развитие спазма бронхов, вызванного холодным воздухом и аспирином [11]. Зилеутон не предназначен для снятия острого приступа бронхиальной астмы, поскольку его действие развивается только через два дня после начала лечения. Кроме того, существуют данные об эффективности этого антилейкотриенового препарата в лечении угревой болезни (акне) и назального полипоза [12].

Для выявления участия 5-липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии глутоксида и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах и в регуляции процессов Ca^{2+} -сигнализации в макрофагах в целом, исследовали влияние специфического ингибитора 5-липоксигеназ антиастматического агента зилеутона на Ca^{2+} -ответы, вызываемые иммуномодуляторами глутоксидом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. Это и явилось **целью** настоящей работы.

Материалы и методы.

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20 - 22°C через 1 – 2 сут после начала культивирования клеток на автоматизированной установке для измерения $[Ca^{2+}]_i$ на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [13]. Статистический анализ проводили с применением критерия *t* Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [14].

Полученные результаты.

В контрольных экспериментах показали, что инкубация макрофагов в течение 25 мин с 100 мкг/мл глутоксида (рис. 1а) или 100 мкг/мл моликсана (рис. 2а) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Через 20 мин после добавления агентов $[Ca^{2+}]_i$ в среднем увеличивалась от базального уровня, равного 92 ± 15 , до 150 ± 21 нМ ($n = 6$; $p \leq 0,05$) для глутоксида и 148 ± 20 нМ ($n = 6$; $p \leq 0,05$) – для моликсана.

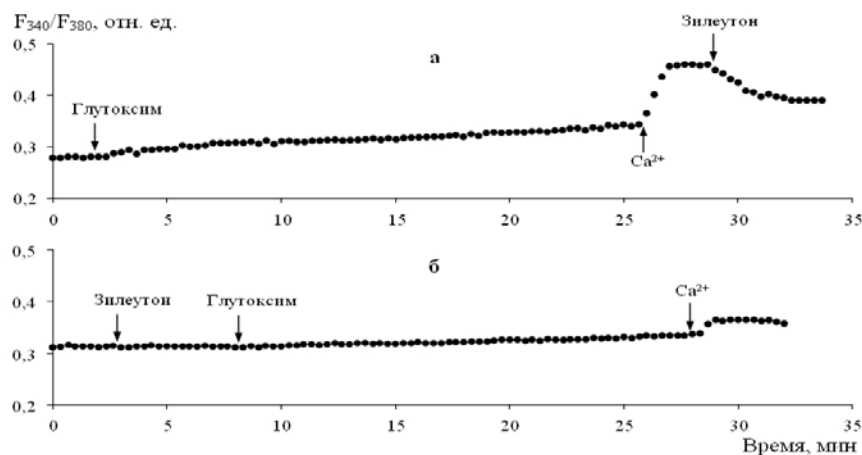


Рисунок 1. Влияние зилеутона на Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом в макрофагах.

Здесь и на рисунке. 2 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время.

(а) – клетки инкубировали в течение 25 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 4 мкМ зилеутона.

(б) – макрофаги преинкубировали в течение 5 мин с 1 мкМ зилеутона в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

При введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали дальнейшее повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1а, 2а). В среднем, увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 271 ± 24 нМ ($n = 6$; $p \leq 0,05$) для глутоксима и 235 ± 23 нМ ($n = 6$; $p \leq 0,05$) для моликсана.

В наших экспериментах впервые было обнаружено, что преинкубация макрофагов с 1 мкМ зилеутона в течение 5 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима (рис. 1б) или 100 мкг/мл моликсана (рис. 2б) приводит к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на $71,4 \pm 12,1$ %, $n = 7$; $p \leq 0,05$), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетки (на $65,6 \pm 11,5$ %, $n = 7$; $p \leq 0,05$), индуцируемых глутоксимом или моликсаном. Это свидетельствует о том, что 5-липоксигеназы и/или продукты окисления арахидоновой кислоты с участием этих ферментов играют важную роль в регуляции обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцируемых глутоксимом или моликсаном.

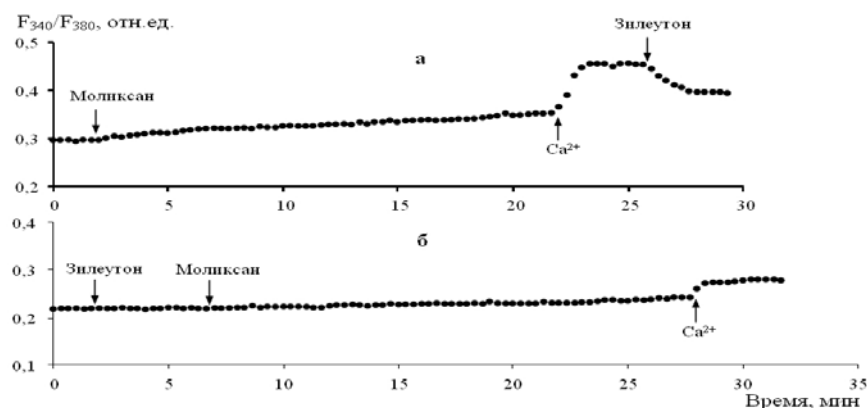


Рисунок 2. Влияние зилеутона на Ca^{2+} -ответы, вызываемые моликсаном в макрофагах

(а) – макрофаги инкубировали в течение 25 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 4 мкМ зилеутона.

(б) – клетки преинкубировали в течение 5 мин с 1 мкМ зилеутона в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

Показано также, что введение 4 мкМ zileutona на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+} вызывает быстрое и эффективное (на $62,1 \pm 8,2 \%$, $n = 7$; $p \leq 0,05$) подавление входа Ca^{2+} , индуцированного глутоксимом (рис. 1а) или моликсаном (рис. 2б). Можно предположить, что продукты окисления арахидоновой кислоты с участием 5-липоксигеназы играют важную роль не только в генерации, но и в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Заключение.

Таким образом, нами впервые показано, что ингибитор 5-липоксигеназы zileuton подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответов, индуцированных глутоксимом или моликсаном в макрофагах. Это согласуется с данными литературы о подавлении zileutonom (1 мкМ) Ca^{2+} -ответов в тучных клетках крыс [12, 15].

Результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют об участии 5-липоксигеназы и/или продуктов окисления арахидоновой кислоты с участием этих ферментов в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крыс, а также о нежелательности совместного применения в клинической практике антиастматического агента zileutona и дисульфидсодержащих иммуномодуляторов глутоксима и моликсана.

Литература.

1. Борисов А.Е., Кожемякин Л.А., Антушевич А.Е., Кетлицкая О.С., Кащенко В.А., Ченур С.В., Кацалуха В.В., Васюкова Е.Л., Новиченков А.О., Мотуцук И.Е. Клинико-экспериментальное обоснование регионарного и системного введения препаратов группы тиюпозтинов при циррозе печени // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. 2001. Т. 4. № 2. С. 32-38.
2. Dubina M.V., Gomonova V.V., Taraskina A.E., Vasilyeva N.V., Sayganov S.A. Pathogenesis-based pre-exposure prophylaxis associated with low risk of SARS-CoV-2 infection in healthcare workers at a designated COVID-19 hospital: a pilot study // 2021. *BMC Infect. Dis.* V. 21. P. 536. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06241-1>
3. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах // *Цитология*. 2008. Т. 50. № 5. С. 452 – 461.
4. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Влияние препарата моликсан на процессы Ca^{2+} -сигналикации в макрофагах // *Цитология*. 2011. Т. 53. № 9. С. 708.
5. Needleman P., Turk J., Jacksick B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. Arachidonic acid metabolism // *Annu. Rev. Biochem.* 1986. V. 55. P. 69 – 102.
6. Wang B., Wu L., Chen J., Dong L., Chen Ch., Wen Z., Hu J., Fleming I., Wang D.W. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets // *Signal Transduct. Targ. Ther.* 2021. V. 6: 94. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>
7. Zhang Y., Liu Y., Sun J., Zhang W., Guo Z., Ma Q. Arachidonic acid metabolism in health and disease // *MedComm*. 2023. V. 4. No. 5:e363. doi: 10.1002/mco2.363
8. Ayola-Serrano N.C., Roy N., Fathah Z., Anwar M.M., Singh B., Ammar N., Sah R., Elba A., Utt R.S., Pecho-Silva S., Rodriguez-Morales A.J., Dhama K., Quraishi S. The role of 5-lipoxygenase in the pathophysiology of COVID-19 and its therapeutic implications // *Inflammation Res.* 2021. V. 70. P. 877–889.
9. Montuschi P. Role of leukotrienes and leukotriene modifiers in asthma // *Pharmaceuticals*. 2010. V. 3. P. 1792-1811.
10. Wenzel S.E., Kamada A.K. Zileuton: the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma // *Ann. Pharmacother.* 1996. V. 30. P. 858-864.
11. Berger W., De Chandt M.T.M., Cairns C.B. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease // *Int. J. Clin. Pract.* 2007. V. 61. P. 663-676.
12. Di Capite J., Nelson C., Bates G., Parekh A.B. Targeting Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel channels and leukotriene receptors provides a novel combination strategy for treating nasal polypsis // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009. V. 124. P. 1014-1021
13. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 3440-3450.

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

14. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 16559 – 16566.
15. Di Capite J., Shirley A., Nelson C., Bates G., Parekh A.B. Intercellular calcium wave propagation involving positive feedback between CRAC channels and cysteinyl leukotrienes // FASEB J. 2009. V. 23. P. 894-905.

Сведения об авторах

Миленина Лидия Сергеевна

канд. биол. наук, доцент
доцент кафедры цитологии и гистологии
Санкт-Петербургский государственный
университет

Санкт-Петербург, Россия
Эл. почта: l.milenina@spbu.ru

Зоя Иринарховна Крутецкая

доктор биол. наук, профессор
профессор кафедры цитологии и гистологии,
Санкт-Петербургский государственный
университет

Санкт-Петербург, Россия,
Эл. почта: z.krutetskaya@spbu.ru

Виктор Георгиевич Антонов

доктор мед. наук
профессор кафедры биохимии
Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет

Санкт-Петербург, Россия
Эл. почта: mulit7@mail.ru

Нина Иринарховна Крутецкая

инженер кафедры цитологии и гистологии
Санкт-Петербургский государственный
университет

Санкт-Петербург, Россия
Эл. почта: n.krutetskaya@spbu.ru

Information about author

Lidiya Sergeevna Milenina

Ph(D) (Biol.), Associate Professor
Associate Professor of the Department of Cytology and His-
tology

Saint-Petersburg State University
Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: l.milenina@spbu.ru

Zoya Irinarhovna Krutetskaya

Doctor of Science (Biol.), professor
Professor of the Department of Cytology and Histology
Saint-Petersburg State University
Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

Victor Georgievich Antonov

Doctor of Science (Med.)
Professor of the Department of Biochemistry
Saint-Petersburg State Pediatric Medical University
Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: mulit7@mail.ru

Nina Irinarhovna Krutetskaya

Engineer of the Department of Cytology and Histology
Saint-Petersburg State University
Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: n.krutetskaya@spbu.ru

УДК 576.32/36
ГРНТИ 34.17.00
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.78-83

**А.В. Мельницкая¹, З.И. Крутецкая¹,
В.Г. Антонов²**

¹Санкт-Петербургский государственный университет

²Санкт-Петербургский государственный
педиатрический медицинский университет

**ДИСУЛЬФИДСОДЕРЖАЩИЕ АНАЛОГИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА МОДУ-
ЛИРУЮТ ТРАНСПОРТ Na⁺ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ**

*В работе рассматривается влияние окисленного глутатиона (GSSG) и его фармакологиче-
ских аналогов – дисульфидсодержащих иммуномодуляторов глутоксима и моликсана на
транспорт Na⁺ в эпителии кожи лягушки. С использованием метода фиксации потенциала
показано, что приложение GSSG, глутоксима и моликсана со стороны апикальной поверх-
ности кожи подавляет транспорт Na⁺, тогда как при добавлении со стороны базолате-
ральной поверхности все исследуемые агенты имитируют действие инсулина и*

стимулируют транспорт Na^+ . Полученные результаты свидетельствуют о том, что GSSG и его фармакологические аналоги – глутоксим и моликсан сходным образом модулируют транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки.

Ключевые слова: GSSG, глутоксим, моликсан, транспорт Na^+ , эпителий кожи лягушки.

A.V. Melnitskaya¹, Z.I. Krutetskaya¹, V.G. Antonov²

¹Saint-Petersburg State University, ²Saint-Petersburg State Pediatric Medical University

DISULFIDE-CONTAINING OXIDIZED GLUTATHIONE ANALOGUES MODULATE Na^+ TRANSPORT IN FROG SKIN EPITHELIUM

The effect of oxidized glutathione (GSSG) and its pharmacological analogues – disulfide-containing immunomodulators glutoxim and molixan, on Na^+ transport in frog skin epithelium was studied. Using voltage-clamp technique, we have shown that GSSG, glutoxim and molixan application from apical skin surface suppresses Na^+ transport, while when added from the basolateral surface, all agents studied mimic the effect of insulin and stimulate Na^+ transport. The results obtained indicate that GSSG and its pharmacological analogues glutoxim and molixan unidirectionally modulate Na^+ transport in frog skin epithelium.

Keywords: GSSG, glutoxim, molixan, Na^+ transport, frog skin epithelium.

Введение

Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны являются кожа и мочевой пузырь амфибий. Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие различные Na^+ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки, которые являются мишенью для окислительного стресса. Многочисленные остатки цистеина, локализованные в различных сегментах этих белков, определяют их редокс-чувствительность и являются мишенью для действия внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов. Важнейшую роль в редокс-регулируемых внутриклеточных сигнальных путях играют эндогенные системы глутатиона. Глутатион (γ -глутамилцистеинилглицин) является универсальным тиолсодержащим трипептидом, обнаруженным в большинстве клеток растений, микроорганизмов и млекопитающих. Глутатион предотвращает окисление SH-групп или восстанавливает S-S связи, индуцированные окислительным стрессом, инактивирует свободные радикалы, участвует в детоксикации токсических ксенобиотиков (лекарственных веществ, канцерогенов) [1], участвует в активации транскрипции генов, в том числе некоторых антиоксидантных ферментов, а также ингибировании редокс-зависимых путей активации апоптоза; входит в систему детоксикации и антиоксидантной защиты, предупреждения и ограничения окислительного стресса [2]. На основе дисульфидсодержащих окисляющих агентов был синтезирован и успешно применён в клинической практике целый ряд фармакологических препаратов, которые были объединены в группу тиопозтинов, характеризующихся системным цитопротекторным эффектом. Фармакологические аналоги окисленного глутатиона (GSSG) — глутамил-цистеинил-глицин динатрия (Глутоксим® — динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и инозина глицил-цистеинил-глутамат динатрия (Моликсан® — комплекс Глутоксима и нуклеозида инозина, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург), используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [2, 3]. Эти препараты оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие молекулярные механизмы их действия далеки от полного понимания. Также практически не изучено влияние окислителей и восстановителей на транспорт Na^+ в нативных эпителиальных

системах, таких как эпителий кожи лягушки.

Цель работы.

Цель исследования — изучение влияния окисленного глутатиона (GSSG) и его фармакологических аналогов — дисульфидсодержащих иммуномодуляторов глутоксима® и моликсана® на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки.

Материалы и методы.

Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга («World Precision Instruments, Inc.», Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в мМ): 110 NaCl, 2,5 KCl, 3 CaCl₂, 5 Tris HCl, pH 7,4. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23 °C).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ). Для измерения ВАХ на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями ВАХ трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при трансэпителиальном токе $I_T = 0$). Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$), V_{OC} и трансэпителиальную проводимость g_T . Транспорт Na^+ оценивали как амилорид-чувствительный I_{SC} .

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточный раствор амилорида (10 мМ) готовили на воде. Глутоксим и моликсан предоставлены фирмой «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург. Маточный раствор глутоксима и моликсана (50 мг/мл) готовили на воде. Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной поверхности кожи лягушки.

Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $\bar{x} \pm s_x$. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. На рисунке приведены результаты типичных экспериментов.

Полученные результаты.

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: $I_{SC} = 16,34 \pm 2,81$ мкА; $V_{OC} = -29,32 \pm 5,08$ мВ; $g_T = 0,36 \pm 0,02$ мСм. Изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления GSSG, глутоксима или моликсана в концентрации 200 мкг/мл к апикальной поверхности кожи было следующим: I_{SC} уменьшился на $35,29 \pm 5,04$, $30,27 \pm 4,17$ и $29,19 \pm 5,33$ %, V_{OC} уменьшился на $36,14 \pm 9,02$, $33,28 \pm 4,32$ и $28,42 \pm 13,11$ %, а g_T уменьшилась на $3,01 \pm 0,19$, $3,16 \pm 0,24$ и $8,11 \pm 1,03$ %, для GSSG, глутоксима и моликсана, соответственно. В случае обработки GSSG, глутоксимом или моликсаном базолатеральной поверхности кожи лягушки изменение электрических характеристик, в среднем, было следующим: I_{SC} увеличился на $40,31 \pm 12,35$, $37,29 \pm 11,14$ и $34,26 \pm 4,18$ %, V_{OC} увеличился на $44,97 \pm 16,78$, $40,37 \pm 14,01$ и $41,32 \pm 9,12$ %, а g_T — на $3,08 \pm 0,16$, $2,12 \pm 0,14$ и $7,28 \pm 3,11$ %, для GSSG, глутоксима и моликсана, соответственно. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние GSSG, глутоксима и моликсана на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рис. 1а, б).

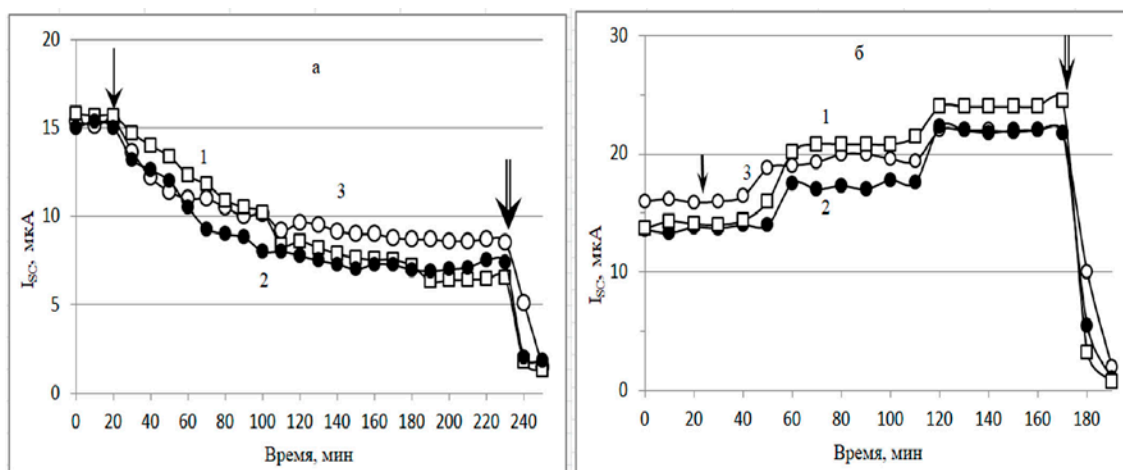


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания – I_{sc} через кожу лягушки после приложения к апикальной (а) или базолатеральной (б) поверхности кожи лягушки окисленного глутатиона (GSSG) – 1 и его фармакологических аналогов – дисульфидсодержащих иммуномодуляторов глутоксима – 2 и моликсана – 3. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) – амилорид. Одинарной стрелкой обозначен момент добавления дисульфидсодержащих окисляющих агентов в концентрации 200 мкг/мл, двойной – момент добавления амилорида в концентрации 20 мкМ.

Обработка апикальной поверхности кожи лягушки GSSG и его фармакологическими аналогами подавляет транспорт Na^+ (рис. 1а). Наиболее вероятно предположить, что ингибирующее влияние указанных окисляющих агентов может быть связано с их способностью взаимодействовать с функционально значимыми остатками цистеина Na^+ -транспортирующих белков, что приводит к ингибированию их активности и подавлению транспорта Na^+ . Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC), играющие ключевую роль в транспорте Na^+ в реабсорбирующих эпителиях, и другие Na^+ -транспортирующие белки быстро и обратимо ингибируются агентами, окисляющими SH-группы остатков цистеина [4, 5]. Кроме того, с использованием метода локальной фиксации потенциала на альвеолярных клетках I и II типа крысы было показано, что GSSG в микромолярных концентрациях снижает вероятность открытого состояния ENaC, экспрессируемых в апикальных мембранах пневмоцитов, а также приводит к снижению клиренса альвеолярной жидкости в экспериментах *in vivo*. В данном исследовании продемонстрировано также, что сдвиг окислительно-восстановительного потенциала к более окисленному состоянию при добавлении GSSG вызывает обратимое снижение активности ENaC, которое можно устранить с помощью добавления восстановленного глутатиона (GSH). Более того, за это изменение активности ENaC ответственна прямая обратимая модификация ENaC с помощью GSSG (S-глутатионилирование субъединиц ENaC). В целом, эти результаты показывают, что обратимое S-глутатионилирование субъединиц ENaC может играть важную роль в регуляции баланса жидкости в легких [6].

В то же время, GSSG, глутоксим и моликсан, приложенные со стороны базолатеральной поверхности кожи, стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ (рис. 1б). Полученные результаты согласуются с данными литературы о способности GSSG и его фармакологических аналогов оказывать рецептор-опосредованное влияние на клеточные процессы. Так, в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431, GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию (лиганд-независимую активацию) рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности [7, 8]. Также, нами ранее было показано, что в случае приложения к базолатеральной поверхности кожи лягушки, GSSG и глутоксим действуют как инсулиномиметики и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ [9]. Можно предположить, что GSSG и его фармакологические аналоги моликсан и глутоксим могут взаимодействовать с богатыми цистеином экстраклеточными доменами α -

субъединиц инсулинового рецептора, вызывать трансактивацию рецептора и запускать сигнальный каскад, приводящий к активации Na^+ -транспортирующих белков и стимуляции транспорта Na^+ .

Выводы.

Таким образом, в настоящей работе показано модулирующее влияние окисленного глутатиона (GSSG) и его фармакологических аналогов – дисульфидсодержащих иммуномодуляторов глутоксима и моликсана на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что GSSG, глутоксим и моликсан однонаправленно модулируют транспорт Na^+ в коже лягушки. Можно предположить, что влияние этих дисульфидсодержащих окислителей на транспорт Na^+ опосредовано сходными регуляторными механизмами.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются данные о влиянии GSSG, глутоксима и моликсана на трансэпителиальный транспорт Na^+ , которые способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов действия этих дисульфидсодержащих окисляющих агентов, широко применяемых в клинической практике в качестве препаратов, обладающих иммуномодулирующим, гемопозитическим и гепатопротекторным действием, а также для смягчения окислительного стресса и купирования процессов воспаления. Кроме того, обнаружение новых соединений, влияющих на трансэпителиальный транспорт Na^+ и активность Na^+ -транспортирующих белков, актуально для биомедицинских исследований многих патологических процессов и является предпосылкой для разработки новых фармакологических средств для терапии подобных состояний.

Литература.

1. Hayes J.D., McLellan L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress // *Free Rad. Research*. 1999. V. 31. No. 4. P. 273–300.
2. Uys J.D., Mulholland P.J., Townsend D.M. Glutathione and redox signaling in substance abuse // *Biomed Pharmacother*. 2014. V. 68. No. 6. P. 799-807.
3. Borisov A.E., Kozhemyakin L.A., Antushevich A.E., Ketliskaya O.S., Kashchenko V.A., Chepur S.V., Katsalucha V.V., Vasyukova E.L., Novichenkov A.O., Motushchuk I.E. Clinical and experimental grounds of the regional and systemic administration of the thiopoetin group medicines for cirrhosis of the liver // *Vestn. hirurgii im. I.I. Grekova*. 2001. V. 4. No. 2. P. 32 - 38.
4. Kellenberger S., Gautschi I., Pfister Y., Schild L. Intracellular thiol-mediated modulation of epithelial sodium channel activity // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. P. 7739 – 7747.
5. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress // *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1997. V. 834. P. 666–668.
6. Downs C.A., Kreiner L., Zhao X.M., Trac P., Johnson N.M., Hansen J.M., Brown L.A., Helms M.N. Oxidized glutathione (GSSG) inhibits epithelial sodium channel activity in primary alveolar epithelial cells // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 2015. V. 308. No. 9: L943-52.
7. Vasilenko K.P., Burova E.B., Antonov V.G., Nikolskii N.N. Oxidized glutathione induces activation of the epidermal growth factor receptor and MAP kinases ERK 1, 2 // *Tsitol*. 2006. V. 48. No. 6. P. 500-507.
8. Burova E.B., Vasilenko K.P., Antonov V.D., Nikolskii N.N. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim in A431 cells // *Dokl. Biol. Sci*. 2005. V. 404. P. 392-394.
9. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide-containing agents on the Na^+ transport in the frog skin // *Dokl. Biol. Sci*. 2008. V. 421. P. 235-238.

Сведения об авторах

Анастасия Валерьевна Мельницкая

канд. биол. наук, доцент

доцент кафедры цитологии и гистологии

Санкт-Петербургский государственный университет

Санкт-Петербург, Россия

Эл. почта: a.melnitskaya@spbu.ru

Information about author

Anastasiya Valerievna Melnitskaya

Ph(D) (Biol.), Associate Professor

Associate Professor of the Department of Cytology and Histology

Saint-Petersburg State University

Saint-Petersburg, Russian Federation

E-mail: a.melnitskaya@spbu.ru

Зоя Иринарховна Крутецкая

доктор биол. наук, профессор
профессор кафедры цитологии и гистологии
Санкт-Петербургский государственный университет

Санкт-Петербург, Россия

Эл. почта: z.krutetskaya@spbu.ru

Виктор Георгиевич Антонов

доктор мед. наук
профессор кафедры биохимии
Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

Санкт-Петербург, Россия

Эл. почта: mulit7@mail.ru

Zoya Irinarhovna Krutetskaya

Doctor of Science (Biol.), professor
Professor of the Department of Cytology and Histology
Saint-Petersburg State University
Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

Victor Georgievich Antonov

Doctor of Science (Med.)
Professor of the Department of Biochemistry
Saint-Petersburg State Pediatric Medical University
Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: mulit7@mail.ru

УДК 577.12

ГРНТИ 76.03

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.83-87

**А.А.Ш. Хасан¹, Е.В. Калинина¹, Ю.Л. Володина², А.С. Петрова¹,
Д.Д. Жданов³, А.А. Штиль², В.В. Татарский⁴**

¹Российский университет дружбы народов имени
Патриса Лумумбы

²НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России

³Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им.
В.Н. Ореховича

⁴Институт биологии гена РАН

**ОБРАЩЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИСПЛАТИНУ ПРИ
ДЕЙСТВИИ КВЕРЦЕТИНА**

В статье обсуждается влияние растительного полифенола кверцетина на устойчивость клеток аденокарциномы яичников SKOV-3 к противоопухолевому препарату цисплатину. Представлены данные, показывающие, что «обращение» лекарственной устойчивости опухолевых клеток, вызываемое кверцетином, связано с подавлением экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов и сигнального пути PI3K/Akt/mTOR.

Ключевые слова: кверцетин, лекарственная резистентность опухолевых клеток, антиоксидантная система, сигнальный путь PI3K-Akt-mTOR, цисплатин.

**A.A. Hasan¹, E.V. Kalinina¹, V. Yu.L. Volodina², A.S. Petrova¹,
D.D. Zhdanov³, A.A. Shtil², V.V. Tatarskiy⁴**

¹Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)

²Blokhin National Medical Research Center of Oncology

³Research Institute of Biomedical Chemistry

⁴Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences

REVERSAL OF CANCER CELL RESISTANCE TOWARDS CISPLATIN BY QUERCETIN

Quercetin overcomes cisplatin resistance in SKOV-3 ovarian cancer cells by decreasing key anti-oxidant enzymes expression and suppressing the PI3K/Akt/mTOR pathway, thereby weakening cell defenses and disrupting survival, which may improve cisplatin sensitivity.

Key words: quercetin, drug resistance of tumor cells, antioxidant system, PI3K-Akt-mTOR signaling pathway, cisplatin

Введение.

Кверцетин (3,3',4',5,7-пентагидроксифлавонон) - растительный флавоноид, обладающий противовоспалительным, кардиопротективным, антиатеросклеротическим действием и вызывающим противоопухолевые эффекты [1, с. 1-7]. Влияние кверцетина на опухолевые клетки имеет двойственный характер. За счёт наличия ОН-групп в В- и С-кольцах флавонового ядра, которые образуют два антиоксидантных фармакофора (рис. 1, а), кверцетин выполняет роль "ловушки" свободных радикалов; повышенное число ОН-групп в ароматическом В-кольце делает кверцетин более сильным антиоксидантом по сравнению с другими флавоноидами [2, с. 246]. Антиоксидантное действие кверцетина может вызывать снижение уровня АФК в опухолевых клетках. Так, антипролиферативное действие кверцетина на клетки гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 связано со снижением внутриклеточного уровня АФК [3, с. 864-867]. Однако кверцетин может оказывать и прооксидантный эффект на опухолевые клетки, в частности посредством образования семихинонного радикала и истощения пула восстановленного глутатиона, что приводит к окислительному стрессу и гибели клеток [4, с. 11]. Значительный интерес представляет исследование влияния кверцетина на сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR, который рассматривается в качестве важного механизма резистентности опухолевых клеток, так как контролирует пролиферацию, выживаемость, метаболизм, подвижность клеток и ответы на стресс [5, с. 2]. Несмотря на многочисленные данные, механизм его редокс-зависимой регуляции всё ещё остаётся малоизученным.

Цель работы заключалась в исследовании влияния кверцетина на устойчивость клеток аденокарциномы яичников SKOV-3 и изогенной сублинии SKOV-3/CDDP к противоопухолевому препарату цисплатину, в том числе на клеточный цикл, экспрессию генов киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR и ключевых антиоксидантных ферментов.

Материалы и методы.

В работе использована клеточная линия аденокарциномы яичника SKOV-3 и её сублинии SKOV-3/CDDP, устойчивая к цисплатину. Проведена оценка экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени (RT-qPCR), оценка статуса клеточного цикла с использованием проточной цитометрии и определение цитотоксичности с помощью МТТ-теста.

Полученные результаты.

Действие кверцетина вызывает зависимое от концентрации и времени инкубации снижение жизнеспособности как родительских, так и устойчивых к CDDP клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 (рис. 1).

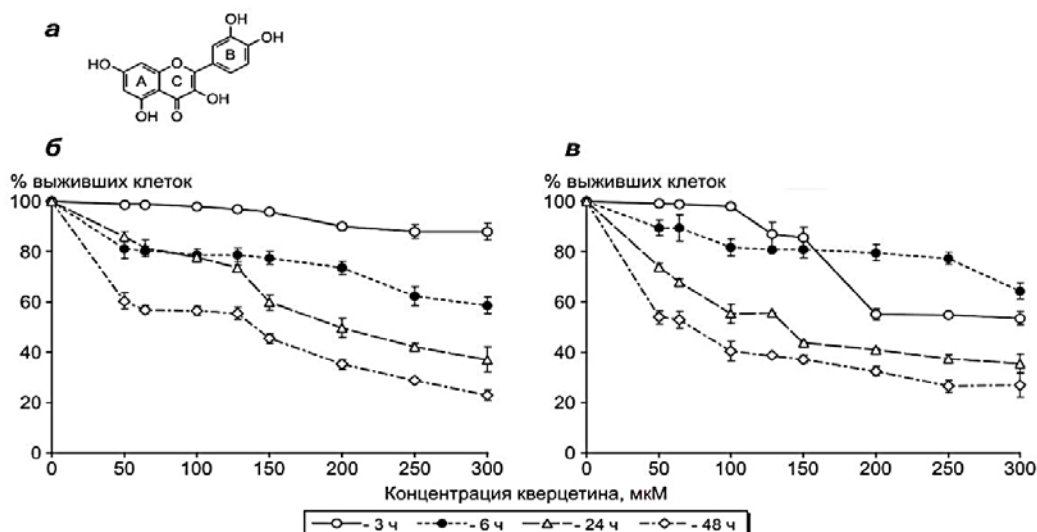


Рис. 1. Влияние кверцетина (а) на пролиферацию чувствительных (б) и резистентных (в) к цисплатину клеток SKOV-3 в зависимости от концентрации и времени инкубации.

24 ч. В концентрации 15 мкМ кверцетин практически не влиял на распределение фаз цикла клеток SKOV-3, однако повышал долю клеток SKOV-3/CDDP в S-фазе (рис. 2, а, б). Повышение концентрации кверцетина (100 мкМ) приводило к более выраженным изменениям в обеих сублиниях: росту доли гибнущих клеток SKOV-3 (>25% клеток с фрагментированной ДНК; subG1) и значительному накоплению клеток SKOV-3/CDDP в G1- и S-фазах (рис. 2, в, г).

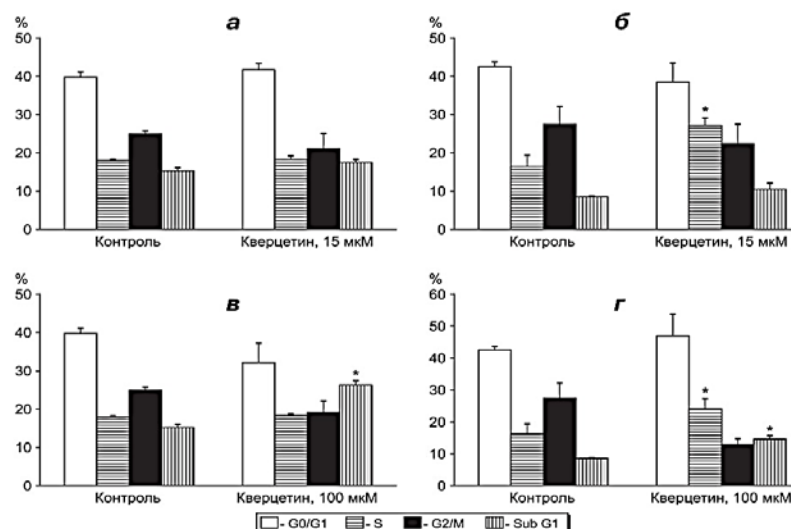


Рис. 2. Распределение фаз цикла клеток SKOV-3 (а, в) и SKOV-3/CDDP (б, г) при действии 15 (а, б) и 100 (в, г) мкМ кверцетина.

* $p < 0.05$ по сравнению с соответствующим контролем без кверцетина.

Оценка экспрессии генов протеинкиназ **PI3K/Akt/mTOR** в клетках SKOV-3 и SKOV-3/CDDP позволила установить, что формирование устойчивости сопровождается значительным повышением мРНК **PI3K, Akt и mTOR**. Напротив, действие кверцетина (100 мкМ, 24 ч) приводит к резкому снижению экспрессии этих генов в сублинии SKOV-3/CDDP по сравнению с клетками SKOV-3, у которых обнаружено повышение их экспрессии (рис. 3, а).

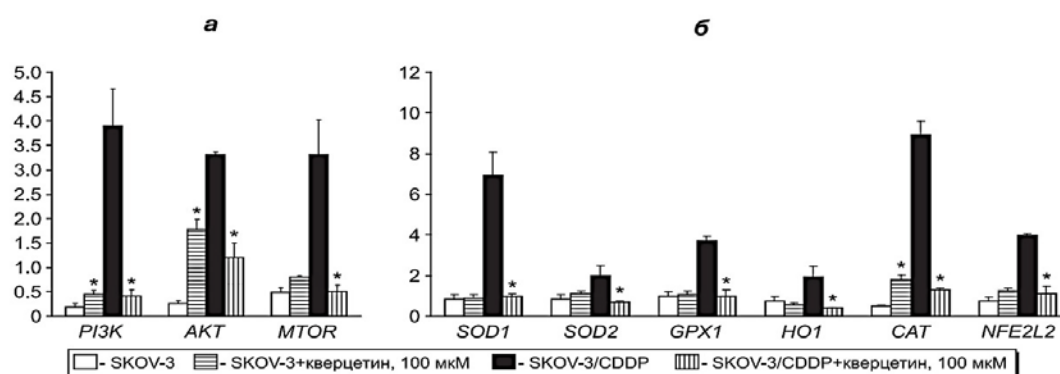


Рис. 3. Влияние кверцетина (100 мкМ, 24 ч) на экспрессию генов киназ сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (а), антиоксидантных ферментов (SOD1, SOD2, CAT, GPX1, HO-1) и транскрипционного фактора Nrf2 (б) в клетках SKOV3 и SKOV3/CDDP.

Кверцетин не только подавлял экспрессию генов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR в резистентных клетках, но и снижал экспрессию генов ключевых антиоксидантных ферментов Cu,Zn- и Mn-СОД, глутатионпероксидазы 1, гемоксигеназы 1, каталазы (SOD1, SOD2, GPX1, HO1, CAT) и гена транскрипционного фактора Nrf2 (NFE2L2) (рис. 3, б), контролирующего их экспрессию [6, с. 725]. Напротив, в клетках SKOV3 не обнаружено достоверных изменений уровней мРНК этих генов, кроме гена каталазы, экспрессия которого повышена.

Выводы.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: цитотоксическое действие кверцетина на клетки аденокарциномы яичников SKOV-3 и изогенной сублинии SKOV-3/CDDP связано с противоположным характером влияния на антиоксидантную систему и сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR: их подавлением в резистентных клетках и активацией в родительских.

Литература.

1. Batiha G.E., Beshbishy A.M., Ikram M., Mulla Z.S., ElHack M.E.A., Taha A.E., Algammal A.M., Elewa Y.H.A. The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin // *Foods*. 2020. No. 9 (3). ID 374.
2. Azeem M, Hanif M, Mahmood K, Ameer N, Chughtai FRS, Abid U. An insight into anticancer, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-inflammatory effects of quercetin: a review. // *Polym Bull (Berl)*. 2023. No. 80 (1). P. 241-262.
3. Jeon J.S., Kwon S., Ban K., Kwon Hong Y., Ahn C., Sung J.S., Choi I. Regulation of the Intracellular ROS Level Is Critical for the Antiproliferative Effect of Quercetin in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2 // *Nutr. Cancer*. 2019. No. 71(5). P. 861-869.
4. Slika H., Mansour H., Wehbe N., Nasser S.A., Iratni R., Nasrallah G., Shaito A., Ghaddar T., Kobeissy F., Eid A.H. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms // *Bio-med. Pharmacother*. 2022. No. 146. ID 112442.
5. Koundouros N., Poulogiannis G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer // *Front. Oncol*. 2018. No. 8. ID 160.
6. Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R. Nrf2- Keap1 signaling in oxidative and reductive stress // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res*. 2018. No. 1865(5). P. 721-733.

Сведения об авторах

Хасан Асиль Али Шехадех

аспирант

**Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы (РУДН)**

Москва, Россия

Эл. почта: ali.aseel.hasan@gmail.com

Калинина Елена Валентиновна

д.б.н., профессор

профессор кафедры биохимии

**Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы» (РУДН)**

Москва, Россия

Эл. почта: kalinina-ev@rudn.ru

Володина Юлия Леонидовна

научный сотрудник лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России

Москва, Россия, Эл. почта: uvo2003@mail.ru

Петрова Альбина Сергеевна

к.б.н., ассистент кафедры биохимии

**Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы» (РУДН)**

Москва, Россия

Эл. почта: albina.s.petrova@yandex.ru

Жданов Дмитрий Дмитриевич

д.б.н., заведующий лабораторией медицинской биотехнологии

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им В.Н. Ореховича (ИБМХ), Москва, Россия

Эл. почта: zhdanovdd@mail.ru

Information about author

Hasan Aseel Ali Shehadeh

postgraduate student

Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)

Russian Federation

E-mail: ali.aseel.hasan@gmail.com

Kalinina Elena Valentinovna

Doctor of Science (Biol.), Professor

Professor of Biochemistry Department

Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)

Russian Federation

E-mail: kalinina-ev@rudn.ru

Volodina Yulia Leonidovna

Researcher of Laboratory of Tumor Cell Death

Blokhin National Medical Research Center of Oncology

Russian Federation

E-mail: uvo2003@mail.ru

Petrova Albina Sergeevna

PhD (Biol)

assistant of Biochemistry Department

Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)

Russian Federation, E-mail: albina.s.petrova@yandex.ru

Zhdanov Dmitry Dmitrievich

Doctor of Science (Biol.), Head of the Laboratory of Medical Biotechnology

Research Institute of Biomedical Chemistry, VN Orekhovich

Russian Federation, E-mail: zhdanovdd@mail.ru

Штиль Александр Альбертович

д.м.н., заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России

Москва, Россия

Эл. почта: shtilaa@yahoo.com

Татарский Виктор Вячеславович

к.б.н., доцент

заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии

Институт биологии гена РАН (ИБГ РАН)

Москва, Россия

Эл. почта: tatarskii@gmail.com

Shtil Alexander Albertovich

Doctor of Medical Science (DMS), Head of Laboratory of Tumor Cell Death

Blokhin National Medical Research Center of Oncology Russian Federation

E-mail: shtilaa@yahoo.com

Tatarskiy Victor Vyacheslavovich

PhD (Biol),

Head of Laboratory of Molecular Oncobiology Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences

Russian Federation

E-mail: tatarskii@gmail.com

УДК 575.17:599.9
ГРНТИ 760 000
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.87-90

**Е.Ю. Плотникова, Ю.Ю. Васильев, А.И. Корякина,
И. А. Куликова**
ГБУЗ Родильный дом г. Краснодар МЗ КК
Кубанский государственный медицинский университет, г.
Краснодар

РОЛЬ ВИТАМИНОВ И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ НАХОДЯЩИХСЯ НА ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ПИТАНИИ

Витамины и микроэлементы играют незаменимую роль в развитии плода и ребенка в постнатальном периоде. Настоящее исследование посвящено анализу состава и баланса парентерального питания новорожденных с акцентом на оптимальные концентрации витаминов и минералов.

Ключевые слова: витамины, микроэлементы, парентеральное питание, новорожденные

UDC 575.17:599.9
GRNTI 760 000

E.Y. Plotnikova, Yu. Vasiliev, A.I. Koryakina, I.A. Kulikova
GBUZ Maternity hospital Krasnodar MH KK
Kuban State Medical University, Krasnodar

THE ROLE OF VITAMINS AND TRACE ELEMENTS IN NEWBORNS ON PARENTERAL NUTRITION

The role of vitamins and trace elements in the development of the fetus and newborn is undeniable. This work analyzes the quantitative and qualitative aspects of parenteral nutrition of newborns, focusing on the optimal content of vitamins and trace elements.

Keywords: vitamins, trace elements, parenteral nutrition, newborns

Введение.

Грудное вскармливание, несмотря на относительно низкое содержание витаминов и микроэлементов в молоке, обеспечивает оптимальное питание новорожденного, особенно в первые месяцы жизни. Эта уникальная биологическая жидкость играет ключевую роль в развитии всех систем организма, и дефицит грудного молока чреват задержкой роста, анемией, иммунодефицитами и дисфункциями органов, особенно у недоношенных детей [1, 2]. Оптимальное развитие плода и новорожденного напрямую зависит от своевременного и

достаточного поступления витаминов и микроэлементов. В условиях стационарного парентерального питания, баланс макро- и микронутриентов становится фактором, определяющим выживаемость и дальнейшее развитие ребенка [3-5]. На сегодняшний день современная витаминология и микроэлементология продолжает совершенствоваться в создании методической базы по оценке витаминнообеспечения детского и взрослого населения, анализируется взаимосвязь накопления витаминов и уровня их концентрации в биологических средах организма (концентрация в плазме крови, в головном и спинном мозге, в эритроцитах, лейкоцитах). В случае, когда проведение энтерального питания невозможно или ограничено, необходимо назначение парентеральной формы данных компонентов [1].

Цель работы.

На примере концентрации отдельных витаминов в организме у новорожденных, а также у недоношенных детей с низкой и очень низкой массой тела при рождении, можно проследить взаимосвязь развития патологических состояний.

Материалы и методы.

Анализ литературы, находящейся в общем доступе, относительно данной темы исследования.

Полученные результаты.

Одним из распространенных осложнений у новорожденных, независимо от срока гестации, связанным с недостатком витаминов и микроэлементов, является неонатальный сепсис. Он остается одной из главных причин развития осложнений и летальности из-за незрелой иммунной системы [6]. По мнению T.S. Gamal и соавт. [7] изучавших уровни метаболита витамина D в сыворотке крови у младенцев с начальной стадией сепсиса, имели более низкий уровень витамина D, в сравнении со здоровыми новорожденными, что приводило к более быстрому и тяжелому течению сепсиса за счет снижения количества макрофагов и увеличивается продукция провоспалительных цитокинов. Недостаток витамина E в результате отсутствия полноценного грудного вскармливания может приводить к развитию гемолитической анемии. Обладающий антиоксидантным эффектом токоферол улучшает функцию печени, снижает уровень билирубина, к всему прочему проявляя свой гепатопротекторный эффект.

Витамин K – играет центральную роль в гемостазе, контролируя выработку протромбина и ключевых факторов свертывания (II, VII, IX, X), одновременно участвуя в минерализации костной ткани. Его недостаток у новорожденных чреват угрожающими жизни кровоизлияниями в головной мозг, ЖКТ и других органах (рекомендованная парентеральная доза: 80 мкг/кг/сут, ААР). Аскорбиновая кислота (витамин C) – не просто строительный материал соединительной ткани (коллаген), но и необходимый компонент нейротрансмиссии, иммунной защиты и множества ферментативных реакций, при этом эффективно нейтрализуя свободные радикалы. Современные пищевые привычки увеличивают потребность в витамине C (рекомендованная доза: 15–25 мг/кг/сут). Наконец, тиамин (B1), регулирующий метаболизм углеводов и липидов, необходим в дозах, диктуемых составом парентерального питания. Недостаток витамина B1 у детей, особенно получающих искусственное питание, может привести к серьезным метаболическим дисбалансам, вплоть до кислотно-щелочного нарушения. Рекомендуемая суточная доза при внутривенном введении составляет 200–350 мкг на килограмм массы тела. Рибофлавин (B2), играющий ключевую роль в клеточном энергообеспечении и тесно связанный с белковым обменом, оценивается по сывороточным концентрациям и активности глутатионредуктазы в красных кровяных клетках. Его дефицит проявляется воспалением слизистых, стоматитами, кожными поражениями, нарушениями зрения и малокровием (рекомендованная доза: 0,15–0,2 мг/кг/сут). Дефицит Пиридоксина (B6) у новорожденных приводит к генерализованным дерматитам, анемиям, судорожной готовности, иммуносупрессии и энцефалопатии [8] (рекомендованная доза: 0,15–0,2 мг/кг/сут). Кобаламин (B12), необходимый для синтеза ДНК, при дефиците может вызывать нейродегенеративные процессы и повреждение нервной ткани. Новорожденные, получающие внутривенное питание, особенно после хирургического удаления части тонкой кишки, подвержены значительно повышенному риску дефицита витамина B12, что проявляется неврологическими и

кровотворными расстройствами. Рекомендуемая доза: 0,6 мкг/кг массы тела. Для компенсации этого риска, а также обеспечения оптимального витаминного статуса, новорожденным на ПП показано назначение мультивитаминных препаратов [9], которые обеспечивают высокую биодоступность витаминов, точный контроль дозировки и исключают побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта.

Выводы.

Витамины, микроэлементы являются незаменимыми для организма, обладают высокой активностью, а также биодоступностью в отношении биохимических процессов, протекающих в организме новорожденного. Парентеральное питание (ПП) – это не просто альтернатива, а, зачастую, единственный жизнеобеспечивающий путь для новорожденных, чья пищеварительная система, в зависимости от тяжести состояния, либо наличия патологии со стороны данной системы, не способна справиться с пероральным приемом пищи. Это высокотехнологичный вид нутритивной поддержки, позволяющий доставлять необходимые питательные вещества напрямую в кровоток, минуя желудочно-кишечный тракт. ПП – это не просто набор компонентов питания, а сбалансированная формула, тщательно подобранная и основанная на потребностях конкретного ребенка в конкретном ингредиенте, оптимальном для полноценного усвоения, а также, для формирования его адекватного метаболизма, с учетом потребностей организма при некоторых патологических состояниях, характерных для перинатального периода. Данный вид питания обеспечивает наилучшее поступление белков, жиров, углеводов, витаминов, минералов и микроэлементов, критически важных для развития всех органов и систем. Благодаря ПП, недоношенные дети, дети с врожденными пороками развития пищеварительной системы, или перенесшие тяжелую гипоксию при рождении, получают шанс на полноценный рост и развитие, избегая опасных осложнений, связанных с недостаточным питанием. Индивидуальный подход к составлению схемы ПП, учитывающий особенности каждого малыша, позволяет минимизировать риски и максимизировать пользу этого жизненно важного метода введения питательных веществ, витаминов, минералов. Это не просто питание, это инвестиция в будущее, обеспечивающая крепкое здоровье и полноценную жизнь маленького человека.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: наше исследование впервые демонстрирует критическую роль водо- и жирорастворимых витаминов и микроэлементов в успешном парентеральном питании новорожденных, подчеркивая необходимость их введения с первого дня терапии для обеспечения адекватного роста и развития.

Литература.

1. Горелик К.Д., Горелик Ю.В., Дмитриев А.В., Быков К.В. Роль витаминов и микроэлементов в парентеральном питании новорожденных *НЕОНАТОЛОГИЯ: новости, мнения, обучение. Том 8, № 2, 2020.*
2. Ерпулева Ю.В., Лекманов А.У. Основные принципы парентерального питания в педиатрии (рекомендации Европейского Общества Парентерального и Энтерального Питания – ESPEN) // *Российский Вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. 2011. № 2. С. 82–88.*
3. Ерпулева Ю.В., Чубарова А.И., Вайнштейн Н.П. и др. Осложнения длительного парентерального питания новорожденных и детей грудного возраста // *Российский Вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. 2017. Т. 7, № 1. С. 59–69.*
4. Горелик К.Д., Горелик Ю.В., Дмитриев А.В., Быков К.В. Жирные кислоты в составе жировых эмульсий для парентерального питания в неонатологии // *Неонатология: новости, мнения, обучение. 2019. Т. 7, № 1. С. 54–60. DOI: 10.24411/2308-2402-2019-11007*
5. Mihatsch W.A., Braegger C., Bronsky J. et al. ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition // *Clin. Nutr. 2018. Vol. 37. P. 2303–2305.*

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

6. Парентеральное питание новорожденных. Клинические рекомендации. Российская Ассоциация специалистов перинатальной медицины совместно с Ассоциацией неонатологов. 2015. С. 1–31.
7. De Freitas B.A.C., Leao R.T., Gomes A.P., Siqueira-Barista R. Nutrition therapy and neonatal sepsis // Rev. Bras. Ter Intensiva. 2011. Vol. 23, N 4. P. 492–498.
8. Gamal T.S., Madiha A.A.S., Hanan M.K. et al. Neonatal and maternal 25-OH vitamin D serum levels in neonates with early-onset sepsis // Children. 2017. Vol. 4. P. 37. DOI: 10.3390/children4050037
9. Hanson L.A. Biology of Human Milk, Nestle Nutrition Workshop Series. New York : Raven Press, 1998. 8. Takada M., Shimada M., Hosono S. et al. Trace elements and mineral requirements for very low birth weight infants in rickets of prematurity // Early Hum. Dev. 1992. Vol. 29. P. 333–338. DOI: 10.1016/0378- 3782(92)90188-M

Сведения об авторах

Плотникова Екатерина Юрьевна

Врач-неонатолог

ГБУЗ Родильный дом

г. Краснодар МЗ КК, Россия

Эл. почта: cat.roll@yandex.ru

Корякина Асият Игоревна

Врач-неонатолог

ГБУЗ Родильный дом г. Краснодар МЗ КК,

Россия

Эл. почта: vaslet@mail.ru

Васильев Юрий Юрьевич

Врач анестезиолог-реаниматолог, транс-
фузиолог

ГБУЗ Родильный дом г. Краснодар МЗ КК,

Россия

Эл. почта: vasilyevyura@mail.ru

Куликова Ирина Александровна

студентка лечебного факультета

Кубанский государственный медицинский
университет

Краснодар, Россия

Эл. почта: dockulikowa@yandex.ru

Information about author

Plotnikova Ekaterina Yurievna

Neonatologist

GBUZ Maternity hospital Krasnodar,

MOH KK, Russia

E-mail: cat.roll@yandex.ru

Koryakina Asiyat Igorevna

Neonatologist

GBUZ Maternity hospital Krasnodar, MOH KK, Russia

E-mail: vaslet@mail.ru

Vasiliev Yuri Yurievich

The anesthesiologist-resuscitator ,transfusiologist

GBUZ Maternity hospital Krasnodar, MOH KK, Russia

E-mail: vasilyevyura@mail.ru

Kulikova Irina Aleksandrovna

student of the Faculty of Medicine Kuban State Medical Uni-
versity

Krasnodar, Russia

E-mail: dockulikowa@yandex.ru

УДК 611-018.2+611-013:616-003.93

ГРНТИ 76.03

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.90-95

Ю. Г. Барановский, Ф. Н. Ильченко, Е. Ю. Шаповалова,

Т. А. Бойко, С. В. Харченко, А. Г. Барановский

Ордена Трудового Красного Знамени медицинский институт имени

С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО

"Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского"

**СТРУКТУРА БИОПТАТОВ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ РАНЫ КОЖИ ПОСЛЕ ТРАНС-
ПЛАНТАЦИИ КОЛЛАГЕНОВОЙ ГУБКИ И ФИБРОБЛАСТОВ**

В статье обсуждаются структурные особенности заживающих биоптатов ишемизированной модельной раны кожи на 10-е сутки после интраоперационной трансплантации гемостатической коллагеновой губки с культивированными аллогенными дермальными фибробластами.

Ключевые слова: аллофибробласты, гемостатическая губка, ишемизированная рана

**Yu. G. Baranovskiy, F. N. Ilchenko, Ye. Yu. Shapovalova, T. A. Boyko,
S. V. Harchenko, A. G. Baranovskiy**
Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named
after S. I. Georgievsky"
of V. I. Vernadsky Crimea Federal University

STRUCTURE OF BIOPSY SAMPLES OF ISCHEMIC SKIN WOUND AFTER TRANS- PLANTATION OF COLLAGEN SPONGE AND FIBROBLASTS

The paper discusses the structural features of healing biopsies of an ischemic model skin wound on the 10th day after intraoperative transplantation of a hemostatic collagen sponge with cultured allogenic dermal fibroblasts.

Keywords: *fibroblasts, hemostatic sponge, ischemic wound.*

Введение.

Проблема заживления длительно существующих дефектов кожных покровов, осложненных венозной недостаточностью, не теряет своей актуальности [1]. Основными клетками, способными к формированию грануляционной ткани и последующему рубцеванию язв, признаны фибробласты с их способностью к активному синтезу межклеточного вещества, главным компонентом которого являются коллагеновые волокна [2]. Фибробласты способны передвигаться по синтезированным ими коллагеновым волокнам, что делает коллагеновые волокна прекрасной основой или скаффолдом для тканеинженерной конструкции [3]. Искусственное получение коллагена разработано на основе экстракции его из соединительной ткани млекопитающих (крыс или крупного рогатого скота), птиц (утиные лапки) [4] и рыб [5]. Выпускаемые фармацевтической промышленностью гемостатические коллагеновые губки служат прекрасной основой для ассоциации их с дермальными фибробластами [6] и последующей трансплантации в длительно незаживающую язву, особенно осложненную экссудацией. Однако сведения о структурных особенностях регенерата на второй стадии раневого процесса, включая неоангиогенез, немногочисленны и редки.

Цель работы.

Провести морфологический анализ тканевого регенерата на 10-е сутки заживления ишемизированной кожной раны после трансплантации коллагеновой губки с дермальными аллогенными фибробластами.

Материалы и методы.

В работе были использованы 4–6 месячные белые лабораторные мыши линии С57/В1. Были выделены две группы по 8 мышей: контрольная и экспериментальная. Эксперимент проводился в соответствии с принципами гуманизма, изложенных в Directive 2010/63/EU, и ICMR on animal research (2006). Ишемизированную кожную рану моделировали хирургическим путем в межлопаточной области на спине мышей обеих групп [6]. Для животных экспериментальной группы дермальные фибробласты получали ферментативным путем и культивировали в ростовой среде DMEM/F₁₂ (Lonza) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). [6].

Губка биодеградируемая коллагеновая была произведена ООО ЛУЖСКОГО ЗАВОДА «БЕЛКОЗИН» из раствора коллагена I типа. В ее состав входит борная кислота и фурацилин. Губка представляет собой сухую пористую пластину желтого цвета, хорошо адгезирует к раневой поверхности. Оставленная в ране, она постепенно деградирует [7]. В модельную рану у мышей экспериментальной группы трансплантировали губку, пропитанную дермальными аллофибробластами в количестве 1,33 млн клеток в ростовой среде. Рану накрывали стерильной повязкой «Воскопран» и подшивали ее к силиконовому кольцу, удерживающего рану от соединения краев [8].

Биоптаты заживающей раны иссекали на 10-е сутки после операции. Для морфометрических исследований из биоптата готовили парафиновые срезы, которые стандартно окрашивали последовательно гематоксилином и эозином. Изучение гистологических срезов осуществляли на светооптическом микроскопе «OLIMPUS CX-31» с цифровой камерой

Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

«OLIMPUS 35050Z». Толщину эпидермиса, площадь, занимаемую коллагеновыми волокнами и микрососудами измеряли с помощью программы "ImageJ" при общем увеличении в 400 раз по 50 измерений на срез.

Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием аналитического пакета приложения STATISTICA Enterprise (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка [10]. Проводилось попарное сравнение контрольной и опытной групп мышей. Поскольку распределение данных отличается от нормального, использовали критерий Манна-Уитни для попарных сравнений, а групповые данные описывались с помощью медианы, первого и третьего квартилей (интерквартильный размах) [9]. Все расчеты проводили в статистической среде R версии 4.2.3 [10]. Достоверность различий принимали при уровне значимости $P = 0,05$.

Полученные результаты.

На 10-е сутки после операции по моделированию длительно незаживающей ишемизированной кожной раны и закрытия ее коллагеновой губкой с аллогенными дермальными фибробластами раневой процесс находится на второй стадии раневого процесса (стадии пролиферации), когда дерма биоптатов представляет собой васкуляризованную грануляционную ткань. В контрольной группе поверхность раны покрыта толстым струпом, состоящим из фибрина и погибших клеток (рисунок 1А). Под ним просматривается тонкий слой формирующегося эпидермиса, состоящего из 3-4 рядов клеток. Условно их можно разделить на базальный и шиповатый слои. Медианное значение толщины эпидермиса составляет 39,73 (36,24 – 41,36) мкм (таблица 1). В наиболее центральных участках раны, ограниченной пришитым силиконовым кольцом, эпителий отсутствует. Грануляционная ткань под поверхностным эпителием хорошо развита. Коллагеновые волокна тонкие, короткие, лежат хаотично, переплетаясь друг с другом. Медианное значение площади коллагеновых волокон составляет 21,68 (16,21 – 26,42) от площади дермы биоптатов. Между ними присутствуют клетки фибробластического дифферона, в основном активные специализированные фибробласты с округлым или овальным ядром. Незначительная лейкоцитарная инфильтрация имеется только в глубоких слоях биоптата. Кровеносные капилляры многочисленны, широкие, часть из них заполнена кровью. Медианное значение их площади равно 0,52 (0,48 – 0,56)% от площади дермы биоптатов.

Таблица 1. Количественные характеристики компонентов биоптатов контрольной и экспериментальной групп

День после операции	Экспериментальная группа медиана (1-3 квартили), интерквартильный размах	Контрольная группа медиана (1-3 квартили), интерквартильный размах	P – достоверность	Изученные показатели
10	49,85 (42,51 – 53,18) *	39,73 (36,24- 41,36)	$P < 0,05$	Толщина эпидермиса в мкм
10	0,96 (0,91-0,99) *	0,52 (0,48-0,56)	$P < 0,05$	Площадь сосудов в %
10	34,21 (31,14-40,02) *	21,68 (16,21-26,42)	$P < 0,05$	Площадь коллагеновых волокон в %

Примечание: *Достоверность различия с контролем, $P < 0,05$.

В биоптатах экспериментальной группы присутствие коллагеновой губки не обнаружено (рисунок 1Б). Она полностью рассосалась. Толщина струпа на ране заметно уменьшилась. Эпидермис толще по сравнению с контролем на $20,31 \pm 0,01\%$. Количество рядов клеток увеличилось до 5-6 и появились признаки начала формирования зернистого слоя. На поверхности эпидермиса прослеживаются клетки с базофильной зернистостью. Эпителием покрыта вся поверхность раны. В грануляционной ткани медианное значение площади занятой коллагеновыми волокнами больше на $36,63 \pm 0,01\%$ по сравнению с контрольной группой.

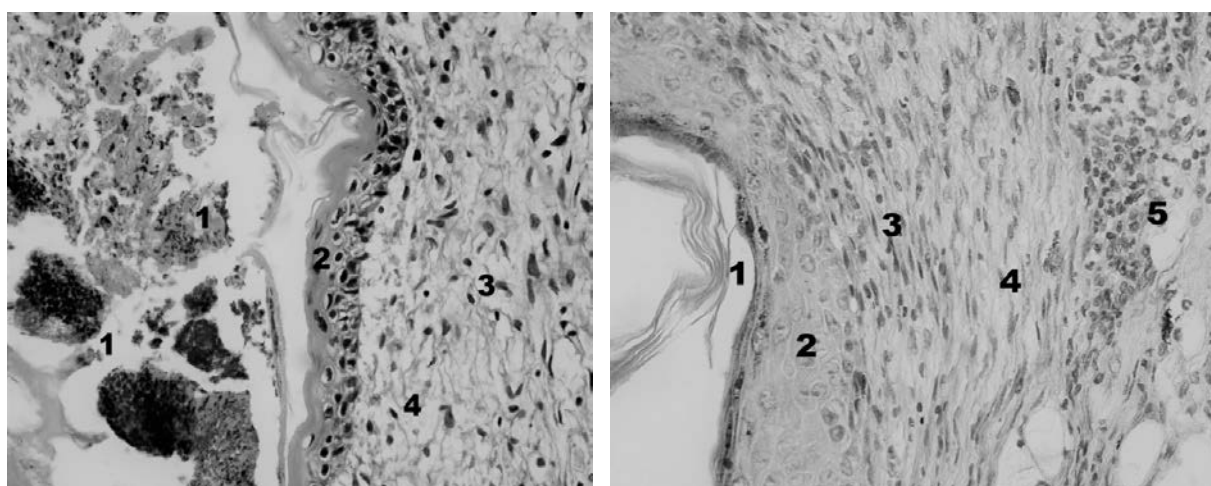
Утолтившиеся оксифильные волокна приобрели относительно упорядоченное расположение: параллельно друг другу и эпидермису, что можно расценивать как признаки начинающейся стадии ремоделирования грануляционной ткани, характерной для третьей стадии раневого процесса. Функционально активные фибробласты лежат между коллагеновыми волокнами и имеют удлинённую форму с удлинённым ядром. Медианное значение площади кровеносных сосудов уменьшилось на $45,83 \pm 0,01\%$ по сравнению с контрольной группой. Однако в глубоких слоях биоптата отдельные венулы расширены и заполнены кровью.

Выводы.

1. Закрытие модельной ишемизированной раны кожи коллагеновой губкой с аллогенными дермальными фибробластами к 10-м суткам заживления существенно улучшает морфологические характеристики второй стадии раневого процесса.

2. Грануляционная ткань биоптатов на $36,63 \pm 0,01\%$ богаче коллагеновыми волокнами и на $45,83 \pm 0,01\%$ беднее кровеносными сосудами по сравнению с контрольной группой, проявляя признаки фиброзирования, отсутствующие в контрольной группе и свидетельствующие о начале рубцевания.

3. Эпидермис толще на $20,31 \pm 0,01\%$, чем в контроле. Коллагеновая губка к этому сроку полностью рассасывается.



А

Б

Рисунок 1. Биоптат кожи мыши на 10-е сутки регенерации. А – контрольная группа. Б – экспериментальная группа. 1 – струп; 2 – эпидермис; 3 – кровеносный капилляр; 4 – коллагеновые волокна; 5 – лейкоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ок. 10 об. 40.

Заключение Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

1. Гемостатическая коллагеновая губка является эффективным скаффолдом для дермальных фибробластов.

2. Трансплантация тканеинженерной конструкции на основе гемостатической коллагеновой губки ассоциированной с культивированными дермальными аллофибробластами обеспечивает эффективное заживление ишемизированных кожных дефектов.

Литература.

1. Guest J. F., Fuller G.W., Vowden P. Venous leg ulcer management in clinical practice in the UK: costs and outcomes // *Int Wound J.* 2018. V. 15, № 1. P. 29-37.
2. Nair R.P. Contribution of fibroblasts to the mechanical stability of in vitro engineered dermal-like tissue through extracellular matrix deposition // *Biores Open Access.* 2014. V. 5. P. 217-225.
3. Ramanathan G., Singaravelu S., Muthukumar T., Thyagarajan S., Perumal P. T., Sivagnanam U. T. Design and characterization of 3D hybrid collagen matrixes as a dermal substitute in skin tissue engineering // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017. V. 72. P. 359-370.

4. Sultan M.T., Jeong J.Y., Seo Y. B., Lee O. J., Ju H.W., Park H. J. Fabrication and characterization of the porous duck's feet collagen sponge for wound healing applications // J Biomater Sci Polym Ed. 2018. V. 29. N 7-9. P. 960-971.
5. Chen J., Gao K., Liu S., Wang S., Elango J., Bao B. Fish collagen surgical compress repairing characteristics on wound healing process in vivo // Mar Drugs. 2019. V. 17. N 1. P. E33.
6. Барановский Ю. Г., Ильченко Ф. Н., Шаповалова Е. Ю. Способ моделирования трофической язвы у лабораторных мышей в опытной модели. Вестник неотложной и восстановительной хирургии // 2016. Т. 1, №2. С. 259-261.
7. Шехтер А. Б., Гуллер А. Е., Истратов Л. П., Истратова Е. В., Бутнару Д. В. Морфология коллагеновых матриц для тканевой инженерии (биосовместимость, биодegradация, тканевая реакция) // Архив патологии. 2015. Т. 77. № 6. С. 29-38.
8. Шаповалова Е.Ю., Бойко Т. А., Барановский Ю.Г., Харченко С.В., Юнси Г.А. Морфологическая характеристика заживления ишемизированной экспериментальной раны на 12 сутки после применения ауто- и гетерофибробластов и дермального эквивалента // Международный научно-исследовательский журнал. 2017. Т. 8. № 3. С. 51-55.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов. 4-е изд., перераб и доп. М.: Высшая школа. 1990. 294 с.
10. R Core Team 2024. R: A Language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria. 2024

Сведения об авторах

Юрий Геннадиевич Барановский

кандидат мед. наук, доцент, доцент кафедры хирургии №2 Ордена Трудового Красного Знамени медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского"
Крым, Симферополь, Россия
Эл. почта: baranovskiy_yura@mail.ru

Федор Николаевич Ильченко

доктор мед. наук, профессор, зав. кафедрой хирургии №2 Ордена Трудового Красного Знамени медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского"
Крым, Симферополь, Россия
Эл. почта: ilchenko5252@mail.ru

Елена Юрьевна Шаповалова

д.мед.н., профессор, зав. кафедрой гистологии и эмбриологии Ордена Трудового Красного Знамени медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского"
Крым, Симферополь, Россия
Эл. почта: Shapovalova_L@mail.ru

Татьяна Анатольевна Бойко

кандидат мед. наук, доцент, доцент кафедры гистологии и эмбриологии Ордена Трудового Красного Знамени медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского"
Крым, Симферополь, Россия
Эл. почта: tatyana_boyko_5@mail.ru

Information about author

Yuriy Gennadievich Baranovskiy

PhD, associated professor of Department of Surgery N2 Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky" of V. I. Vernadsky Crimea Federal University
Crimea, Simferopol, Russian Federation
E-mail: baranovskiy_yura@mail.ru

Fedor Nikolayevich Ilchenko

PhD, professor, Head of the Department of Surgery N2 Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky" of V. I. Vernadsky Crimea Federal University
Crimea, Simferopol, Russian Federation
E-mail: ilchenko5252@mail.ru

Yelena Yur'evna Shapovalova

PhD, professor, Head of the Department of Histology and Embryology Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky" of V. I. Vernadsky Crimea Federal University
Crimea, Simferopol, Russian Federation
E-mail: Shapovalova_L@mail.ru

Tatyana Anatol'evna Boyko

PhD, associated professor of Department of Histology and Embryology Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky" of V. I. Vernadsky Crimea Federal University
Crimea, Simferopol, Russian Federation
E-mail: tatyana_boyko_5@mail.ru

**Секция 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ**

Светлана Владимировна Харченко

кандидат мед. наук, доцент, доцент кафедры гистологии и эмбриологии Ордена Трудового Красного Знамени медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского"

Крым, Симферополь, Россия

Эл. почта: kcharchenkos@mail.ru

Алексей Геннадиевич Барановский ассистент кафедры хирургии №2 Ордена Трудового Красного Знамени медицинский институт имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО "Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского"

Крым, Симферополь, Россия

Эл. почта: alex_sharp123@mail.ru

Svetlana Vladimirovna Harchenko

PhD, associated professor of the Department of Histology and Embryology Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky" of V. I. Vernadsky Crimea Federal University

Crimea, Simferopol, Russian Federation

E-mail: kcharchenkos@mail.ru

Aleksey Gennadievich Baranovskiy

assistant professor of Department of Surgery N2 Order of the Red Banner of Labor Medical Institute named after S. I. Georgievsky" of V. I. Vernadsky Crimea Federal University

Crimea, Simferopol, Russian Federation

E-mail: alex_sharp123@mail.ru

УДК 611.42:57.044

ГРНТИ 76.03

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.96-100

С.С. Обернихин¹, Н.В. Яглова¹, Е.П. Тимохина¹,

В.В. Яглов¹, С.В. Назимова¹, Д. А. Цомартова²

¹НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына

ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

ВЛИЯНИЕ ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТИМУСА КРЫС

Изучено влияние снижения содержания дейтерия в организме на изменения функциональной активности тимуса. Установлено, что реактивным ответом на истощение дейтерия является резкое увеличение количества прогениторных клеток, их пролиферация и дифференцировка в Т-клетки.

Ключевые слова: дейтерий, иммунная система, тимус.

N.V. Yaglova¹, S.S. Obernikhin¹, E.P. Timokhina¹,

V.V. Yaglov¹, S.V. Nazimova¹, D.A. Tsomartova²,

¹A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery"

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

EFFECT OF WATER WITH REDUCED DEUTERIUM CONTENT ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE RAT THYMUS

The effect of decreasing deuterium content in the body on changes in the functional activity of the thymus was studied. It was found that the reactive response to deuterium depletion is a sharp increase in the number of progenitor cells, their proliferation and differentiation into T cells.

Key words: deuterium, immune system, thymus.

Дейтерий является стабильным изотопом водорода, достаточно широко распространённым в природе. Его доля составляет примерно 0,015%. В крови млекопитающих его содержание превышает содержание таких макроэлементов как магний, калий, кальций [1]. В организме дейтерий находится в виде полутяжёлой воды HDO, которая образуется в результате обмена атомами водорода между H₂O и D₂O. Известно, что замена протия на дейтерий в химических веществах значительно увеличивает энергию разрыва связи и замедляет относительную скорость химических реакций [2]. Это даёт основание рассматривать сдвиг баланса изотопов водорода как регулятор метаболических и физиологических процессов. Снижение дейтерия в нормальных условиях вызывает немедленный ответ, задействующий секреторные и морфогенетические процессы [3,4].

Тимус, являясь центральным органом иммунной системы, обеспечивает пролиферацию, дифференциацию, селекцию и миграцию зрелых Т-клеток в кровотоки и периферические органы иммунитета [5]. Особенностью тимуса является его ранняя возрастная инволюция, которая начинается после полового созревания. Помимо возрастной тимус подвержен также акцидентальной инволюции в ответ на негативные факторы окружающей среды такие как психоэмоциональный стресс, инфекция, радиотерапия и химиотерапия [6,7,8]. Поскольку тимус играет центральную роль в противоопухолевом иммунитете, то одной из причин подавления роста опухолей и дальнейшей гибели опухолевых клеток под действием снижения уровня дейтерия можно рассматривать восстановление функциональной активности иммунной системы, в частности тимуса [9,10]. В связи с этим, наше исследование было направлено на поздние эффекты истощения дейтерия в организме. Поэтому цель исследования – изучить функциональную активность тимуса крыс при длительном потреблении воды с пониженным содержанием дейтерия.

Материалы и методы

Исследования были выполнены на самцах крыс линии Wistar в возрасте 8 недель, массой 210–230 г ($n = 60$). Крысы были разделены на две группы. Контрольная группа ($n = 30$) потребляла дистиллированную водопроводную воду с обычным содержанием дейтерия (150ppm). Опытная группа ($n = 30$) потребляла дистиллированную воду с пониженным содержанием дейтерия с $[D] = 10$ ppm *ad libitum* вместо водопроводной воды в течение 28 дней (ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Санкт-Петербург, Россия).

Объем потребляемой жидкости, а также массу крыс измеряли ежедневно на протяжении всего эксперимента. Крысы были эвтаназированы на 1, 3, 7, 14, 21 и 28-й день путем передозировки золетила. Удаленный тимус взвешивали, затем гомогенизировали для получения культуры тимоцитов и использовали в проточной цитометрии. Субпопуляцию лимфоцитов тимуса оценивали при помощи антител к CD3, CD4 и CD8, конъюгированных с флуорохромами (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Для исследования использовали проточный цитометр FC500 (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). Определяли процент CD3-позитивных лимфоцитов, включая одиночные позитивные Т-хелперы ($CD3^+CD4^+CD8^-$) и Т-цитотоксические ($CD3^+CD4^-CD8^+$) клетки, а также дубльпозитивные ($CD3^-CD4^+CD8^+$) и дубльнегативные ($CD3^-CD4^-CD8^-$) клетки, представляющие лимфобласты. Эксперименты на животных были одобрены Этическим комитетом НИИ морфологии человека (протокол № 23 от 25 марта 2020 г.).

Для статистического анализа использовался программный пакет «Statistica 7.0» (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Количественные сравнения независимых групп проводились с использованием t -критерия Стьюдента с учетом значений теста Левена на равенство дисперсий. Количественные сравнения процентов субпопуляций лимфоцитов проводились с использованием критерия χ^2 . Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В процессе эксперимента не было обнаружено существенных различий в массе тела и объеме потребляемой воды между контрольными и подвергнутыми воздействию крысами.

Абсолютная и относительная масса тимуса увеличивалась вплоть до 7-го дня эксперимента у контрольных крыс. Существенных изменений обоих показателей с 7-го по 28-й день исследования не наблюдалось. У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, наблюдались такие же изменения абсолютной и относительной массы тимуса, но максимальные значения наблюдались на 14-й день эксперимента. Статистически значимых различий в значениях массы тимуса между контрольными и подвергнутыми воздействию крысами не обнаружено.

Дубльнегативные клетки $CD4^-CD8^-$ представляли собой самую незначительную субпопуляцию тимических лимфоцитов. В течение первых двух недель исследования их процентное содержание демонстрировало некоторые колебания, а затем значительное снижение к концу эксперимента у контрольных животных. У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, наблюдалось изменение характера содержания ранних предшественников в тимусе. Значительное увеличение процента клеток $CD4^-CD8^-$ наблюдалось через 1 день после начала потребления воды с пониженным содержанием дейтерия. В дальнейшем наблюдалось постепенное числа дубльнегативных клеток в течение двух недель и меньшим увеличением на 21-й и 28-й дни. Поэтому значения у крыс с пониженным содержанием дейтерия значительно отличались от контрольных в каждой временной точке.

Дубльпозитивные клетки представляли собой наибольшую популяцию в тимусе. Процент дифференцирующихся лимфоцитов $CD4^+CD8^+$ у контрольных крыс имел колебания, с минимальными значениями в дни, когда количество дубльнегативных клеток было высоким. У крыс, потреблявших обедненную по дейтерию воду, наблюдалось значительное снижение числа дубльпозитивных клеток после 1-го дня потребления воды с пониженным содержанием дейтерия. На 3-и сутки у них наблюдался более высокий уровень $CD4^+CD8^+$ -лимфоцитов по сравнению с контрольными животными.

В контрольной группе процент $CD3^+$ -лимфоцитов, представляющих зрелые Т-клетки,

характеризовался умеренными колебаниями на протяжении всего периода исследования. У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, амплитуда колебаний была значительно выше за счет многократного увеличения числа CD3⁺-позитивных клеток через сутки после начала воздействия. В дальнейшем у крыс наблюдалось снижение содержания CD3⁺ клеток в тимусе, однако на 14-й день потребления воды с пониженным содержанием дейтерия процент зрелых Т-клеток вновь превысил контрольные значения. Затем содержание Т-клеток вновь снизилось и к концу эксперимента соответствовало значениям контрольной группы.

Содержание клеток CD3⁺CD4⁺ в контрольном тимусе варьировало в ходе исследования, но соответствовало колебаниям процента клеток CD3⁺. Лимфоциты CD3⁺CD8⁺ демонстрировали более высокую амплитуду колебаний, чем клетки CD3⁺CD4⁺. Соотношение Т-хелперы/Т-цитотоксические лимфоциты также варьировалось, но всегда было больше единицы. Истощение дейтерия вызвало значительные изменения как в созревании Т-хелперов, так и Т-цитотоксических лимфоцитов. Отмечался примерно одинаковый рост Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов через день после начала воздействия. Дальнейшее снижение числа Т-клеток было связано в основном с более низким содержанием Т-цитотоксических лимфоцитов в тимусе, что вызвало дисбаланс в соотношении Т-хелперов/Т-цитотоксических лимфоцитов. На 28-е сутки эксперимента процентные доли субпопуляций CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ находились в пределах контрольных значений.

Проведённое нами исследование показало, что потребление воды с пониженным содержанием дейтерия не вызывало выраженных физиологических изменений у крыс, но существенно изменяло морфогенетические процессы в тимусе. Так, снижение поступления дейтерия в организм вызывает существенные изменения в скоростях морфогенетических процессов в тимусе. Быстрая реакция на снижение дейтерия уже через сутки показывает, что содержание дейтерия в системном кровотоке является фактором, регулирующим пролиферацию и дифференцировку клеток. Истощение дейтерия стимулировало формирование пула ранних прогениторных клеток в тимусе. Важно отметить, что не наблюдалось длительного сохранения CD4⁺CD8⁺ клеток в тимусе, в основном за счет их усиленной дифференцировки. Это следует считать благоприятным фактором, поскольку накопление низкодифференцированных клеток в тимусе является фактором риска развития лимфомы [11].

Известно, что потребление воды с пониженным содержанием дейтерия сначала снижает содержание дейтерия в крови, а затем снижает концентрацию дейтерия в твердых тканях [12]. Исходя из этих данных потребление воды с пониженным содержанием дейтерия в течение суток изменяет баланс протия и дейтерия в крови и лимфе. Этот сдвиг спровоцировал наиболее выраженные изменения в тимопоэзе. Он подтверждает ранее полученные данные о быстром ответе тимуса на истощение дейтерия [4]. Пропорциональное увеличение недифференцированных клеток CD4⁺CD8⁺ и зрелых клеток CD3⁺ свидетельствует о том, что баланс между CD3⁺ и ранними предшественниками не нарушен. Такое сильное увеличение Т-клеток предполагает ускоренную дифференциацию дубльпозитивных в монопозитивные клетки. Об этом также свидетельствует снижение процента дубльпозитивных клеток среди лимфоцитов тимуса. Второй причиной увеличения процента дифференцированных Т-клеток была их замедленная миграция из тимуса в системный кровоток. Однако активация пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников, очевидно, была основной причиной накопления Т-клеток. Примечательно, что истощение дейтерия по-разному стимулировало дифференцировку Т-хелперных и Т-цитотоксических лимфоцитов, в большей степени усиливая созревание первых.

Дальнейшие наблюдаемые изменения свидетельствовали об уменьшении продукции Т-клеток за счет истощения содержания ранних тимических предшественников. Однако процессы дифференцировки имеющихся незрелых клеток не замедлялись. Восстановление количества недифференцированных клеток и их активная дифференцировка в тимусе через месяц воздействия, когда изменение содержания дейтерия происходит не только в крови, но и в тканях, еще раз показывают, что созревание Т-клеток является дейтерийзависимым

процессом. Известно, что снижение содержания дейтерия оказывает антиоксидантное действие на клетки и повышает их чувствительность к гипоксии [13]. Это является важным фактором повышения выживаемости клеток. Многие из этих эффектов объясняются изменением функционирования митохондрий, то есть активацией клеточного дыхания [14]. Однако это не объясняет, почему именно усиливаются процессы дифференцировки. Вероятным объяснением активации синтеза ключевых молекул CD3, CD4 и CD8 в тимocyтах может быть активация транскрипции соответствующих генов за счет изменения количества открытых состояний в молекуле ДНК. Недавние исследования выявили, что образование открытых состояний ДНК отвечает за «распознавание» точки начала транскрипции и, соответственно, является более ранним событием по сравнению с моментом связывания фермента с его специфическим сайтом [15]. В ряде исследований показано, что снижение содержания дейтерия и замена дейтерия на протий в молекуле ДНК снижает энергию разрыва комплементарных водородных связей между парами оснований, то есть способствует увеличению числа открытых состояний в генах [16]. Такие изменения в ДНК можно считать фактором, повышающим возможность транскрипции генов и активации дыхания в клетках, а также способствующим усилению энергообеспечения процессов трансляции мРНК и синтеза белка.

Выводы

1. Морфогенетические процессы, обеспечивающие тимопоэз, чувствительны к содержанию дейтерия в крови и твердых тканях.
2. Изменения продукции Т-клеток не монотонны и дифференцированно затрагивают морфогенетические процессы пролиферации, дифференцировки и миграции клеток.
3. Реактивным ответом на истощение дейтерия является резкое увеличение количества прогениторных клеток, их пролиферация и дифференцировка в Т-клетки. Компенсаторной реакцией является угнетение тимопоэза с более выраженным подавлением дифференцировки Т-цитотоксических лимфоцитов, за которым следует усиление миграции зрелых Т-клеток.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые установлено стимулирующее влияние понижения содержания дейтерия в организме на морфогенетические процессы в тимусе.

Литература

1. Kselíková V., Vítová M., Bišová K. Deuterium and its impact on living organisms. *Folia Microbiol.* 2019;64:673–681. doi: 10.1007/s12223-019-00740-0.
2. Jancso G. Isotope effects. In: Vértes A., Nagy S., Klencsar Z., editors. *Handbook of Nuclear Chemistry. Volume 2.* Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, The Netherlands: 2013. pp. 85–116.
3. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Yaglov V.V. Response of Pituitary-Thyroid Axis to a Short-Term Shift in Deuterium Content in the Body. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021;171:262–264. doi: 10.1007/s10517-021-05208-1.
4. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Nazimova S.V., Yaglov V.V. Reactive Alterations in Thymic Lymphocytopoiesis to Short-Term Decrease in Deuterium Content in the Body. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022;173:494–496. doi: 10.1007/s10517-022-05568-2.
5. Martins V.C., Ruggiero E., Schlenner S.M., Madan V., Schmidt M., Fink P.J., von Kalle C., Rodewald H.R. Thymus-autonomous T cell development in the absence of progenitor import. *J. Exp. Med.* 2012;209:1409–1417. doi: 10.1084/jem.20120846.
6. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Yaglov V.V. Effects of low-dose dichlorodiphenyltrichloroethane on the morphology and function of rat thymus. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013;155:701–704. doi: 10.1007/s10517-013-2230-1.
7. Obernikhin S.S., Yaglova N.V. Morphological and functional changes in the thymus and spleen of mouse offspring in the development of systemic inflammatory response after a single immunity stimulation in early pregnancy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014;157:812–815. doi: 10.1007/s10517-014-2673-z
8. Schae D.A. Century of Radiation Therapy and Adaptive Immunity. *Front. Immunol.* 2017;8:431. doi: 10.3389/fimmu.2017.00431.

9. Somlyai G., Javaheri B., Davari H., Gyöngyi Z., Somlyai I., Tamaddon K.A., Boros L.G. Pre-Clinical and Clinical Data Confirm the Anticancer Effect of Deuterium Depletion. *Biomacromol. J.* 2016;2:1–7. doi: 10.1016/j.eujim.2016.08.068.
10. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V. Time-dependent effect of deuterium depletion on tumor growth and metastasis. *Russ. Open Med. J.* 2020;9:e0210. doi: 10.15275/rusomj.2020.0210.
11. Malcolm T.I., Hodson D.J., Macintyre E.A., Turner S.D. Challenging perspectives on the cellular origins of lymphoma. *Open Biol.* 2016;6:160232. doi: 10.1098/rsob.160232.
12. Kosenkov A.V., Lobyshev V.I., Gulyaev M.V., Yusubalieva G.M., Baklaushev V.P. The reversible effect of deuteration on tissue fluid and biopolymers in normal and tumor tissues of mice. *Biophysics.* 2018;63:820–824. doi: 10.1134/S0006350918050111.
13. Kravtsov A., Kozin S., Basov A., Butina E., Baryshev M., Malyshko V., Moiseev A., Elkina A., Dzhimak S. Reduction of deuterium level supports resistance of neurons to glucose deprivation and hypoxia: Study in cultures of neurons and on animals. *Molecules.* 2022;27:243. doi: 10.3390/molecules27010243.
14. Zhang X., Gaetani M., Chernobrovkin A., Zubarev R.A. Anticancer Effect of Deuterium Depleted Water—Redox Disbalance Leads to Oxidative Stress. *Mol. Cell. Proteom.* 2019;18:2373–2387. doi: 10.1074/mcp.RA119.001455.
15. Nikitiuk A.S., Bayandin Y.V., Naimark O.B. Statistical thermodynamics of DNA with open states. *Phys. A Stat. Mech. Appl.* 2022;607:128156. doi: 10.1016/j.physa.2022.128156.
16. Basov A., Drobotenko M., Svidlov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. Inequality in the frequency of the open states occurrence depends on single $2H/1H$ replacement in DNA. *Molecules.* 2020;25:3753. doi: 10.3390/molecules25163753.

Сведения об авторах

Сергей Станиславович Обернихин

доктор мед. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
Москва, Россия
Эл. почта: ober@mail.ru

Наталья Валентиновна Яглова

доктор мед. наук, зав. лабораторией, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
Москва, Россия
Эл. почта: yaglova@mail.ru

Екатерина Петровна Тимохина

кандидат биол. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
Москва, Россия
Эл. почта: ober@mail.ru

Валентин Васильевич Яглов доктор мед. наук, профессор, главный научный сотрудник, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия
Эл. почта: vyaglov@mail.ru

Светлана Владимировна Назимова Канд. мед. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия Эл. почта: pimka60@list.ru

Дибакхан Асланбековна Цомартова д.м.н., старший научный сотрудник, профессор НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) Эл. почта: dtsomartova@mail.ru

Information about author

Sergey Stanislavovich Obernikhin

Doctor of Science (Med.),
Senior Scientist,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky NRCS”, Moscow, Russian Federation
E-mail: ober@mail.ru

Nataliya Valentinovna Yaglova

Doctor of Science (Med.),
Head of Department,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky NRCS”, Moscow, Russian Federation
E-mail: yaglova@mail.ru

Ekaterina Petrovna Timokhina

Ph.D.(Biol.),
Senior Scientist,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky NRCS”, Moscow, Russian Federation
E-mail: ober@mail.ru

Valentin Vasilyevich Yaglov Doctor of Science (Med.), Professor, Principle Researcher, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky NRCS”, Moscow, Russian Federation E-mail: vyaglov@mail.ru

Svetlana Vladimirovna Nazimova PhD (PhD (Med)), Senior Scientist, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky NRCS”, Moscow, Russian Federation E-mail: pimka60@list.ru

Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova Doctor of Science (Med.), Senior Researcher, Professor, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky NRCS”, Russian Federation, Moscow; Professor, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University) e-mail: dtsomartova@mail.ru

УДК 611.4
ГРНТИ 76.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.101-104

Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С.,
Яглов В.В., Назимова С.В.
НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына
ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ПРИ ПОНИЖЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ

Получены данные о стимуляции пролиферации лимфобластов в тимусе и замедлении миграции дифференцированных Т-клеток при кратковременном снижении уровня дейтерия во внутренней среде организма. А так же об усиленной эмиграции зрелых Т-лимфоцитов из тимуса при длительном снижении уровня дейтерия во внутренней среде организма. Этих факты позволяет рассматривать снижение уровня дейтерия как новый подход к замедлению процессов инволюции тимуса.

Ключевые слова: дейтерий, протий, изотопы водорода, Т-лимфоциты, тимус.

**E.P. Timokhina, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin,
V.V. Yaglov, S.V. Nazimova**

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology
of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre
of Surgery"

DEUTERIUM REDUCTION-ASSOCIATED CHANGES IN T-CELLS BLOOD CONTENT

Data have been obtained on stimulation of lymphoblast proliferation in the thymus and slowing down the migration of differentiated T cells with a short-term decrease in deuterium levels in the internal environment of the body. As well as increased emigration of mature T-lymphocytes from the thymus with a prolonged decrease in deuterium levels in the internal environment of the body. These facts allow us to consider a decrease in deuterium levels as a new approach to slowing down the processes of thymus involution.

Key words: deuterium, protium, hydrogen isotopes, T-lymphocytes, thymus.

Введение

Тимус - центральный орган иммунной системы. Тимус обеспечивает пролиферацию, дифференцировку, отбор и эмиграцию зрелых Т-клеток в кровоток и периферические органы иммунитета. Т-клетки распознают бактериальные, вирусные и опухолевые антигены и поддерживают иммунологическую память. Особенностью тимуса является его ранняя возрастная инволюция, которая начинается после полового созревания [1]. Возрастная инволюция тимуса приводит к снижению продукции и созревания новых Т-лимфоцитов, что в свою очередь способствует иммуностарению, воспалению и нарушению Т-клеточного иммунитета [2, 3, 4, 5]. Разработка методов замедления процессов возрастной инволюции тимуса является важной для решения проблемой. К числу таких перспективных факторов относится изменение баланса стабильных изотопов в организме. Поскольку биохимические реакции с участием протия и дейтерия протекают с разной скоростью, замещение протия дейтерием в химических веществах значительно увеличивает энергию разрыва связи и замедляет относительную скорость химических реакций. Эти свойства дейтерированных и обедненных дейтерием веществ дают основание рассматривать баланс изотопов водорода как предполагаемый регулятор метаболических и физиологических процессов.

Целью работы было изучение изменения содержания Т-лимфоцитов в крови крыс при кратковременном и длительном снижении уровня дейтерия в организме.

Материалы и методы

В эксперименте были использованы половозрелые самцы крыс породы Вистар в возрасте 6 месяцев, массой 340–370 г. Крысы контрольной группы потребляли воду (n=30) со стандартным содержанием дейтерия [D]=146 ppm. Крысы опытной группы потребляли воду

с пониженным содержанием дейтерия $[D]=10$ ppm ($n=30$) (ИП Селиваненко) *ad libitum* от 1 до 28 суток. Для определения содержания дейтерия в воде использовали изотопный анализатор T-LWIA-45-EP (LOS Gatos Gatos Research, Inc.), с точностью до 1 ppm. Животных выводили из эксперимента передозировкой зоветила через 1, 3, 7, 14 и 28 после начала потребления воды с пониженным содержанием дейтерия. Измеряли массу тела до и после эксперимента. Масса тела статистически значимо не изменялась.

Для исследования использовали проточный цитофлуориметр FC500 («Beckman Coulter»). Определяли процентное соотношение CD3-позитивных клеток в крови крыс. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы Statistica 7.0 (Statsoft, Inc.). Количественные данные, имеющие нормальное распределение, описывали средним значением и ошибкой среднего ($M \pm m$). Для сравнения групп использовали тест Манна-Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Полученные результаты

У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, через 24 часа наблюдалось статистически значимое увеличение массы тимуса. На более длительных сроках различия в массе органа у контрольных и опытных животных отмечено не было. Количественное определение CD3-положительных лимфоцитов в крови крыс на разных сроках воздействия выявило различную чувствительность Т-лимфоцитов на кратковременное и длительное воздействие воды с пониженным содержанием дейтерия. Через сутки после начала воздействия процент Т-клеток был снижен более чем на 15% по сравнению с контролем (рис. 1). С 3-го по 21-й день существенных колебаний процентного содержания Т-клеток по сравнению с более ранними сроками исследования не наблюдалось. Однако на 28-е сутки зарегистрировано значительное повышение содержания Т-клеток в крови более, чем на 10% (рис. 1).

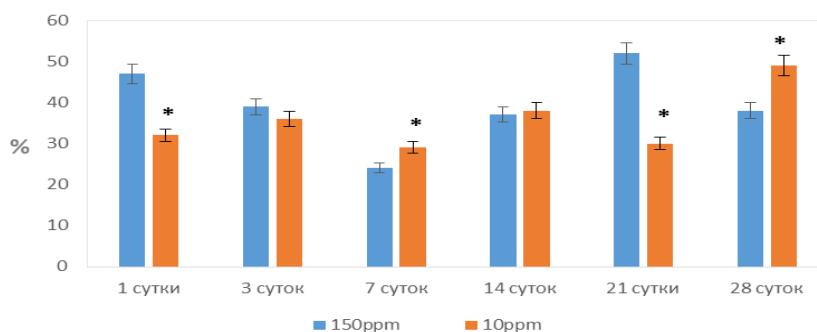


Рисунок 1. Содержание CD3+ лимфоцитов в крови крыс контрольной группы и группы крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия $[D]=10$ ppm через 1, 3, 7, 14 и 28 суток. Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы.

Согласно данным из научной литературы, потребление воды, обедненной дейтерием, уже в течение первых суток изменяет баланс протия/дейтерия в крови и лимфе [6]. У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, через 24 часа наблюдалось увеличение массы тимуса. Так же было отмечено снижение концентрации зрелых Т-лимфоцитов в крови по сравнению с контрольными животными. В наших предыдущих исследованиях мы установили, что увеличение массы тимуса в течение 24 часов потребления воды с пониженным содержанием дейтерия обусловлено увеличением содержания клеток в органе [7]. Это свидетельствует о стимуляции пролиферации лимфобластов в тимусе и замедлении миграции дифференцированных Т-клеток и говорит о высокой чувствительности тимуса даже на кратковременное снижение уровня дейтерия во внутренней среде организма, то есть снижение содержания дейтерия является стимулом для пролиферативных процессов [8]. Длительное снижение уровня дейтерия в организме крыс приводило к значительному увеличению концентрации CD3+ лимфоцитов в крови животных. Это свидетельствует об усиленной эмиграции зрелых Т-лимфоцитов из тимуса на этом сроке исследования. В других наших исследованиях мы отмечали увеличение количества тимобластов через 3–4 недели воздействия и более высокие показатели тимопоэза через 28 дней потребления воды с пониженным

содержанием дейтерия [9].

При оценке содержания Т-клеток в крови у крыс контрольной группы был выявлен волнообразный характер изменения этого показателя с периодом в три недели. У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, волнообразный характер также сохранялся, но период уменьшился до двух недель, то есть цикл обновления популяции Т-клеток в периферической крови сократился. Вероятно, это связано с изменением баланса между созреванием в тимусе интратимических и иммигрирующих костномозговых прогениторных клеток [10]. Совокупность этих фактов позволяет рассматривать снижение уровня дейтерия как новый подход к замедлению процессов инволюции тимуса.

Выводы

Таким образом, установлено, что как кратковременный, так и длительный период снижения концентрации дейтерия в организме, приводит к изменению содержания зрелых Т-лимфоцитов в крови крыс. Реактивной реакцией на истощение дейтерия является снижение количества зрелых Т-клеток в крови. При этом усиление эмиграции зрелых Т-лимфоцитов из тимуса на 28 суток снижения дейтерия в организме свидетельствует об отсутствии ингибирующего действия на созревание Т-лимфоцитов, что подтверждается сохранением волнообразного характера изменения содержания Т-лимфоцитов в периферической крови.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: понижение уровня дейтерия в организме приводит к изменению содержания Т-лимфоцитов в крови, что позволяет рассматривать элиминацию дейтерия как новый подход к изменению скорости и интенсивности тимопоэза.

Литература

1. Duah M., Li L., Sen J., Lan Q., Pan B., Xu K. Thymus Degeneration and Regeneration. *Front. Immunol.* 2021. V. 12. 706244. doi: 10.3389/fimmu.2021.706244
2. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):512-22. doi: 10.1038/nri2318.
3. Яглова Н.В., Назимова С.В., Обернихин С.С., Яглов В.В. Отличия возрастных изменений в тимусе у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2022. Т.174. №11. С.654-657. doi: 10.47056/0365-9615-2022-174-11-654-657.
4. Hale J.S., Boursalian T.E., Turk G.L., Fink P.J. Thymic output in aged mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2006. V. 103. N. 22. P. 8447-8452. doi: 10.1073/pnas.0601040103.
5. Thomas R., Wang W., Su D.M. Contributions of age-related thymic involution to immunosenescence and inflammaging. *Immunity & Ageing.* 2020. V. 17. 2. doi: 10.1186/s12979-020-0173-8.
6. Dzhimak S.S., Basov A.A., Baryshev M.G. Content of deuterium in biological fluids and organs: Influence of deuterium depleted water on D/H gradient and the process of adaptation. *Doklady biochemistry and biophysics.* 2015. V. 465. P. 370-373.
7. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Яглов В.В. Реактивные изменения лимфоцитопоэза в тимусе при кратковременном уменьшении содержания дейтерия в организме. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2022. Т.173. №4. С.508-511. doi: 10.47056/0365-9615-2022-173-4-508-511
8. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Obornikhin S.S., Yaglov V.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3107.
9. Yaglova N.V., Obornikhin S.S., Timokhina E.P., Tsomartova D.A., Yaglov V.V., Nazimova S.V., Tsomartova E.S., Ivanova M.Y., Cheresheva E.V., Lomanovskaya T.A. Effects of Deuterium Depletion on Age-Declining Thymopoiesis In Vivo. *Biomedicines.* 2024. V.12. 956. doi: 10.3390/biomedicines12050956.
10. Martins V.C., Ruggiero E., Schlenner S.M., Madan V., Schmidt M., Fink P.J., von Kalle C., Rodewald H.R. Thymus-autonomous T cell development in the absence of progenitor import. *Journal of Experimental Medicine.* 2012. T. 209. №. 8. С. 1409-1417. doi: 10.1084/jem.20120846.

Сведения об авторах

Екатерина Петровна Тимохина

кандидат биол. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
Москва, Россия

Эл. почта: rodich@mail.ru

Наталья Валентиновна Яглова

доктор мед. наук, зав. лабораторией, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
Москва, Россия

Эл. почта: yaglova@mail.ru

Сергей Станиславович Обернихин

доктор мед. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
Москва, Россия

Эл. почта: ober@mail.ru

Валентин Васильевич Яглов

доктор мед. наук, профессор, главный научный сотрудник,
НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
Москва, Россия

Москва, Россия

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

Светлана Владимировна Назимова

Канд. мед. наук, с.н.с.,
НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
Москва, Россия

Москва, Россия

Эл. почта: pimka60@list.ru

Information about author

Ekaterina Petrovna Timokhina

Ph.D.(Biol.),
Senior Scientist,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of
FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation
E-mail: rodich@mail.ru

Nataliya Valentinovna Yaglova

Doctor of Science (Med.),
Head of Department,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of
FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation
E-mail: yaglova@mail.ru

Sergey Stanislavovich Obernikhin

Doctor of Science (Med.),
Senior Scientist,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of
FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation
E-mail: ober@mail.ru

Valentin Vasilyevich Yaglov

Doctor of Science (Med.), Professor,
Principle Researcher,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of
FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation
E-mail: vyaglov@mail.ru

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD (PhD (Med)), Senior Scientist,
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of
FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation
E-mail: pimka60@list.ru

УДК 577.151.04+577.152.313+546
ГРНТИ 34.35.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.105-111

С. В. Васильева
Институт Биохимической Физики
им. Н.М. Эмануэля РАН,
Москва, Россия

ОКСИД АЗОТА: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОГО МАРКЕРА В КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ И СИГНАЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЫ ДО ШИРОКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКИ

Итогом развития знаний о механизмах активности NO газа- в биосистемах стало представление о его функциях как биологическом маркере в медицине. В России впервые сконструирован и введен в широкую медицинскую практику ингаляционный аппарат «Тианокс»(2019). Оксид азота в нем синтезируется из окружающего воздуха и может быть подан в терапевтический контур пациента (компрессор, аппарат ИВЛ и т.д.).

Ключевые слова: оксид азота, синтез, функции, аппарат «Тианокс».

S.V. Vasilieva
N. M. Emanuel Institute
of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences

NITRIC OXIDE: FROM FUNDAMENTAL MARKER AT CLINICAL DIAGNOSTICS AND SIGNAL MOLECULE TO MEDICINE PRACTICE

Unique chemical and physical properties of nitric oxide dictate its transformation from universal fundamental marker at medicine diagnostics as well as a biological signaling molecule to the development a lot of new stable NO- donors of different classes for wide medicine practice. Moreover, at 2019 in Russia there was designed and constructed the world's first commercially available device for inhalation therapy "Tianox". On the results of its technical and clinical tests it was approved for circulation on the territory of Russia to support a new medicine branch – a therapy with medicine gases.

Keywords: nitric oxide, synthesis, functions, device "Tianox".

Введение

Основные источники NO.

Оксид азота это свободно диффундирующая активная молекула с одним не спаренным электроном на внешней орбитали, которая обладает свойствами свободного радикала. Эта структура обеспечивает ей высокую химическую реактивность и короткий полупериод жизни. Среднее время жизни NO in vivo от 5 до 30 секунд.

В природе оксид азота NO образуется в тропосфере из O₂ и N₂ под влиянием грозových разрядов. В растениях он синтезируется фотохимически в реакциях NO₂ с каротиноидами, а в организмах животных и человека- при взаимодействии нитратов и нитритов с атомами металлов в белках, в т.ч. с железом гемоглобина.. В Грам⁺ Bac. subtilis NO синтезируется аэробно, а в Грам⁻ факультативном анаэробе E.coli для синтеза NO необходимы нитрат редуктаза, NO- контролируемый регулятор анаэробного Fnr [4Fe-4S] и флавогемоглобин Hmp [1].

Основное количество NO в организме человека и животных продуцируется при прямом участии специфических ферментов NO- синтаз - (NOS) на основе аминокислоты L- аргинина как источника атомов азота. Эти NO- синтазы названы по органу их «происхождения при выделении» - эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS) - и т.д. Синтез NO является базовой функцией эндотелиальных клеток.

Функции NO.

В клетках NO избирательно взаимодействует с мишенями - тиолами и переходными металлами в железо - серных белках. NO - липофильная молекула, что важно для мессенджера, контролирующего внутри- и межклеточные взаимодействия, включая интермедиаты

- кальций, активные формы кислорода и др.

Сигнальным посредником между NO и геномом в биосистемах служит цГМФ. Активация гуанилатциклазы происходит при контакте NO с гемом этого фермента. цГМФ обладает способностью активировать протеин киназы, открывать катионные каналы и регулировать активность фосфодиэстераз.

Нитрозилирование это один из механизмов модификации белков оксидом азота в процессе сигнализации и регуляции объема NO в клетке. Глутатион- S – трансфераза и глутатион пероксидаза это белки S – нитрозилирования, обеспечивающие защиту NO в активации антиоксидантных систем организма. NO это мощный про- и одновременно антиоксидант, действующий по механизму разрыва пути окисления.

Оксид азота NO и родственные оксиды – это ключевые эндогенные регуляторы в клетках и тканях. Установлен огромный объем биологических и терапевтических эндо - и экзогенных эффектов NO, включающий его способность расширять сосуды малого круга кровообращения, снижать давление в легочной артерии и ишемические повреждения миокарда, в том числе на разных этапах кардио - хирургического вмешательства, подавлять адгезию и агрегацию тромбоцитов, препятствуя развитию тромбозов, оказывать антибактериальное, противовирусное, антиоксидантное действие и т.д

Всему миру ныне известны имена Нобелевских Лауреатов по физиологии и медицине за 1998 г.- авторов фундаментальных работ Роберта Фёрчготта (Фурчгот), Фериды Мьюрза (Мурад) и Луиса Игнарро по приоритетному доказательству регуляции оксидом азота системы кровяного давления у млекопитающих [2 - 4]. Непрерывно образуясь в биосистемах, NO функционирует в качестве сигнальной молекулы практически во всех физиолого-биохимических и генетических процессах.

Расширяются медицинские аспекты применения NO как структурно малой фармакомолекулы с огромным потенциалом. Растет число публикаций по проблемам NO: по данным сайта <http://apps.isiknowledge.com>, в 1980- 1990 гг. по включению NO в обеспечение метаболизма организмов было всего 1184 статьи (в основном, это вопросы окружающей среды). Далее - в 1990- 2000 гг. количество статей по биохимии и фармакологии NO составило 62 680, а в следующее десятилетие – число публикаций по мол. биологии, фармакологии и другим дисциплинам – уже около 30 млн ! (Интересно, что первооткрывателем « главных газов» живых систем O₂ и NO является Joseph Priestley, и уже более 300 лет регуляторные и токсические эффекты этих газов, а также их взаимодействие, вызывают огромный интерес). Первоначально основу генерации NO составляла используемая в производстве удобрений реакция окисления аммиака при высокой температуре и давлении, с платиной (Pt) и родием (Rh) в качестве катализаторов [5]

Начиная с самых первых работ, NO газ вызвал огромный интерес как биологически активное соединение. Это стало следствием случайности, поскольку экспериментатор - выдающийся британский физиолог сэр Humphrey Davy - оказался в «почти смертельном состоянии», случайно вдохнув новый газ. Это событие можно считать началом фармакологических экспериментов с использованием NO, которые в целом известны уже много лет, хотя этот факт и не был достаточно оценен до настоящего времени. Но именно **ингаляция** стала первым и главным методом терапии с помощью NO [6].

Одни из наиболее перспективных направлений современной науки, включая прикладные, это проблемы оксида азота и его интермедиатов - в кардиологии и опухолевой терапии. Их решение абсолютно зависит от наличия стабильных NO- доноров, степени их фундаментальной изученности, их разнообразия и финансовой доступности.

Абсолютный приоритет исследований, связанных с кристаллическими донорами NO, принадлежит советским ученым - акад. С.М. Алдошину и проф. Н.А.Саниной, ИПХФ РАН (Научный Центр, Черноголовка) [7]. При их руководстве и непосредственном участии ныне созданы десятки уникальных, перспективных кристаллических доноров NO, включая новейшие гибридные препараты, содержащие два или более лекарственных форм в одной молекуле. В этом Центре впервые разработаны фундаментальные основы их синтеза, в том

числе соединения нового класса - нитрозильные комплексы железа с функциональными серосодержащими лигандами - доноры NO различных структурных типов [7]. В Центре предложена первая в РФ система скрининга соединений - NO доноров как потенциальных противоопухолевых препаратов. Все синтезированные соединения генерируют NO в протонных средах без дополнительной активации; по количеству выделенного NO и скорости его генерации они превосходят известные органические доноры NO-NONO-аты. Показана взаимосвязь строения комплексов с эффектом их стабилизации гемоглобином. Они обладают прямым противоопухолевым эффектом *in vivo*, связанным с индукцией апоптоза (установлено для клеток человека *in vitro*), подавляют процесс метастазирования и неоангиогенез (новообразование сосудов), ингибируют агрегацию тромбоцитов и их адгезию к эндотелию сосудов - как ступеней метастазирования.

Выдающийся вклад в изучение глобальной проблемы NO внесли работы российского ученого **Е. К. Завойского**, работавшего в Казани. Прежде всего это открытие явления электронного пара- магнитного резонанса в клетках, обработанных оксида азота, и сопряженного с появлением сигнала $g = 2.03$ ДНКЖ (1944 г).

Неоценим вклад проф. **А.Ф. Ванина** (ИХФ РАН, Москва), который он на протяжении многих лет вносит в развитие комплекса фундаментальных областей знания об оксиде азота. Он автор более 500 научных публикаций по оксиду азота, главные из которых связаны с открытием и изучением универсальной сигнальной молекулы всех биосистем - динитрозильного комплекса железа ДНКЖ с тиоловыми лигандами [8, 9].

Важнейшей функцией оксида азота является сигнальная трансдукция – и регуляция активности комплекса процессов репарации ДНК в условиях стрессов. Приоритетные исследования в этой области были выполнены на клетках *E. coli* в ИХФ - и затем в ИБХФ РАН под руководством Васильевой С.В. В 1999 г. в лаборатории открыта новая функция NO - индукция в клетках *E.coli* error-prone ДНК-SOS- репарационного процесса - ответа на формирование двунитевых разрывов ДНК и остановку ДНК – репликации, изучены его механизмы [10]. Получены доказательства, что NO - нитрозативные повреждения в ДНК репарируются также универсальной SoxRS системой [11]. Этот ДНК - репарационный механизм сигнальной трансдукции является двухэтапным, инициируется нитрозированием Fe-S центров регуляторного белка SoxR[2Fe-2S] и формированием ДНКЖ- затравок из экзогенного NO и свободного Fe(с ЭПР- исследованиями и регистрацией в клетках ЭПР сигналов $g = 2,03$). Второй этап трансдукции сигнала – это дезинтеграция SoxR[2Fe-2S] кластеров с включением ДНКЖ – затравок в активацию транскрипции гена *soxS* с сигма70 РНК- полимеразой. Было постулировано, что свободное железо является необходимым элементом в NO – сигнальной трансдукции. Полученные результаты стали подтверждением данных более ранних результатов ЭПР - исследований А.Ф.Ванина на дрожжах, и в итоге вошли в основу формулы гипотезы о приоритете ДНКЖ как универсальной сигнальной молекулы в Биологии.

Можно с гордостью отметить, что указанные в этом разделе российские исследователи являются представителями научной школы общего основателя и учителя-академика Н.Н.Семенова (ИХФ РАН- ИБХФ РАН –ИПХФ РАН) [12].

В целом же, российская школа изучения оксида азота включает многих достойнейших ученых, часть из их самых новых достижений заявлена в Программу данной Конференции 2025 г.

Неоценимая роль в исследованиях медицинских проблемы оксида азота (в том числе COVID- 19) принадлежит проф. Медицинской Школы Гарварда (Бостон) и госпиталя в Масачуссетсе **Уоррену Заполу** (Warren M. Zapol). В 2016 г. учеными была впервые предпринята попытка получить чистый оксид азота, пригодный для медицинских целей. В работе рассчитаны терапевтические уровни NO и допустимые - NO₂ и озона при использовании низкотемпературного дозатора потока в плазменном генераторе [13].

Метод NO- ингаляции в медицине.

В медицине метод ингаляционной терапии с оксидом азота получил широкое

распространение, и в настоящее время NO в ингаляционной форме применяют и при лечении COVID-19. У пациентов с легочной гипертензией низкие дозы (100 ppb) используют как сосудорасширяющий агент, а высокие дозы NO эффективны в терапии инфекции легких.

В норме высокая концентрация NO в околоносовых пазухах (30 000 ppb) поддерживает стерильность этой области. Напротив, низкий уровень назального NO у пациентов с синдромом Картагенера или муковисцидозом, повышает риск инфекции дыхательных путей.

Изначально для ингаляционной терапии с оксидом азота требовались десятки тысяч дозаторов с баллонными источниками газа. Например, только в Турции их насчитывается более 30 тыс. (2016 г.) В РФ этот метод сертифицирован не был.

Терапия NO считается высокой (цена 1 баллона с 10 л моно оксида азота это примерно 6 тысяч US\$, а для нормальной работы дозатора необходимо 4 баллона в неделю). Кроме того, NO в баллонах окисляется до двуокиси NO₂, а время его жизни ограничено. Все это требует жесткой логистики и лимитирует расстояние для транспортировки баллонов.

Самой острой и неотложной проблемой, которая наблюдается почти при всех врожденных и приобретенных заболеваниях у новорожденных и недоношенных детей, стала хроническая неонатальная легочная гипертензия (ЛГ)- тяжелейшее заболевание с высокой летальностью (2-3 случая на 1000) новорожденных). Однако вплоть до 2024 г. все селективные вазодилататоры для новорожденных имели в РФ статус off-label [5]. Для сравнения, в 1999 г. смесь NO с воздухом была одобрена для лечения ЛГ в США, а затем в Японии и большинстве стран ЕС. Затем ее стали широко использовать для лечения многих легочных и сердечных заболеваний и у взрослых. Как правило, сейчас в качестве коммерчески оправданной системы доставки NO и пользуются баллоны под давлением. Однако они громоздки, имеют высокую стоимость и требуют надежной системы поставок.

NO в педиатрии и неонатологии. Немного истории и создание аппарата «Тианокс»

Несмотря на значительный вклад отечественных ученых в развитие фундаментальных основ педиатрии и неонатологии, показатели детской и особенно младенческой смертности в России на протяжении всего XX века существенно превышали таковые в Европе и США [14, 15]. (Именно эти показатели считаются индикатором состояния систем здравоохранения в стране в целом). Первопричина этого - отсутствие отечественных разработок и промышленного производства лечебного и диагностического оборудования для отделений терапии и реанимации детских больниц, что не позволяло оказывать необходимую помощь новорожденным, особенно родившимся преждевременно. Первый инкубатор, созданный русским врачом Георгом фон Рюлем с 1835 г. в Санкт-Петербурге, представлял собой 2 металлические ванны, окруженные слоем теплой воды. Лишь спустя 60 лет Франции появился прототип современного инкубатора для выхаживания новорожденных, где ребенок в плетеной корзине обогревался в боксе с помощью газовой горелки [15]. Далее это устройство совершенствовалось, и только в 1947 г. в лечебные учреждения поступил прародитель современных кювезов. Это изобретение Денюса и Тарнье означало переворот в педиатрии: в соответствии со статистикой уже в конце XIX века значительно (с 66 до 38 % !!!) снизилась смертность среди недоношенных детей массой тела до 2 000 г.

Однако указанные проблемы в жизни новорожденных не ограничивались только переохлаждением - на первом плане всегда были проблемы с дыханием из-за незрелости легочной ткани новорожденных. С 1980 – х гг. в мировой клинической практике стали с успехом применяться препараты сурфактанты (Куросурф, Италия), Таурактант и др. (Россия). Эти препараты запатентованы, дороги и малодоступны, и ни наша медицинская промышленность, ни фармацевтические компании не смогли тогда предложить врачам препаратов и оборудования по категории жизнесохранения, а общая ситуация изменялось не в нашу пользу. Было даже признано, что состояние отечественного здравоохранения в конце XIX - начале XX века определилось как «демографический крест» [15].

Начало изменений к лучшему в РФ следует отнести к совершенствованию диагностики, включая респираторный дистресс-синдром (РДС) у новорожденных: именно внедрение протокола оценки и назначения респираторной терапии, основу которой составила

шкала Доунс [Downes J.J. et al., цит .по 15]. позволило резко снизить младенческую смертность в РФ.

С 1970 гг. в практике отечественной неонатологии начали использоваться аппараты традиционной искусственной вентиляции легких «Млада» и «Вита», однако случаи осложнений при этом оставались значительными.

На помощь пришли новейшие биотехнологии. *В 2019 г. в России был создан плазмо-химический генератор NO из окружающего воздуха при использовании неравновесной плазмы искрового разряда «Тианокс». При диффузном режиме разряда для эффективного синтеза NO с участием возбужденных молекул азота N^2+ по цепному механизму реакции Зельдовича- Семенова удалось получить NO –содержащую газовую смесь высокого качества без токсичных продуктов. Оксид азота в нем синтезируется из окружающего воздуха при атмосферном давлении, комнатной температуре и импульсно- периодических высоко-вольтовых диффузионных разрядах атмосферного давления, что обеспечивает синтез NO в неравновесной низкотемпературной плазме. Аппарат работает автономно. После блока очистки газовая смесь может быть подана в терапевтический контур пациента, где он перемешивается с основным дыхательным потоком (компрессор, аппарат ИВЛ и т.д.). Приказом Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения аппарат «Тианокс» допущен к обращению на территории РФ. Ведется подготовка экспортного варианта аппарата и разработка его новых модификаций. «Тианокс» создан коллективом ученых ФГУП «РФЯЦ - ВНИИЭФ» под руководством д.ф.-м.н., член- корр. РАН В.Д. Селемира [16].

К 2024 г. клиническая апробация российского аппарата «Тианокс» проведена в медицинских организациях более чем 50 субъектов РФ. По ее итогам аппарат признан высоко эффективным для лечения персистирующей легочной гипертензии новорожденных (ПЛГН), респираторного дистресс синдрома (РДС), врожденной пневмонии, раннего неонатального сепсиса, тяжелой асфиксии при рождении. Аппарат прекрасно зарекомендовал себя для использования в транспортировке новорожденных. [16]. При добавлении NO (аппарат «Тианокс») к стандартному лечению внебольничной пневмонии отмечены положительный эффект на клинический статус и маркеры воспаления, хорошая переносимость процедур и их безопасность, сокращен период госпитализации пациентов. Продолжаются клинические исследования безопасности высоких доз ингаляционного оксида азота с применением аппарата «Тианокс» у пациентов с различными диагнозами.

Комплекс результатов многопланового изучения NO с аппаратом «Тианокс» это основа новейшего направления в науке - терапии с использованием медицинских газов.

В заключение отметим, что впервые гипотензивное действие газообразного NO **только в отношении малого круга кровообращения** было продемонстрировано Фратаччи с соавт. (1991 г) при ингаляции ягнятам газообразного потока NO в концентрации 80 ppm. При этом использовался газообразный NO из баллонов, который хранился под давлением значительно большим, чем 1 атм. и мог трансформироваться в диоксид и закись азота (NO_2 и N_2O) по стехиометрической реакции : $3NO \rightarrow NO_2 + N_2O$.

Этот факт инициировал проведение многочисленных экспериментов, где было установлено **различие в активности эндо- и экзогенного NO** в организме человека и животных.

Эндогенный NO, синтезируемый в эндотелиальных, нейрональных и иммунокомпетентных клетках, при участии соответствующих NO- синтаз, связываясь со свободным железом и тиоловыми лигандами, образует М- и Б- ДНКЖ с лигандами- соединения, способные оказывать как регуляторное (позитивное), так и цитотоксическое (негативное) действие .

Что касается **экзогенного**, ингаляционного NO, то, по мнению А.Ф. Ванина, ингаляционный NO по-видимому вряд ли способен образовывать в клетках и тканях организма стабилизирующие его ДНКЖ с тиоловыми лигандами. Этот вывод подтверждается результатами ЭПР- исследований крови и тканей крыс, ингалированных газообразным NO.

Контакт экзогенного NO с кровью способствует его превращению в **катионы нитрозо-ния NO^+** . При этом даже высокие дозы NO –до 1000 -2000 ppm – не оказывают заметного токсического действия на организм человека и животных. **Но эти катионы токсичны** для

патогенных вирусов и бактерий, по-видимому вследствие S- нитрозирования тиол-содержащих белков, критически важных для пролиферации этих патогенов. Однако это положение нуждается в широком экспериментальном подтверждении.

Необходимо отметить благоприятное действие **NO газа** на поверхностные кожные раны, ускорять их заживление, имитируя аналогичную способность **эндогенного NO**. **Механизмы этого явления пока не ясны**. Не исключена антиоксидантная активность организма в ответ на формирование пероксинитрита из NO и супероксида.

Нами было впервые установлено, что катионы нитрозония NO^+ , (входящие наряду с незаряженной молекулой NO в состав ДНКЖ-GSH) являются эффекторами иммунитета и регуляторами жизнеспособности условных патогенов сем. Eubacteriaceae = доминанты Микробиома человека, определяющего весь метаболизм, включая резистентность к патогенным бактериям и вирусам. **Это новая функция NO^+** , в дополнение к фундаментальным - пост-трансляционной модификации тиол- содержащих протеинов S-нитрозированием и продукции RS-NO. В работе изучен диэтилдитиокарбамат, который селективно связывается с МНКЖ (Fe^{2+} - NO) и “выводит из игры NO”, накапливая в клетках катионы NO^+ , которые продуцируются сигнальными ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами в результате реакции диспропорционирования двух молекул NO/ NO^+ и являются мощными эффекторами клеточного иммунитета.

Рисунки к статье Васильевой С.В. [цитируется по сс. 14 и 16].

Рис. 1. Синтез NO в организме

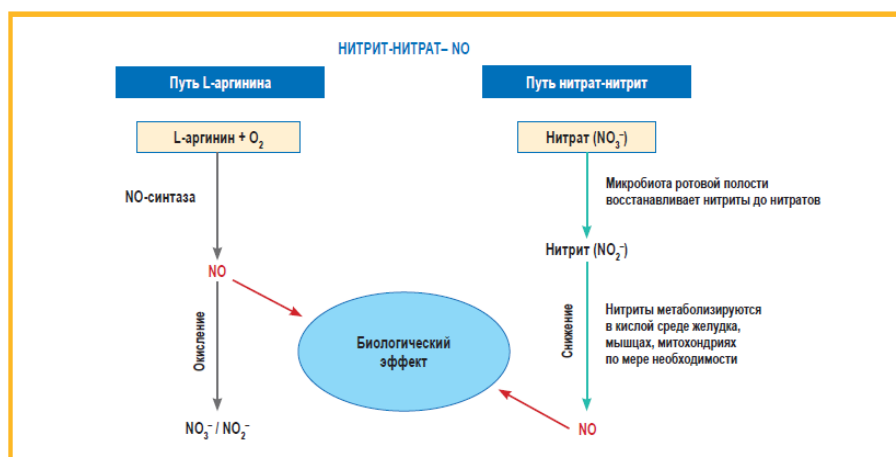


Рис. 2. Ингаляционный аппарат NO «Тианокс»



Литература

1. Corker H., Poole R.K. Nitric oxide formation by *Escherichia coli*: dependence on nitric reductase, No-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp // *J. Biol. Chem.* 2003.278.34. P. 31584-31592.
2. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling // *Biosci Rep.*1999.V.19. P.133-154.
3. Ignarro L.J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview // *J. Physiol Pharmacol.* 2002. 53. P. 503-514.
4. Furchgott R.F. Endothelium-derived relaxing factor : discovery, early studies, and identification as nitric oxide. // *Biosci Rep.*1999. 19. (4). P. 235 -251.
5. Ostwald W. Process of manufacturing nitric oxide: Patent US No.858904, July 02, 1907. <https://patentimages.storage.googleapis.com/93/97/63/d4b8leb9a5c399/US858904.pdf>.
6. Буров А.А., Зубков В.В. Оксид азота в терапии критических состояний у новорожденных и недоношенных детей// *Пульмонология.* 2024. 34(3) 340-349.DOI 10.18093/0869-2024-340-349.
7. Алдошин С.М., Санина Н.А. Функциональные нитрозильные комплексы железа – новый класс доноров монооксида азота для лечения социально значимых заболеваний. //«Фундаментальные науки – медицине: Биофизические медицинские технологии М.: МАКС Пресс, 2015. С. 72-102.
8. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа – эндогенные сигнальные агенты в клетках и тканях животных и человека. // *Биофизика* 2004. Т.49. 4. С.581 – 586.
9. Vanin A.F. (2019) Dinitrosyl iron complexes as a “working form” of nitric oxide in living organisms. Cambridge: Cambridge Scholar Publishing.
10. Lobysheva II, Stupakova MV, Mikoyan VD, Vasilieva SV, Vanin AF. Induction of the SOS DNA repair response in *E. coli* by nitric oxide donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and S-nitrosothiols. // *FEBS Lett.*1999; 454:177- 180.
11. Vasilieva S.V., Stupakova M. V., Lobysheva I.I. et al. Activation of the *Escherichia coli* SoxRS-regulon by nitric oxide and its physiological donors.// *Biochemistry*,2001.66(9).984-988.
12. Васильева С.В., Стрельцова Д.А., Романова Ю.М., Толордава Э.Р// «Фундаментальные науки - медицине: Биофизические медицинские технологии, М.: МАКС Пресс, 2015. С.103-134.
13. Zu B., Blaes A.H., Casey N., Rayhtsaum G., .. Zapol W.M. Detection and removal of impurities in nitric oxide generated from air by pulsed electric discharge// *Nitric Oxide.* 2016. 60. P.60-23. PMID: 27592386. doi: 10.1016/j.niox.2016.08.005].
14. Чучалин А.Г. Оксид азота - молекула XXI века. // *Пульмонология*, 2024, 34(3).С. 326-333. DOI: 10.18093/0869-0189-2024-34-3- 326-333.
15. Володин Н.Н. Новые подходы к решению старых проблем: уроки истории // *Пульмонология.* 2024. 34(3). С. 326-333. DOI: 10.18093/0869-0189-2024-34-3-334-339.
16. Селемир В.Д., Буранов С.Н., Шишин А.С. Современные инженерные решения создания оригинального отечественного генератора оксида азота («Тианокс»)//*Пульмонология.* 2024. 34(3). С.409-416. DOI: 10.18093/0869- 0189-2024- 34-3-409-416.

Сведения об авторах

Светлана Васильевна Васильева

доктор биол. наук, гл. научный сотрудник
Институт Биохимической Физики им. Н.М.
Эмануэля РАН, засл. деятель науки РФ.
Москва, Российская Федерация
Эл. почта: svasilieva@polymer.chph.ras.ru

Information about author

Vasil'eva Svetlana Vasil'evna

Doctor of Science (Biol.), Chief Researcher
N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Mos-
cow, Russian Federation
E-mail: svasilieva@polymer.chph.ras.ru

УДК 620.3+546.26:547.963.4

ГРНТИ 34.35.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.112-114

А.Ф. Топунов¹, О.В. Космачевская¹, Э.И. Насыбуллина¹,

И.С. Рябоконт², В.П. Седов², М.Е. Взнуздаев²

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

²Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФУЛЛЕРЕНОЛОВ ПРИ ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ГЕМОГЛОБИНА

Было изучено антиоксидантное и антирадикальное действие фуллеренолов C60 и C70 в системе перекисного окисления гемоглобина (Hb). Окислителем Hb был гидропероксид трет-бутила (t-BOOH) — аналог органических гидропероксидов, образующихся в живых системах. Действие фуллеренолов сравнивали с радикальных интермедиатов регистрировали с помощью хемилюминесцентного анализа, используя в качестве активатора люминол. Антирадикальное действие исследуемых веществ зависело от их концентрации. В высоких концентрациях все вещества полностью подавляли хемилюминесценцию, в низкой концентрации наблюдалось прооксидантное действие. Антиоксидантное действие фуллеренола C60 было более выражено, чем у C70, что согласуется с данными хемилюминесцентного анализа.

Ключевые слова: гемоглобин, фуллеренол, перекисное окисление, глутатион, аскорбат, сорбитол

A.F. Topunov¹, O.V. Kosmachevskaya¹, E.I. Nasybullina¹,

I.S. Ryabokon², V.P. Sedov², M.E. Vznuzdaev²

¹Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center «Kurchatov Institute», Gatchina, Russia

ANTIOXIDANT EFFECT OF FULLERENOLS AT HEMOGLOBIN PEROXIDATION

The antioxidant and antiradical effects of fullerlenols C60 and C70 in the hemoglobin (Hb) peroxidation system were studied. Hb was oxidized by tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH), which is an analog of organic hydroperoxides formed in living systems. The effect of fullerlenols was compared with natural antioxidants: glutathione, ascorbate and sorbitol. The formation of free radical intermediates was registered by chemiluminescence analysis using luminol as an activator. The antiradical effect of the studied compounds depended on their concentration. At high concentrations, all substances completely suppressed chemiluminescence; at low ones, a pro-oxidant effect was observed. The antioxidant effect of fullerlenol C60 was higher than of C70, which is consistent with the data of chemiluminescence analysis.

Keywords: hemoglobin, fullerlenol, peroxidation, glutathione, ascorbate, sorbitol

Введение

Фуллерены — соединения, представляющее собой выпуклые замкнутые многогранники, составленные из трёхкоординированных атомов углерода. В 1996 г. Роберту Кёрлу, Харолду Крото и Ричарду Смолли была присуждена Нобелевская премия по химии за открытие фуллеренов. Наиболее распространёнными являются фуллерены C60 и C70, содержащие по 60 и 70 атомов углерода, соответственно. Фуллерены и подобные им соединения содержатся и в природе, например, в горных породах типа шунгита. Фуллеренолы — это модифицированные фуллерены с присоединёнными гидроксильными группами, иногда их называют гидроксифуллеренами. В отличие от гидрофобных фуллеренов, фуллеренолы

хорошо растворимы в воде и водных растворах. Количество ОН-групп в молекуле фуллеренола может варьировать, поэтому формулу фуллеренола на основе фуллерена C₆₀ можно записать как C₆₀(ОН)_{30±2}. Фуллеренолы реакционно-активны и могут проявлять антиоксидантные свойства [1]. Однако до настоящего времени не были изучены антиоксидантные свойства фуллеренолов при перекисном окислении гемоглобина (Hb).

Цель работы

Изучить в опытах *in vitro* антиоксидантное и антирадикальное действие фуллеренолов C₆₀ и C₇₀ в сравнении с водорастворимыми природными антиоксидантами — глутатионом (GSH) и аскорбатом (Asc), а также с многоатомным спиртом сорбитолом в системе перекисного окисления гемоглобина (Hb).

Материалы и методы

В работе были использованы фуллеренолы C₆₀ и C₇₀, синтезированные в Петербургском институте ядерной физики им. Б.П. Константинова (ПИЯФ, Гатчина, Россия) Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» [2, 3]. Полученные фуллеренолы были идентифицированы с помощью Фурье ИК-спектроскопии на спектрометре IRTracer-100 («Shimadzu», Япония) в диапазоне 4000–400 см⁻¹ и MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии на масс-спектрометре Axima Resonance («Shimadzu», Япония). В качестве субстрата перекисного окисления был использован гемоглобин из эритроцитов быка («Sigma Aldrich», США). Эксперименты по перекисному окислению Hb пероксидом трет-бутила (t-BOOH) проводили в модельной системе, описанной нами ранее [4].

Полученные результаты

Было изучено антиоксидантное и антирадикальное действие фуллеренолов C₆₀ и C₇₀ в системе перекисного окисления гемоглобина в сравнении с водорастворимыми природными антиоксидантами глутатионом, аскорбатом и сорбитолом. Окисление Hb проводили гидропероксидом трет-бутила, который является аналогом органических гидропероксидов, образующихся в живых системах. В ходе реакции окисления образуются алкоксильные (t-BO[•]) и пероксильные (t-BOO[•]) радикалы трет-бутила. Образование свободнорадикальных интермедиатов регистрировали с помощью хемилюминесценции, используя в качестве активатора люминол. Антирадикальное действие исследуемых веществ зависело от их концентрации. В высоких концентрациях (0,65 и 1,05 мМ) все вещества полностью подавляли хемилюминесценцию свободнорадикальных интермедиатов, в низкой концентрации (0,15 мМ) наблюдалось прооксидантное действие. В опытах с фуллеренолами увеличение количества свободнорадикальных интермедиатов относительно контроля было не столь значительно, как в случае глутатиона и аскорбата. В реакции глутатиона с органическими радикалами образуются тиильные радикалы (RS[•]), которые приводят к возрастанию интенсивности хемилюминесценции. Полученные данные можно интерпретировать в рамках теории горемезиса. Было также изучено антиоксидантное действие фуллеренолов по образованию продуктов окисления Hb с тетраметилфенилендиамином (TMPD), широко используемым редокс-индикатором. Фуллеренолы подавляли окисление TMPD во всем диапазоне исследуемых концентраций. Антиоксидантное действие фуллеренола C₆₀ было более выражено, чем C₇₀. Это согласуется с данными хемилюминесцентного анализа. Однако по антиоксидантному действию фуллеренолы в этой системе уступали глутатиону и аскорбату.

Выводы

Полученные результаты показывают, что фуллеренолы, как и другие модифицированные фуллерены, благодаря их антиоксидантным и антирадикальным свойствам, могут быть в перспективе использованы для терапевтических целей, в том числе при различных патологиях, приводящим к нарушениям функционирования гемоглобина, эритроцитов и системы крови в целом. Особо следует отметить анемию и гемоглобинопатии различного генеза, при которых гемоглобин переходит в окисленную (мет) или феррильную форму. При этом водорастворимые фуллеренолы могли бы быть частью комплексной терапии подобных заболеваний, как это предполагается для лечения болезни Хантингтона, считающейся многофакторным заболеванием, сопровождающимся окислительным стрессом в клетках нервной системы

[1]. Это, безусловно, потребует дополнительных исследований в различных модельных системах и подбора условий для потенциального фармацевтического использования фуллеренолов в будущем.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения:

Фуллеренолы (гидроксिलированные фуллерены) C60 и C70 могут проявлять антиоксидантные и антирадикальные свойства в системе перекисного окисления гемоглобина, причем знак их действия зависит от концентрации.

Литература

1. Bolshakova O.I., Borisenkova A.A., Golomidov I.M., Komissarov A.E., Slobodina A.D., Ryabova E.V., Ryabokon I.S., Latypova E.M., Slepneva E.E., Sarantseva S.V. Fullerenols prevent neuron death and reduce oxidative stress in Drosophila Huntington's disease model. // Cells. 2023. V. 12. e170.
2. Bolshakova O., Borisenkova A., Suyasova M., Sedov V., Slobodina A., Timoshenko S., Varfolomeeva E., Golomidov I., Lebedev V., Aksenov V., Sarantseva S. In Vitro and in Vivo study of the toxicity of fullerenols C60, C70 and C120O obtained by an original two step method. // Mater. Sci. Eng. C. 2019. V. 104. e109945.
3. Седов В.П., Сжогина А.А. Способ получения высоко водорастворимых фуллеренолов. Патент РФ 2558121. Заявл. 04.04.2014. Оpubл. 27.07.2015.
4. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Pokidova O.V., Sanina N.A., Topunov A.F. Effects of nitrosyl iron complexes with thiol, phosphate, and thiosulfate ligands on hemoglobin. // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. e7194.

Сведения об авторах

Алексей Федорович Топунов,

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией, Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
Эл. почта: aftopunov@yandex.ru

Ольга Владимировна Космачевская,

канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
Эл. почта: rizobium@yandex.ru

Эльвира Ильгизовна Насыбуллина,

канд. биол. наук, науч. сотр., Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия
Эл. почта: lvirus198709@rambler.ru

Ирина Сергеевна Рябоконт,

мл. науч. сотр., Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия
Эл. почта: neferirina@yandex.ru

Виктор Петрович Седов,

ст. науч. сотр., Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия
Эл. почта: victorsedov61@gmail.com

Марат Евгеньевич Взнуздаев,

К.х.н., зав. отделом, Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия
Эл. почта: vznuzdaev_me@pnpi.nrcki.ru

Information about authors

Alexey Fedorovich Topunov,

DSc, PhD (Biol.), Professor, Head of Laboratory, Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Moscow, Russian Federation
E-mail: aftopunov@yandex.ru

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya,

PhD (Biol.), Senior Research Scientist, Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Moscow, Russian Federation
E-mail: rizobium@yandex.ru

Elvira Ilgizovna Nasybullina,

PhD (Biol.), Research Scientist, Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Moscow, Russian Federation
E-mail: lvirus198709@rambler.ru

Irina Sergeevna Ryabokon,

Junior Research Scientist, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center «Kurchatov Institute», Gatchina, Russian Federation
E-mail: neferirina@yandex.ru

Victor Petrovich Sedov

Senior research scientist, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Russian Federation
E-mail: victorsedov61@gmail.com

Marat Evgenievich Vznuzdaev

PhD (Chem.), Head of the Department, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Russian Federation
E-mail: vznuzdaev_me@pnpi.nrcki.ru

УДК 577.115:597.552.51(282.247.1)
ГРНТИ 34.35.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.115-119

Д.И. Манойлова, С.А. Мурзина, Воронин В.П.,
Ефремов Д.А., Немова Н.Н.
Институт биологии – обособленное подразделение Феде-
рального исследовательского центра «Карельский научный
центр Российской академии наук» (КарНЦ РАН)

РАЗНОКАЧЕСТВЕННОСТЬ СОСТАВА ЛИПИДОВ СМОЛТОВ ГОРБУШИ (*ONCORHYNCHUS GORBUSCHA*) ИЗ РАЗНЫХ РЕК БАСЕЙНОВ БЕЛОГО И БА-РЕНЦЕВА МОРЯ: К ВОПРОСУ О ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЕ ВИДА И СМОЛТИФИКАЦИИ

*Изучен липидный и жирнокислотный состав смолтов горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) из рек бассейнов Белого и Баренцева морей. Несмотря на общую схожесть липидного профиля молоди исследуемого вида из водотоков двух бассейнов, выявлены значимые различия между особями отдельных рек. Установленные различия связаны с различием местообитаний смолтов по набору экологических факторов — температура воды, трофические условия и гидрологический режим. Выявлены ключевые адаптационные механизмы на уровне жирнокислотного спектра, связанные с переходом смолтов к обитанию в море. Полученные данные определяют роль липидов и их жирнокислотных компонентов как одного из ведущих биохимических индикаторов адаптации в процессе смолтификации и разнокачественности смолтов горбуши на данном этапе развития.*

Ключевые слова: горбуша (*Oncorhynchus gorbuscha*), смолтификация, липиды, жирные кислоты, эколого-биохимическая адаптация, Баренцево море, Белое море, популяционная структура, биохимические индикаторы.

D.I. Manoilova, S.A. Murzina, V.P. Voronin, D.A. Efremov, N.N. Nemova
Institute of Biology of the Karelian Research Centre
of the Russian Academy of Sciences (IB KaRC RAS)

THE HETEROGENEITY OF THE LIPID COMPOSITION OF PINK SALMON (*ONCORHYNCHUS GORBUSCHA*) TARTS FROM DIFFERENT RIVERS OF THE BASINS OF THE WHITE AND BARENTS SEAS: ON THE ISSUE OF THE POPULATION STRUCTURE OF THE SPECIES AND ITS SMOLTIFICATION

*The lipid and fatty acid profiles of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) smolts from rivers belonging to the White Sea and Barents Sea basins were analyzed. While the general lipid composition of juveniles from the two basins performed notable similarities, statistically significant differences were found among individuals collected from certain rivers. These differences were associated with habitat-specific ecological factors, including water temperature, trophic conditions, and hydrological regimes. Critical adaptive mechanisms at the level of fatty acid composition, reflecting the transition of smolts to marine environments, were detected. The results emphasize the pivotal role of lipids and their fatty acid constituents as key biochemical markers of adaptation during smoltification, as well as the biochemical heterogeneity in pink salmon smolts at this stage of ontogeny.*

Keywords: pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*), smoltification, lipids, fatty acids, adaptation, freshwater ecosystems, temperature regime, trophic conditions, Barents Sea, White Sea, population structure, biochemical indicators.

Введение

Горбуша, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum 1792), является наиболее экологически пластичным видом дальневосточных лососей с высокими адаптивными возможностями, благодаря чему успешно интегрированных в пресноводные реки Кольского полуострова в 1950-1960-х гг. [1, с. 46]. Горбуша является инвазивным видом для районов Баренцева и Белого моря, а также северной части Атлантического океана. Анадромные рыбы, такие как горбуша

(*Oncorhynchus gorbuscha*), в процессе жизненного цикла, который обычно составляет строго 2 года, за редким исключением, включает «морской» и «речной» периоды, где один из важнейших этапов развития связан с подготовкой молоди к морской среде обитания – смолтификацией, которая включает сложную биохимическую и физиологическую адаптацию при переходе из пресноводной среды в морскую.

Одним из важнейших биохимических индикаторов развития смолтов является липидный статус, а вариации уровня жирнокислотного состава влияют на метаболизм и адаптации к изменяющимся условиям среды, таким как трофика, температурный и гидрологический режимы т.д. [8, с. 535 ; 7, с. 324].

Цель работы.

Проведение биохимического профилирования по уровню липидного обмена (комбинированный набор взаимосвязанных показателей) у смолтов горбуши пяти рек, принадлежащих бассейну Баренцева и Белого морей; на основании данного анализа выявить общие и специфические отличия (биохимическая разнокачественность) молоди горбуши и их взаимосвязь с физиологическим состоянием организма и экологическими условиями среды.

Материалы и методы.

Отбор проб проводили в мае-июне из 5 рек бассейнов Баренцева и Белого морей (река Воронья и реки Кереть, Умба, Варзуга, Индера соответственно). Температурный режим на момент сбора проб в реках бассейна Белого моря варьировал и составлял: река Кереть – 9,7 °С, река Умба – 5,4 °С, река Варзуга – 9,1 °С, река Индера – 8,7 °С. При этом, температурный режим в реке Воронья бассейна Баренцева моря был значительно ниже – 2,1 °С. Образцы мышечной ткани фиксировали в жидком азоте до анализа в лаборатории, где они были гоменизированы и перефиксированы в смеси хлороформ-метанол (2:1 по объёму). Биохимическое профилирование на уровне липидного обмена путем анализа липидного профиля и полного жирнокислотного профиля смолтов горбуши из разных рек проводили по содержанию общих липидов (ОЛ), основных липидных классов – общих фосфолипидов (ФЛ) холестерина (ХС), свободных жирных кислот (СЖК), моно (МАГ)-, ди (ДАГ)-, триацилглицеринов (ТАГ), эфиров холестерина (ЭХС) и восков, а также, осуществляли анализ состава жирных кислот (около 80 индивидуальных ЖК) и их семейств. Анализ общих липидов, классов липидов проведен с помощью высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ, САМАГ, Швейцария). Качественный и количественный состав жирных кислот осуществляли методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором (ГХ-МСД, α -Маэстро, Сайтегра, Россия). Биохимические исследования были выполнены на базе лаборатории экологической биохимии и с использованием оборудования ЦПК КарНЦ РАН.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием языка программирования R (версия 4.2.2.) в среде разработки RStudio (<https://www.posit.co>) с использованием дополнительных пакетов: readxl (версия 1.3.1), tidyverse (версия 1.3.0), pastecs (версия 1.1.1), vegan (версия 2.5–7), factoextra, psych, GPArotation.

Полученные результаты.

Проведено липидное профилирование смолтов горбуши, отловленных в реках бассейна Белого и Баренцева морей (Кереть, Умба, Варзуга, Индера и Воронья соответственно) нечетной линии (2023 г.). Показаны достоверные различия по содержанию ОЛ (% от сухого вещества) у смолтов всех обследованных пресноводных водотоков. Наибольшее количество ОЛ показано для молоди из реки Индера (15,8%) по сравнению с рыбой из рек Кереть, Варзуга и Умба (14,5%, 11,2% и 10,6% соответственно), а также смолтами из реки Воронья (12,2%). Установлены достоверные различия между молодью горбуши из разных рек вылова по отдельным классам липидов – как нейтральных, так и полярных классов – в мышечной ткани. Отмечено, что для смолтов горбуши из реки Кереть характерно более высокое содержание сигнальных и лабильных молекул МАГ по сравнению со смолтами других обследованных рек. Кроме того, в реке Кереть установлена самая высокая температура воды (9,7-11,5°С), тогда как в других реках данный показатель не превышал 9,1°С. Отмечено, что для горбуши из реки Кереть характерно более высокое содержание ФХ, основного структурного липида

биологических мембран, по сравнению с горбушей из других рек. Известно, что фосфолипидный состав лососевых рыб является видоспецифичным признаком и демонстрирует принадлежность к конкретному виду - ранее нами было показано такое соответствие для лосося и кумжи [2, с. 40] что в рамках настоящего исследования можно отнести и к горбуше. Профиль нейтральных липидов в большей степени отражает взаимодействие организма со средой, различия экологических условий обитания. Тут отметим, что особи из р. Воронья по липидному профилю (за исключением содержания СЖК) достоверно отличаются от смолтов других рек, другого бассейна моря.

Установлены достоверные различия между горбушей из разных рек вылова по жирнокислотному профилю (% от суммы ЖК) мышечной ткани, что свидетельствует о четких различиях условий обитания и адаптации ЖК-метаболизма к ним. Отмечено, что для рек Варзуга и Индэра более характерно накопление физиологически значимых кислот *cis*20:5(n-3) и *cis*22:6(n-3), а также *cis*22:1(n-9) и *cis*22:5(n-3). Напротив, для горбуши из реки Кереть характерно более высокое содержание n-6 ПНЖК (*cis*18:2(n-6), *cis*20:4(n-6)), а также МНЖК (*cis*16:1(n-7), *cis*20:1(n-9)) и 14:0 жирных кислот по сравнению со смолтами горбуши из других рек. Полученные результаты указывают на различия не только в температурных условиях рек, но и кормовых условиях, которые являются экзогенным фактором, влияющим на регуляцию метаболизма ЖК. За счет различий в экологических условиях обитания в обследованных реках может складываться различающаяся структура объектов питания и их сообществ, и, как следствие, определяет ЖК-состав корма и, соответственно, отражаться на ЖК-составе смолтов горбуши. Факторный анализ жирных кислот смолтов горбуши из исследованных рек позволил выделить и ранжировать ЖК и их группировки, связанные, преимущественно со смолтификацией. Основную группировку распределяющих особей ЖК составили – 16:0, 18:0, 20:0, 22:5(n-3), 20:5(n-3) и 20:4(n-6). Данную группировку составляют кислоты, связанные с трофической обеспеченностью смолтов и, в зависимости от этого, их способностью к конвертации таковых в организме. Известно [6, с. 89], что лимитирующим фактором этих метаболических превращений является качество и количество пищи и генетическая детерминированность метаболизма. Согласно исследованию Д.С. Павлова и коллег [8, с. 535], в процессе онтогенеза лососевых наблюдается увеличение содержания арахидоновой кислоты (20:4(n-6)), особенно выраженное на стадии смолтов. Это свидетельствует об активации ферментативных путей десатурации и элонгации жирных кислот в организме рыб. Ранее Sheridan [11, с. 534] установил, что подобные метаболические изменения сопряжены с перестройкой гормонального фона, наиболее ярко выраженной у смолтов. Арахидоновая кислота, как известно, служит предшественником биологически активных липидных медиаторов — простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов, оказывающих влияние на гормональную регуляцию [3, с. 117]. Выявленные в рамках данной работы изменения профиля жирных кислот, особенно на смолтовой стадии, могут быть связаны с процессами, определяющими переход между пресноводной и морской стадиями жизненного цикла. Такая трансформация липидного состава часто предшествует морской миграции рыб [9, с. 1394]. Вторую группировку ЖК составляют следующие: 20:1(n-9), 20:4(n-6), 16:1(n-7), 14:0, 18:1(n-9) и 22:6(n-3). Жирные кислоты 20:1(n-9), 18:1(n-9) и 16:1(n-7) являются важными компонентами энергетического метаболизма и структуры клеточных мембран, отражая особенности питания и обмена веществ в период перехода к морскому типу существования [12, с. 156]. Миристиновая кислота (14:0) участвует в модификации мембранных белков и стабилизации клеточных структур [5, с. 349]. Группирование этих ЖК может указывать на «ориентированную» адаптивную перестройку липидов и ЖК, необходимую для успешного перехода (миграции) организма к солоноводным условиям среды (покатная миграция в море). Третью группировку выделяют две незаменимые жирные кислоты — линолевая (18:2(n-6)) и α -линоленовая (18:3(n-3)), играющие ключевую роль в обеспечении нормального роста и метаболизма лососевых. Эти кислоты не синтезируются в организме рыб и поступают в организм с кормом [4, с. 1518]. Известно, что в пресноводных условиях лососевые интенсивно потребляют разнообразных беспозвоночных, которые богаты данными кислотами 18:1(n-9), 18:2(n-6), 18:3(n-3) [10, с. 238].

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: проведенное биохимическое профилирование на уровне липидного обмена путем анализа липидного профиля и полного жирнокислотного профиля смолтов горбуши из разных рек бассейна Белого и Баренцева морей по содержанию общих липидов (ОЛ), а также основных липидных классов – фосфолипидов (ФЛ), включая индивидуальные фракции (фосфатидилхолин – ФХ, фосфатидилэтаноламин – ФЭА, фосфатидилсерин – ФС, фосфатидилинозитол – ФИ, сфингомиелин – СФМ, лизофосфатидилхолин – ЛФХ), холестерин, свободные жирные кислоты, моно-, ди-, триацилглицерины, эфиры холестерина, воска; проведен нецелевой анализ жирных кислот, идентифицировано более 80 компонентов. Обнаружение достоверных отличий по содержанию общих липидов и отдельных классов липидов смолтов горбуши из обследованных рек и их связь с экологическими условиями среды. Показана возможность применения фосфолипидного профиля в качестве видовой идентификации лососевых рыб (т.н. различия фосфолипидного состава молоди атлантического лосося, кумжи и горбуши). Установлены достоверные различия между горбушей из разных рек вылова по жирнокислотному профилю мышечной ткани, что свидетельствует о четких различиях условий обитания (температуры, солености и трофики) и адаптации ЖК-метаболизма к ним в пресноводной фазе жизненного цикла.

Выявлено, что смолты из реки Воронья (басс. Баренцева моря) существенно отличались от молоди рек бассейна Белого моря, что может указывать на значимые отличия горбуши на уровне липидного обмена между пресноводными водотоками двух разных бассейнов, что, в конечном счете, определяет выживаемость и репродукцию вида в данных, конкретных условиях, и их специфичность. Последнее требует проведения дальнейших и более глубоких исследований по данной тематике.

Результаты настоящего исследования демонстрируют, что липидный состав и жирнокислотный состав рыб является важными «агрегированным» биохимическим индикатором не только физиологического состояния смолтов, их готовности к смолтификации, мобильности компенсаторных реакций и процессов, но использоваться для изучения популяционной структуры вида.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда № 24-14-00074 «Эколого-биохимические адаптации при формировании покатных, нерестовых и нагульных стад горбуши, интродуцированной на северо-западе России, выявление критически значимых этапов жизненного цикла и влияние на аборигенные виды лососевых».

Литература.

1. Бакитанский В. Н. О вселении дальневосточных лососей в реки Кольского полуострова // Рыбное хозяйство. – 1970. – № 3. – С. 45–47.
2. Мурзина С. А. Роль липидов и их жирнокислотных компонентов в эколого-биохимических адаптациях рыб северных морей: автореф. дис. докт. биол. наук: 03.02.06 / Мурзина Светлана Александровна. — Москва, 2019. — 46 с.
3. Bell J.G., Tocher D.R., Sargent J.R. Fatty acid desaturation and elongation in fish // Biochemical Society Transactions. – 1995. – Vol. 23. – P. 115–120.
4. Bell J.G., McEvoy J., Tocher D.R., McGhee F., Campbell P.J., Sargent J.R. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid composition and hepatocyte fatty acid metabolism // Journal of Nutrition. – 1997. – Vol. 127, № 8. – P. 1513–1521.
5. Castell J.D., Sinnhuber R.O., Wales J.H., Lee D.J. Essential fatty acids in the diet of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) fry // Journal of Nutrition. – 1994. – Vol. 104, № 3. – P. 347–353.
6. Ghioni C., Porter A., Taylor G. et al. Metabolism of 18:4n-3 (stearidonic acid) and 20:4n-3 in salmonid cells in culture and inhibition of the production of prostaglandin F2 α (PGF2 α) from 20:4n-6 (arachidonic acid) // Fish Physiology and Biochemistry. – 2002. – Vol. 27. – P. 81–96.

7. Murzina S.A., Nefedova Z.A., Veselov A.E., Nemova N.N. Lipid metabolism in the parr-smolt transformation of Atlantic salmon // *Russian Journal of Developmental Biology*. – 2014. – Vol. 45, № 6. – P. 317–324.
8. Pavlov D.S., Kostin V.V., Mukhacheva T.A., Gruzdeva M.A. Changes in fatty acid composition during smoltification in Atlantic salmon *Salmo salar* L. // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2009. – Vol. 45, № 5. – P. 530–537.
9. Peng J., Himelbloom B.H., Crapo C.A., Smiley S. Fatty acid composition of muscle and skin lipids of wild and cultured Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) // *Journal of Food Science*. – 2003. – Vol. 68, № 4. – P. 1392–1395.
10. Sargent J.R., Tocher D.R., Bell J.G. The lipids // In: Halver J.E., Hardy R.W. (eds.) *Fish Nutrition*. – 3rd ed. – San Diego: Academic Press, 2002. – P. 181–257.
11. Sheridan M.A. Alterations in lipid metabolism during smoltification of salmonid fish // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. – 1989. – Vol. 46, № 3. – P. 530–538.
12. Tocher D.R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish // *Reviews in Fisheries Science*. – 2003. – Vol. 11, № 2. – P. 107–184.

Сведения об авторах

Манойлова Диана Ильинична

Инженер-исследователь лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

Эл. почта: dianamanoylova90@gmail.com

Information about author

Manoilova Diana I.

Research engineer of the Ecological Biochemistry Laboratory of the IB of the KarRC RAS, Petrozavodsk, Russian Federation

E-mail: dianamanoylova90@gmail.com

Мурзина Светлана Александровна

д.б.н., заведующая лабораторией экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

Эл. почта: murzina.svetlana@gmail.com

Murzina Svetlana A.

Doctor of Biological Sciences, head of the Ecological Biochemistry Laboratory of the IB of the KarRC RAS, Petrozavodsk, Russian Federation

E-mail: murzina.svetlana@gmail.com

Воронин Виктор Петрович

к.б.н., н.с. лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

Эл. почта: voronen-viktor@mail.ru

Voronin Viktor P.

PhD, Research Fellow of the Ecological Biochemistry Laboratory of the IB of the KarRC RAS, Petrozavodsk, Russian Federation

E-mail: voronen-viktor@mail.ru

Ефремов Денис Александрович

к.б.н., н.с. лаборатории экологии рыб и водных беспозвоночных Института биологии КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

Эл. почта: denisefremov@list.ru

Efremov Denis A.

PhD, Research Fellow of the Fish and Water Invertebrate Ecology Laboratory of the IB of the KarRC RAS, Petrozavodsk, Russian Federation

E-mail: denisefremov@list.ru

Немова Нина Николаевна

д.б.н., профессор, академик РАН, г.н.с. лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

Эл. почта: nnnemova@gmail.com

Nemova Nina N.

Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher of the Ecological Biochemistry Laboratory of the IB of the KarRC RAS, Petrozavodsk, Russian Federation

E-mail: nnnemova@gmail.com

УДК 612.015.3:576.3
ГРНТИ 34.35.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.120-123

Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин,
П.Ю. Мыльников, О.Н. Сучкова,
П.Д. Ананьева, Е.Н. Якушева
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

ТРАНСФИЦИРОВАННЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТРАНСПОРТА ЭНДОГЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

В статье представлены данные о возможности применения трансфицированных клеточных линий для изучения трансмембранного переноса эндогенных и экзогенных веществ. На примере, клеточной линии HEK293-OATP1B1 показано, что S-нитрозоглутатион не является субстратом OATP1B1, а глутатион может переноситься через клеточную мембрану с участием белка-транспортера.

Ключевые слова: транспортеры, трансмембранный перенос, нитрозоглутатион, глутатион, OATP1B1.

Yu.V. Abalenikhina, A.V. Shchulkin,
P.Yu. Mylnikov, O.N. Suchkova,
P.D. Ananyeva, E.N. Yakusheva
Ryazan State Medical University

TRANSFECTED CELL LINES FOR EVALUATION OF ENDOGENOUS SUBSTANCE TRANSPORT

The article presents data on the possibility of using transfected cell lines to study transmembrane transfer of endogenous and exogenous substances. Using the example of the HEK293-OATP1B1 cell line, it was shown that S-nitrosoglutathione is not a substrate for OATP1B1, and glutathione can be transferred across the cell membrane with the participation of a transporter protein.

Key words: transporters, transmembrane transfer, nitrosoglutathione, glutathione, OATP1B1.

Введение.

Белки-транспортеры играют важную роль в трансмембранном переносе эндогенных и экзогенных веществ, в том числе и лекарственных средств. К их основным представителям относят: Р-гликопротеин (Pgp), белок резистентности рака молочной железы (BCRP), полипептиды, транспортирующие органические анионы 1В1, 1В3 (OATP1B1, OATP1B3), транспортеры органических анионов 1 и 3 (OAT1, OAT3), транспортер органических катионов 2 (OCT2) [1, 2]. Поскольку нативные клеточные линии экспрессируют сразу несколько транспортеров, единственным подходом для оценки участия транспортеров в трансмембранном переносе веществ необходимы клеточные линии, селективно гиперэкспрессирующие единичные транспортеры.

Цель работы. На примере созданной клеточной линии HEK293-SLCO1B1 оценить роль данного переносчика в транспорте S-нитрозоглутатиона и глутатиона внутри клеток.

Материалы и методы.

В работе использовались следующие клеточные линии:

- клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека (human embryonic kidney 293; HEK293);
- клеточная линия, трансфицированная геном, кодирующим OATP1B1 (HEK293-SLCO1B1), разработанную и полученную в лаборатории биоинженерии клеток ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России [3].

Клетки линии HEK293 и HEK293-SLCO1B1 культивировали в 24-луночных планшетах до достижения монослоя. Для культивирования клеточных линий HEK293, HEK293-SLCO1B1 использовали питательную среду Игла в модификации Дульбекко с высоким содержанием глюкозы 4500 мг/л (англ.: Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (ПанЭко, Россия) в условиях содержания CO₂ 5% и температуре 37°C в инкубаторе WS- 189C (World Science, Корея).

В ходе работы были сформированы следующие серии:

Серия 1 – клетки HEK293, к которым добавляли S-нитрозоглутатион в концентрациях 1 и 10 мкМ и инкубировали в течение 5, 15 и 30 мин.

Серия 2 – клетки HEK293-SLCO1B1, к которым добавляли S-нитрозоглутатион в концентрациях 1 и 10 мкМ и инкубировали в течение 5, 15 и 30 мин.

Клеточные культуры HEK293 и HEK293-SLCO1B1 культивировали на 24-луночном планшете. До начала эксперимента клетки в лунках планшета промывали транспортным буфером (37°C). Транспортный буфер состоит из сбалансированного солевого раствора Хэнкса (без фенолового красного) с добавлением 12,5 мМ HEPES (pH 7,4) и 1% ДМСО.

Реакцию останавливали путем удаления буфера, содержащего S-нитрозоглутатион, и добавления в лунку 0,5 мл охлажденного льдом транспортного буфера. Затем клетки немедленно трижды промывали 0,5 мл охлажденного физиологического раствора с фосфатным буфером Dulbecco (ПанЭко, Россия). Клетки подвергали лизису с помощью трех циклов «замораживание-оттаивание» (клетки замораживали при температуре -80°C и оттаивали при комнатной температуре). В конце эксперимента сравнивали концентрацию S-нитрозоглутатиона и глутатиона в клетках HEK293 и HEK293-SLCO1B1. В качестве положительного контроля оценивали транспорт 1 мкМ аторвастатина – классического субстрата OATP1B1. Концентрацию аторвастатина определяли методом ВЭЖХ-МС/МС на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 и тройном квадрупольном массспектрометре TSQ Fortis, оснащенный источником ионизации электрораспылением (ESI) (Thermo Fisher Scientific, США) и выражали в пмоль/мг белка.

Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 13.0, Microsoft Excel и GraphPad Prism 8. Полученные результаты оценивали тестом ANOVA (дисперсионным анализом). Для сравнения с контролем применяли post-hoc Даннетта,. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Полученные результаты.

Для того, чтобы проверить участие OATP1B1 в переносе S-нитрозоглутатиона, оценивали его концентрацию в лизате клеток HEK293-SLCO1B1 и HEK293. S-нитрозоглутатион не был обнаружен в лизатах HEK293-SLCO1B1 и HEK293 при добавлении в концентрациях 1 мкМ или 10 мкМ. В то же время концентрация аторвастатина в лизате HEK293-SLCO1B1 была выше, чем в лизате HEK293 через 5, 15 и 30 минут (аторвастатин добавляли в концентрации 1 мкМ). Эти данные указывают на то, что модельная система HEK293-SLCO1B1 работает должным образом и что S-нитрозоглутатион не является субстратом OATP1B1.

Известно, что S-нитрозоглутатион подвергается метаболизму до оксида азота (II) и глутатиона. Интересно, что после применения S-нитрозоглутатиона в концентрации 10 мкМ концентрация глутатиона в HEK293-SLCO1B1 через 5 и 15 минут была выше, чем в HEK293. Через 30 минут, напротив, концентрация глутатиона в HEK293 была выше, чем в HEK293-SLCO1B1 (Рисунок 1). Следовательно, полученные результаты указывают на то, что OATP1B1 может участвовать в переносе глутатиона через клеточную мембрану.

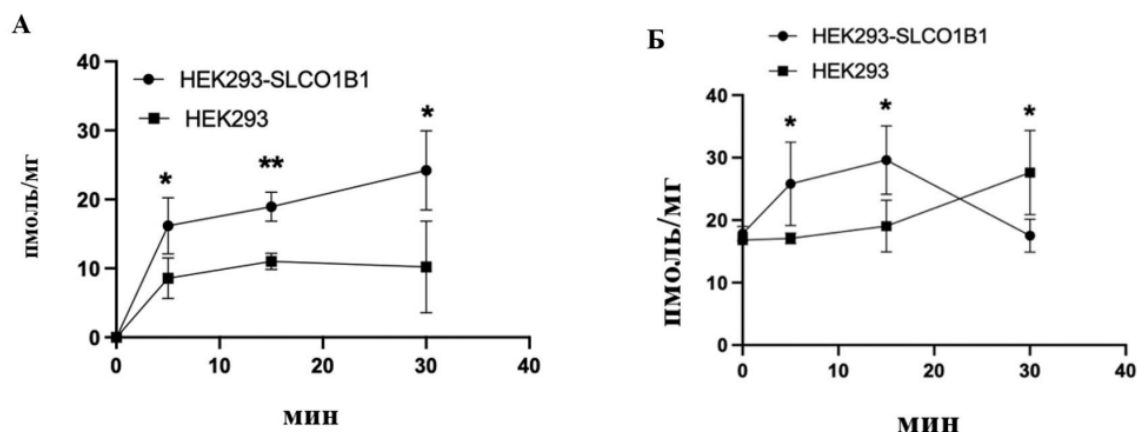


Рисунок 1 - Внутриклеточное содержание аторвастатина (А) и глутатиона (Б) в клетках линии HEK293 и HEK293-SLCO1B1

Примечание – * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – статистика относительно контроля

Глутатион (γ -глутамилцистеинилглицин, GSH) – это трипептид, состоящий из глутамата, цистеина и глицина [4]. В физиологических условиях (pH ~7,4) глутатион существует в двух формах: нейтральная форма (GSH) и ионизированная форма (GS^-).

ОАТР1В1 переносит анионные соединения, поэтому GS^- потенциально может выступать в качестве его субстрата, что подтверждается полученными результатами. Глутатион в форме GS^- транспортируется ОАТР1В1, возможно, так как находится в виде аниона, а также обладает амфифильными свойствами, аналогично статинам (субстратам ОАТР1В1). Молекулярная масса глутатиона (307 г/моль) также соответствует молекулярной массе статинов (175,23 г/моль), розувастатин (481,5 г/моль), пиватостатин (880,9 г/моль).

Выводы.

Таким образом, трансфицированные клеточные линии являются оптимальной моделью для изучения участия белков-транспортеров в трансмембранном переносе эндогенных и экзогенных веществ, в том числе и лекарственных препаратов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 25-25-00369.

Литература.

1. Котлярова М.С., Шулькин А.В., Ерохина П.Д., Мыльников П.Ю., Якушева Е.Н., Надолинская Н.И., Замахеев М.В., Гончаренко А.В. Создание клеточной линии, селективно продуцирующей функционально активный транспортер ОАТР1В1 // *Биохимия*. 2023. Т. 88, № 9. С. 1536-1544
2. Alam A., Locher K.P. Structure and Mechanism of Human ABC Transporters // *Annual Review of Biophysics*. 2023. Vol. 52. P. 275-300
3. Meier-Abt F., Mokrab Y., Mizuguchi K. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode // *Journal of Membrane Biology*. 2005. Vol. 208, № 3. P. 213-227
4. Калинина Е.В., Новичкова М.Д. S-глутатионирование и S-нитрозилирование как модуляторы редокс-зависимых процессов в опухолевой клетке // *Биохимия*. 2023. Т. 88, № 7. С. 1137-1161.

Сведения об авторах

Юлия Владимировна Абаленихина
доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ Рязанского государственного медицинского университета, Рязань
Эл. почта: abalenikhina88@mail.ru

Information about author

Yulia Vladimirovna Abalenikhina
Doctor of Sciences (Med.), Leading Researcher, Central Research Laboratory, Ryazan State Medical University, Ryazan
E-mail: abalenikhina88@mail.ru

Алексей Владимирович Шулькин

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник ЦНИЛ Рязанского государственного медицинского университета, Рязань
Эл. почта: alekseyshulkin@rambler.ru

Alexey Vladimirovich Shchulkin

Doctor of Sciences (Med.), Leading Researcher, Central Scientific Research Laboratory, Ryazan State Medical University, Ryazan
E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Павел Юрьевич Мыльников

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ЦНИЛ Рязанского государственного медицинского университета, Рязань
Эл. почта: dukeviperlr@gmail.com

Pavel Yuryevich Mylnikov

Candidate of Sciences (Biol.), Senior Researcher, Central Scientific Research Laboratory, Ryazan State Medical University, Ryazan
E-mail: dukeviperlr@gmail.com

Сучкова Ольга Николаевна

ассистент кафедры биологической химии Рязанского государственного медицинского университета, Рязань
Эл. почта: suchkovaon2102@mail.ru

Suchkova Olga Nikolaevna

Assistant of the Department of Biological Chemistry, Ryazan State Medical University, Ryazan
E-mail: suchkovaon2102@mail.ru

Пелагея Дмитриевна Ананьева

кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии Рязанского государственного медицинского университета, Рязань
Эл. почта: erokhina.pelageya96@yandex.ru

Pelageya Dmitrievna Ananyeva

Candidate of Sciences (Med.), Assistant of the Department of Pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan
E-mail: erokhina.pelageya96@yandex.ru

Елена Николаевна Якушева

доктор медицинских наук, заведующий кафедрой фармакологии Рязанского государственного медицинского университета, Рязань
Эл. почта: e.yakusheva@rzgmu.ru

Elena Nikolaevna Yakusheva

Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Pharmacology, Ryazan State Medical University, Ryazan
E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

УДК 546.04+544.4+577.3

ГРНТИ 31.27

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.123-126

О.В. Покидова, Н.С. Емельянова, В.О. Новикова,

Б.Л. Психа, А.В. Куликов, Н.А. Санина

Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН

РЕАКЦИИ НИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С БЕЛКАМИ КРОВИ И ГЛУТАТИОНОМ

Изучен процесс биотрансформации нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами в модельных системах. Показано влияние растворителей, кислорода, а также белков крови (альбумина, гемоглобина) и глутатиона на механизм распада комплексов.

Ключевые слова: нитрозильные комплексы железа, доноры NO, альбумин, гемоглобин, глутатион, квантово-химическое моделирование, кинетическое моделирование.

REACTIONS OF NITROSYL IRON COMPLEXES WITH BLOOD PROTEINS AND GLUTATHIONE

The process of biotransformation of nitrosyl iron complexes with functional sulfur-containing ligands in model systems was studied. The influence of solvents, oxygen, as well as blood proteins (albumin, hemoglobin) and glutathione on the decomposition mechanism of complexes was shown.

Keywords: nitrosyl iron complexes, NO donors, albumin, hemoglobin, glutathione, quantum chemical modeling, kinetic modeling.

Введение

Нитрозильные комплексы железа (НКЖ) являются депо и источником свободного NO *in vivo*. В настоящей работе рассмотрен ряд их синтетических аналогов (НКЖ с ароматическими и алифатическими тиоловыми лигандами), перспективных для лечения сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний [1]. В организме данные соединения будут реагировать с различными биомолекулами, в первую очередь с альбумином [2] – транспортным белком крови, содержащим одну свободную SH-группу. В настоящее время он рассматривается как основное депо и переносчик железо-динитрозильного фрагмента в крови при внутривенном введении.

Кроме того, особый интерес представляет гемоглобин, который может связывать НКЖ [3], а также продукты их распада. Координация динитрозильного фрагмента в этом случае может осуществляться по аминокислотным остаткам цистеина, аналогично альбумину. Кроме того, выделяющийся NO будет связываться с железом гема (в дезоксигемоглобине) или с остатками цистеина (через N_2O_3) с образованием нитрозильного гемоглобина (HbNO) и S-нитрозогемоглобина (HbSNO), соответственно. Образующиеся в реакционных системах HbSNO и HbNO представляют собой большой пул депонированного NO.

Рассматривая биологически важные тиолы, которые могут играть значительную роль в процессе трансформации НКЖ, особое внимание следует уделить наиболее распространенному небелковому тиолу в живых организмах - восстановленному глутатиону (GSH). НКЖ могут обменивать свои лиганды на GS^- (а также цистеин и другие соединения, в том числе аминокислоты белков) с образованием более стабильных нитрозилов [4]. Данная реакция требует более глубокого рассмотрения, так как связывание свободного глутатиона будет приводить к уменьшению его уровня в клетках, что может существенно влиять на клеточный метаболизм.

Цель работы.

Исследование взаимодействия нитрозильных комплексов железа с функциональными серосодержащими лигандами с альбумином, гемоглобином и глутатионом.

Материалы и методы.

Изучение биотрансформации комплексов проводили с помощью спектроскопии поглощения в аэробных и анаэробных условиях в различных растворителях. Спектры ЭПР регистрировали для аэробных систем с белками и глутатионом, а также в буферных растворах и в ДМСО. NO-донорную активность измеряли с помощью реакции Грисса по кинетике накопления нитрит-ионов в модельных системах (буфер, белки и глутатион), а также амперометрически в водных растворах. Для детального анализа механизма распада применяли теоретические методы (квантово-химическое и кинетическое моделирование).

Полученные результаты.

Так как растворитель играет существенную роль в процессе трансформации НКЖ, прежде всего мы изучили механизмы распада комплексов в ДМСО и в водных растворах. Согласно данным ЭПР- и УФ-спектроскопии, для комплексов с производными тиофенола в ДМСО осуществляется распад на моноядерные парамагнитные динитрозильные комплексы,

сопровождающийся замещением тиолового лиганда на молекулу растворителя и/или координацию растворителя с увеличением координационного числа. Хранение НКЖ в таких растворах приводит к увеличению NO-донорной активности.

Внесение комплексов в водные растворы приводит к значительному уменьшению сигнала от парамагнитных центров, что можно объяснить димеризацией комплексов или быстрым отрывом NO-групп. NO-донорная активность НКЖ с производными тиофенола значительно ниже в водных растворах по сравнению с рассмотренными комплексами с алифатическими лигандами: так, тиомочевинный моноядерный НКЖ генерирует в 20 раз больше NO-групп, чем 3,4-дихлортиофенольный комплекс. Здесь интересно отметить, что, например, растворение тиосульфатного биядерного НКЖ в ДМСО приводит наоборот к его стабилизации и сохранению биядерной структуры. Важную роль также играет кислород: на воздухе в буфере, согласно данным ЭПР- и УФ-спектроскопии, данной комплекс за первые минуты от начала растворения распадается на моноядерные НКЖ. В случае НКЖ с производными тиомочевины и НКЖ с тиосульфатом, в спектре происходит нарастание полосы в области 310 нм, что говорит о координации кислорода по железу. Для ряда комплексов описан процесс распада и рассчитаны константы скорости реакции.

При введении НКЖ с производными тиомочевины в раствор к бычьему сывороточному наблюдается появление полосы в области 390 нм, что свидетельствует об образовании высокомолекулярного белок-связанного НКЖ. Комплексы адсорбируются на поверхности белка, что приводит к пролонгированному выделению NO (до 30 мин-1 часа). С другой стороны, в случае тиофенольных комплексов мы не наблюдаем образования высокомолекулярного НКЖ, но связывание на поверхности белка приводит к значительному снижению скорости генерации NO (от 5 часов до нескольких суток), и в таких системах комплексы становятся более эффективными NO-донорами. Рассчитаны константы связывания комплексов с белком и радиусы Ферстера.

В случае с дезоксигемоглобином также наблюдаем пролонгацию генерации NO, что характерно для всех изученных нитрозилов и связано с адсорбцией комплексов на поверхности белка. Константа скорости генерации NO может отличаться на 2 порядка от водных растворов (в зависимости от концентрации белка). Похожий эффект наблюдается в системах НКЖ с оксигемоглобином, при этом высокомолекулярного белок-связанного НКЖ (по Cys β 93) согласно УФ-спектроскопии не образуется. В системе с метгемоглобином в аэробных условиях не происходит изменения спектров поглощения во времени, в то время как в анаэробных условиях постепенно образуется HbNO.

В присутствии восстановленного глутатиона, происходит замещение тиоловых лигандов на GS⁻. Для биядерных НКЖ с алифатическими лигандами, согласно УФ-, ЭПР-, масспектрометрии, реакции Грисса, замещаются оба лиганда. Для моноядерных НКЖ с алифатическими тиомочевинами помимо замещения лигандов происходит реакция димеризации. Для биядерных НКЖ с тиофенольными производными замещается только один лиганд, а в случае, например, НКЖ 4-ацетамидотиофенолилом, замещения лигандов не наблюдается.

Выводы.

Таким образом, белки и GSH могут активно взаимодействовать с нитрозильными комплексами железа и тем самым модулировать их свойства как потенциальных лекарственных препаратов в процессе их биотрансформации.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: изучен механизм распада ряда НКЖ в различных растворителях и проанализировано взаимодействие комплексов с альбумином, гемоглобином и глутатионом, предложены основные продукты и рассчитаны константы скорости реакций.

Исследование с НКЖ с алифатическими лигандами выполнено по теме Государственного задания, № государственной регистрации № 124020500019-2, с производными тиофенола - за счет гранта Российского научного фонда № 22-73-10049, <https://rscf.ru/project/22-73-10049/>.

Литература.

1. Функциональные нитрозильные комплексы железа – новый класс доноров монооксида азота для лечения социально значимых заболеваний / *Фундаментальные Науки – Медицине. Биофизические Медицинские Технологии*; под ред. А. И. Григорьев, Ю. А. Владимиров: МАКС Пресс, Москва, 2015, 72–102.
2. Timoshin A.A., Vanin A.F., Orlova T.R., Sanina N.A., Ruuge E.K., Aldoshin S.M., Chazov E.I. Protein-Bound Dinitrosyl–Iron Complexes Appearing in Blood of Rabbit Added with a Low-Molecular Dinitrosyl–Iron Complex: EPR Studies // *Nitric Oxide*. 2007. No 2 (16). P. 286–293.
3. Shumaev K. B., Kosmachevskaya O. V., Timoshin A. A., Vanin A. F., Topunov A. F. Dinitrosyl Iron Complexes Bind with Hemoglobin as Markers of Oxidative Stress // *Methods Enzymology*. 2008. V. 436. P. 445–461.
4. Lewandowska H., Kalinowska M., Brzóška K., Wójciuk K., Wójciuk G., Kruszewski M. Nitrosyl iron complexes—synthesis, structure and biology // *Dalton Transactions*. 2011. V. 40. P. 8273–8289.

Сведения об авторах

Покидова Олеся Викторовна

к.х.н., ведущий научный сотрудник
Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук,
г. Черноголовка, Россия
Эл. почта: pov@icp.ac.ru

Емельянова Нина Сергеевна

к.х.н., ведущий научный сотрудник
Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук,
г. Черноголовка, Россия
Эл. почта: n_emel@mail.ru

Новикова Вероника Олеговна

аспирант, младший научный сотрудник
Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук,
г. Черноголовка, Россия
Эл. почта: veronika@icp.ac.ru

Психа Борис Львович

д.х.н., ученый секретарь
Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук,
г. Черноголовка, Россия
Эл. почта: psi@icp.ac.ru

Куликов Александр Васильевич

д.ф.-м.н., главный научный сотрудник
Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук,
г. Черноголовка, Россия
Эл. почта: kulav@icp.ac.ru

Санина Наталия Алексеевна

д.х.н., главный научный сотрудник
Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук,
г. Черноголовка, Россия
Эл. почта: sanina@icp.ac.ru

Information about author

Pokidova Olesya Viktorovna

PhD (Chem), Leading Researcher,
Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry,
Chernogolovka, Russian Federation
E-mail: pov@icp.ac.ru

Emel'yanova Nina Sergeevna

PhD (Chem), Leading Researcher,
Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry,
Chernogolovka, Russian Federation
E-mail: n_emel@mail.ru

Novikova Veronika Olegovna

Graduate student, Junior Researcher,
Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry,
Chernogolovka, Russian Federation
E-mail: veronika@icp.ac.ru

Psikha Boris Lvovich

Doctor of Science (Chem.), Scientific Secretary,
Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry,
Chernogolovka, Russian Federation
E-mail: psi@icp.ac.ru

Kulikov Alexander Vasilievich

Doctor of Science (Phys.-Math.), Chief Researcher,
Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry,
Chernogolovka, Russian Federation
E-mail: kulav@icp.ac.ru

Sanina Natalia Alekseevna

Doctor of Science (Chem.), Chief Researcher,
Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry,
Chernogolovka, Russian Federation
E-mail: sanina@icp.ac.ru

УДК 577.115:597.553.1/.554.5(261.1)
ГРНТИ 34.35.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.127-131

В.П. Воронин¹, Д.В. Артеменков², А.М. Орлов³, С.А. Мурзина¹

¹ Институт биологии – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (КарНЦ РАН)

² Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)

³ Институт океанологии им. П.П. Ширшова (ИО РАН)

ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ С УЧАСТИЕМ СТРУКТУРНЫХ ЛИПИДОВ БИОМЕМБРАН У МЕЗОПЕЛАГИЧЕСКИХ РЫБ К ОБИТАНИЮ НА ГЛУБИНЕ

Проведен анализ липидов и жирных кислот, связанных с биомембранами мышечной ткани у мезопелагических рыб моря Ирмингера (Северная Атлантика), обитающих на разных глубинах. Установлены сходства и различия в механизмах адаптации вертикально-мигрирующих и не мигрирующих рыб к действию фактора глубины (в т.ч. гидростатического давления).

Ключевые слова: липиды, жирные кислоты, биомембраны, адаптации, мезопелагические рыбы, море Ирмингера, Северная Атлантика.

V.P. Voronin¹, D.V. Artemenkov², A.M. Orlov³, S.A. Murzina¹

¹ The Institute of Biology is a separate division of the Federal Research Center Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (KarSC RAS)

² All-Russian Scientific Research Institute of Fisheries and Oceanography (VNIRO)

³ P.P. Shirshov Institute of Oceanology (IO RAS)

ECOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ADAPTATIONS WITH THE PARTICIPATION OF STRUCTURAL LIPIDS OF BIOMEMBRANES IN MESOPELAGIC FISHES TO DEPTH-SEA HABITATION

Analysis of lipids and fatty acids associated with biomembranes of muscle tissue in mesopelagic fishes of the Irminger Sea (North Atlantic) living at different depths was carried out. Similarities and differences in the mechanisms of adaptation of vertically migrating and non-migrating fishes to the action of the depth factor (including hydrostatic pressure) were established.

Keywords: lipids, fatty acids, biomembrane, adaptation, mesopelagic fish, Irminger Sea, North Atlantic

Введение

Мезопелагические рыбы являются одной из важнейших групп животных Мирового океана, обитающих в диапазоне глубин от 200 до 1000 метров. Несмотря на сравнительно небольшие размеры особей и сильную разреженность мезопелагической зоны, данная группа рыб обладает высоким биоразнообразием и биопродуктивностью, а также характеризуется глобальным распределением [1,2]. Многие виды мезопелагических рыб способны осуществлять вертикальные перемещения в водной толще в течении суток (т.н. «суточные вертикальные миграции»), а у некоторых видов отмечается онтогенетическая вертикальная миграция – изменение глубины обитания в процессе роста и развития [2]. Несмотря на пристальное внимание в последнее время к глубоководным гидробионтам, о механизмах адаптации к изменению глубины обитания известно немного. Сравнительно хорошо исследованы физиологические и поведенческие механизмы адаптации глубоководных рыб к изменению гидростатического давления [3]. При этом механизмы адаптации на молекулярном и клеточном уровнях, которые обеспечивают слаженное функционирование всех систем организма на более высоких уровнях организации, изучены крайне слабо.

Липиды являются многофункциональными и лабильными веществами, в том числе

принимающими участие в ключевых механизмах поддержания целостности клеточной биомембраны, особенно при воздействии экстремально высокого давления [4,5]. Изучение механизмов адаптации, направленных на поддержание гомеостаза внутриклеточной среды мезопелагических видов рыб при постоянном или изменчивом воздействии гидростатического давления представляет как фундаментальную значимость, так и высокую практическую ценность в части понимания процессов воздействия гидростатического давления на организм.

Цель работы

В настоящей работе проводилось изучение динамики липидного, фосфолипидного и жирнокислотного состава мышечной ткани у наиболее распространённых представителей мезопелагической ихтиофауны моря Ирмингера и выявление общих и специфических механизмов адаптации у исследуемых видов рыб к изменению глубины обитания.

Материалы и методы

Сбор образцов мышечной ткани мезопелагических видов рыб (*Sebastes mentella*, *Lampanyctus macdonaldi*, *Notoscopelus kroyeri*, *Symbolophorus veranyi*, *Chauliodus sloani*, *Stomias boa*, *Malacosteus niger*, *Borostomias antarcticus*, *Bathylagus euryops*, *Serrivomer beanii*, *Scopelogadus beanii*) осуществлялся в период мониторинговых тралово-акустических съёмок в море Ирмингера (Северо-Восточная Атлантика: 59°60'-64°60' с.ш., 26°20'-41°50' з.д.) в летний период (июнь-июль 2018 г.) на борту НИС «Атлантида». Отбор биоматериала проводился из уловов пелагических тралений на глубинах 250, 325, 375, 400, 650 и 700 метров в 3-х районах: зоне регулирования НЕАФК, рыболовной зоне Гренландии и исключительной экономической зоне Исландии.

Образцы мышечной ткани были заморожены при -80°C до прибытия в лабораторные условия, после чего их гомогенизировали и перефиксировали в смеси хлороформ-метанол (2:1 по объёму). Биохимические исследования были выполнены на базе лаборатории экологической биохимии и с использованием оборудования ЦКП КарНЦ РАН. Экстракцию общих липидов (ОЛ) из мышечной ткани проводили по методу Фолча [6]. Выделение и анализ общих фосфолипидов (ФЛ), холестерина (ХС), а также других нейтральных классов липидов осуществляли с использованием комплекса для высокоэффективной тонкослойной хроматографии САМАГ (Швейцария) в элюирующей системе «гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота» (32:8:08 по объёму) при влажности 47% [7]. Окраску липидных пятен осуществляли водным раствором медного купороса (CuSO₄), подкисленным раствором ортофосфорной кислоты (H₃PO₄), с последующим проявлением окрашенных пятен путём нагревания пластины до 160°C в течение 15 мин.

Качественный и количественный анализ индивидуальных классов фосфолипидов (фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилинозитола (ФИ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ)) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа «Стайер» (ООО «Аквилон», Россия). Фракционирование общих ФЛ проводили на колонке размером 250 × 4 мм, наполненной сорбентом Нуклеосил 100-7 («Элсико», Россия), и с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил–метанол–гексан–85%-ной фосфорной кислоты (918:30:30:17,5 по объёму) при скорости потока 1 мл/мин. Детектирование анализируемых ФЛ отдельных классов осуществляли на спектрофотометре методом поглощения света в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 206 нм [8]. Качественная идентификация классов липидов проводилась по стандартам соответствующих компонентов производства Sigma-Aldrich (США) с учётом значений R_f.

Качественный и количественный анализ жирных кислот (ЖК) осуществляли методом газовой хроматографии (ГХ) с масс-селективным детектором (МСД) «Маэстро-αМС» (Сайтегра, Россия), предварительно подвергнув смесь ОЛ кислотному метилированию. Фракционирование осуществлялось в течение 32 минут при градиентном термостатировании (t_{нач} = 140°C – удержание 5 мин; увеличение t со 140°C до 240°C со скоростью 4°C/мин; t_{кон} = 240°C – удержание 2 мин) на капиллярной колонке HP-88 60m*0.25mm*0.20mm (Agilent Technologies, USA) с использованием гелия в качестве подвижной фазы. Детектирование

МЭЖК осуществлялось в режиме SIM по 3-м характеристическим ионам для каждой иско-мой ЖК. Полученные данные анализировали с использованием ПО «Маэстро Аналитик v. 1.025» (Saitegra, Россия) и библиотекой NIST. Количественный расчёт иско-мых компонентов проводили методом градуировки с использованием смеси аналитических стандартов «Supelco 37» (Sigma-Aldrich, США) с известными концентрациями.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием языка програм-мирования R (версия 4.2.2) в среде разработки «RStudio» (<https://www.posit.co>) с примене-нием дополнительных пакетов. Для каждого исследованного вида была рассчитана описа-тельная статистика (среднее арифметическое и ошибка среднего арифметического – $m \pm se$). Достоверность различий между группами оценивали при помощи непараметрического теста ранговых сумм Вилкоксона-Манна-Уитни. Статистический анализ сходства между исследо-ванными видами осуществляли с использованием алгоритма ANOSIM, а анализ процентного сходства – с использованием статистического анализа SIMPER. Кластерный анализ прово-дили методом иерархической кластеризации с поиском оптимального количества кластеров.

Результаты и обсуждение

К числу ключевых механизмов поддержания целостности и оптимальной жидкостности плазматической мембраны клеток относятся: (1) интегрирование молекул ХС в структуру би-липидного слоя мембраны; (2) изменение количественного соотношения ФХ к ФЭА; (3) ва-риации уровня ненасыщенности ацильных фрагментов в молекуле ФЛ [4,5]. Фракционный анализ основных структурных липидов биомембраны позволил установить достоверные раз-личия (ADONIS: p -value = 0.001) между исследуемыми видами мезопелагических рыб, а также «отдельные перекрытия» выборки (ANOSIM: $R = 0.2988$, p -value = 0.001) при среднем проценте сходства между видами в 26% по ФЛ профилю (согласно анализу SIMPER). Тем самым была установлена видоспецифичность механизмов адаптации биомембраны к дей-ствию факторов среды, связанных с глубиной, при наличии общих стратегий компенсатор-ного ответа между отдельными видами мезопелагических рыб.

Установлено, что у рыб, осуществляющих вертикальные миграции (*S. mentella*, *L. mac- donaldi*, *N. kroyeri*, *S. veranyi*, *S. boa*, *C. sloani*, *B. antarcticus*, *Sc. beanii* и *B. euryops*), ключевым механизмом адаптации к действию (и изменению) гидростатического давления является включение молекул ХС в структуру билипидного слоя, как одной из наиболее быстрых реак-ций регуляции жидкостности мембраны. Так как присутствие ХС в липидном бислое непо-средственно регулирует морфологическую стабильность и проницаемость мембраны [4], дан-ная стратегия компенсаторного ответа позволяет организму мигрирующих рыб в кратчайшие сроки реагировать на упорядочивание мембраны клеток для поддержания гомеостаза внут-риклеточного пространства при изменении глубины обитания.

В то же время у вертикально мигрирующих видов отмечается кластерная дифференци-ация по активности механизма включения свободного ХС в структуру клетки. Для некоторых представителей семейств Myctophidae (*S. veranyi* и *N. kroyeri*) и Stomiidae (*S. boa*, *C. sloani*, *B. antarcticus*), накапливающих триацилглицерины (ТАГ) в мышцах в качестве основного ис-точника энергии, характерна регуляция жидкостности мембраны по описанному выше меха-низму (коэффициент ХС/ФЛ >1). Тогда как у *S. mentella*, *L. macdonaldi*, *S. beanii* и *B. euryops*, накапливающих большое количество запасных эфиров холестерина (ЭХС) и восков в мыш-цах, коэффициент ХС/ФЛ достоверно ниже (<1). Вероятно, у данной группы видов мезопе-лагических рыб происходит встраивание этерифицированной формы ХС (в виде ЭХС) в структуру биомембраны клетки. Несмотря на то, что такая форма менее способна к упорядо-чиванию мембраны, чем свободный ХС [9], стратегия использования многофункционального ЭХС позволяет регулировать несколько механизмов адаптационных процессов при помощи молекул одной структуры – регуляция жидкостности мембраны и регуляция плавучести ор-ганизма [10–12].

Для группы вертикально мигрирующих видов рыб при активном включении ХС в би-липидный слой установлено направленное поддержание соотношения ФХ к ФЭА в биомем-бране мышц на уровне 3.82-5.90, тогда как у не мигрирующих по вертикали видов рыб (*M.*

niger и *Sc. beanii*) данный показатель составил 7.3 и 7.5 соответственно (при коэффициенте ХС/ФЛ = 1). Тем самым выявлено, что основным механизмом поддержания жидкостности мембраны клеток у немигрирующих видов к обитанию на глубине является регуляция соотношения индивидуальных классов ФЛ. Несмотря на то, что время перестройки ФЛ состава биомембраны, по разным оценкам, может занимать от нескольких часов до нескольких суток, для немигрирующих по вертикали видов рыб данный механизм позволяет поддерживать оптимальные условия функционирования внутриклеточной среды при относительной неизменности гидростатического давления.

Ещё одним адаптивным механизмом регуляции жидкостности мембраны при изменении глубины является изменение ненасыщенности ФЛ. Известно, что ЖК, особенно п-3 и п-6 полиненасыщенных ЖК, непосредственно участвуют в регуляции пространственной структуры биомембраны – поддерживают толщину и жидкостность липидного бислоя при колебаниях гидростатического давления [13]. В настоящем исследовании было установлено увеличение количества ПНЖК в мышцах всех мезопелагических видов рыб с увеличением глубины обитания. При этом отмечено, что у большинства исследованных видов регуляция жидкостности биомембраны осуществляется за счёт количественного изменения п-3 ПНЖК, тогда как у *N. kroyeri*, *B. antarcticus* и *C. sloani* – за счёт п-6 ПНЖК. У вертикально мигрирующих представителей семейства Stomiidae (*S. boa* и *C. sloani*) также было отмечено увеличение количества cis18:1(п-9) ЖК с увеличением глубины обитания. Известно, что вариации количества мононенасыщенных ЖК структуры 18:1 являются одним из механизмов приспособительных реакций к глубоководным условиям обитания [14]. На сравнительно же небольших глубинах (250 м) отмечался более высокий уровень НЖК у всех исследованных видов. Увеличение насыщенности ацильных радикалов ФЛ является следствием снижения гидростатического давления окружающей среды, что приводит к переупорядочиванию билипидного слоя мембраны, в том числе, за счёт изменения ненасыщенности ФЛ [5,15].

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: исследование качественного и количественного липидного и жирнокислотного профиля, ассоциированного с биомембраной клеток мышечной ткани у малоизученных мезопелагических видов рыб, позволило установить видоспецифичный характер механизмов адаптации к глубоководным условиям обитания с некоторыми общими стратегиями. Общими компенсаторными механизмами для изученных видов мезопелагических рыб являются изменение ненасыщенности ФЛ в мембране клеток в зависимости от глубины обитания. Для вертикально-мигрирующих видов характерна регуляция жидкостности мембраны молекулами холестерина (в свободной или этерифицированной форме). У не мигрирующих по вертикали рыб для поддержания гомеостаза внутриклеточной среды задействован механизм коррекции соотношения индивидуальных классов фосфолипидов.

Работа выполнена в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

Литература

1. Irigoien X. et al. Large mesopelagic fishes biomass and trophic efficiency in the open ocean // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5, № 1. P. 3271.
2. Hidalgo M., Browman H.I. Developing the knowledge base needed to sustainably manage mesopelagic resources // *ICES J. Mar. Sci.* 2019. Vol. 76, № 3. P. 609–615.
3. Захарченко А.В. Влияние гидростатического давления на поведение открыто- и закрытопузырных рыб в потоке воды // Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук. М.: ИПЭЭ РАН, 2004. 28 с.
4. Болдырев А.А., Кяйверяйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология: учебное пособие. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2006. 226 с.
5. Macdonald A. Life at high pressure. Cham: Springer, 2021. 445 p.

6. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. Vol. 226, № 5. P. 497–509.
7. Olsen R.E., Henderson R.J. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1989. Vol. 129, № 2. P. 189–197.
8. Arduini A. et al. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // *J. Lipid. Res.* 1996. Vol. 37, № 3. P. 684–689.
9. Dufourc E.J. Sterols and membrane dynamics // *J. Chem. Biol.* 2008. Vol. 1, № 1–4. P. 63–77.
10. Voronin V.P. et al. Lipids and Fatty Acids in Some Mesopelagic Fish Species: General Characteristics and Peculiarities of Adaptive Response to Deep-Water Habitat // *J. Mar. Sci. Eng.* 2022. Vol. 10, № 7.
11. Voronin V.P. et al. Lipid Profile of the Muscle Tissue of Some Mesopelagic Fish Species of the Families Stomiidae and Myctophidae from Different Depths of the Irminger Sea, North Atlantic // *J. Ichthyol.* 2023. Vol. 63, № 5. P. 981–992.
12. Voronin V.P. et al. Into the deep: New data on the lipid and fatty acid profile of redfish *sebastes mentella* inhabiting different depths in the Irminger sea // *Biomolecules.* 2021. Vol. 11, № 5. Art. 704.
13. Рабинович А.Л., Рупатти П.О. Полиненасыщенные углеводородные цепи липидов: структура, свойства, функции // *Успехи Современ. Биол.* 1994. Т. 114, № 10. С. 581–593.
14. Murzina S.A. et al. Changes in fatty acid composition during embryogenesis and in young age groups (0+) of Atlantic Salmon *Salmo salar* L.: The role of rheotactic behavior and lipid composition of fry in the formation of phenotypic groups of Salmon in large arctic rivers // *Salmon: Biology, Ecological Impacts and Economic Importance* / ed. Woo P.T.K., Noakes D.J. New York: Nova Science Publishers, 2014. P. 47–65.
15. Winnikoff J.R., Haddock S.H.D., Budin I. Depth- and temperature-specific fatty acid adaptations in ctenophores from extreme habitats // *J. Exp. Biol.* 2021. Vol. 224, № 21. Art. jeb242800.

Сведения об авторах

Воронин Виктор Петрович

к.б.н., н.с. лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

Эл. почта: voronen-viktor@mail.ru

Артеменков Дмитрий Владимирович

к.с.-х.н., с.н.с. отдела промысловых беспозвоночных и водорослей ФГБНУ «ВНИРО» Москва, Россия

Эл. почта: artemenkov@vniro.ru

Орлов Алексей Маркович

д.б.н., руководитель лаборатории океанической ихтиофауны ИО РАН, Москва, Россия

Эл. почта: orlov.am@ocean.ru

Мурзина Светлана Александровна

д.б.н., заведующая лабораторией экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, Москва, Россия

Эл. почта: murzina.svetlana@gmail.com

Information about author

Voronin Viktor

PhD, Research Fellow of the Ecological Biochemistry Laboratory of the IB of the KarRC RAS, Petrozavodsk, Russian Federation

E-mail: voronen-viktor@mail.ru

Artemenkov Dmitrii

PhD, Senior researcher department of commercial invertebrates and algae of the VNIRO, Moscow, Russian Federation

E-mail: artemenkov@vniro.ru

Orlov Alexei

Doctor of Biological Sciences, head of the Laboratory of Oceanic Ichthyofauna of the IO RAS, Moscow, Russian Federation

E-mail: orlov.am@ocean.ru

Murzina Svetlana

Doctor of Biological Sciences, head of the Ecological Biochemistry Laboratory of the IB of the KarRC RAS, Petrozavodsk, Russian Federation

E-mail: murzina.svetlana@gmail.com

УДК 661.98:547.963.4
ГРНТИ 34.35.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.132-137

О.В. Космачевская¹, Э.И. Насыбуллина¹,
О.Е. Багрова^{1,2}, И.С. Пугаченко¹, А.Ф. Топунов¹
¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследова-
тельский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
РАН, Москва, Россия
²Московский государственный университет им.
М.В. Ломоносова, Москва, Россия

БИС-ГИСТИДИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ГЕМОГЛОБИНА (ГЕМИХРОМ): УЧАСТИЕ В РЕДОКС-ПРЕВРАЩЕНИЯХ

Изучено участие обратимых и необратимых гемихромов в экспериментальных системах, моделирующих перекисное окисление биомолекул, в сравнении с гемоглобином в пентакоординированном состоянии. Обратимые гемихромы оказывают антирадикальное и антиоксидантное действие, необратимый гемихром может вести себя разнонаправленно в зависимости от условий экспериментальной системы.

Ключевые слова: гемоглобин, гемихром, окислительная модификация, перекисное окисление, антирадикальное и антиоксидантное действие

O.V. Kosmachevskaya¹, E.I. Nasybullina¹,
O.E. Bagrova^{1,2}, I.S. Pugachenko¹, A.F. Topunov¹
¹Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

BIS-HISTIDYL COMPLEX OF HEMOGLOBIN (HEMICHROME): PARTICIPATION IN REDOX-TRANSFORMATIONS

The participation of reversible and irreversible hemichromes in experimental systems simulating peroxidation of biomolecules was studied in comparison with hemoglobin in a pentacoordinated state. Reversible hemichromes have an antiradical and antioxidant effect, while irreversible hemichrome can behave in different directions depending on the conditions of the experimental system.

Key words: hemoglobin, hemichrome, oxidative modification, peroxidation, antiradical and antioxidant effect

Введение

В эритроците в результате различных патологических процессов образуются повышенные количества редокс-активных веществ, которые действуют на гемоглобин (Hb) и индуцируют его переход в обратимый гемихром. Белок в этом состоянии имеет большое структурное сходство с состоянием расплавленной глобулы [1-3]. Через это состояние происходит фолдинг и сборка Hb [3]. Такой сценарий постулируется не только для систем *in vitro*, но и для клеточных систем.

Гемихром содержит железо в окисленном низкоспиновом состоянии, связанное с дистальным гистидином (бис-гистидильный комплекс), и характеризуется двумя структурными особенностями: смещением гемовой группы в сторону растворителя и сужением гемового кармана [4]. Промежуточное состояние гемихрома полностью обратимо и быстро переходит в высокостабильное трехвалентное или восстановленное пентакоординированное состояния.

В работе [3] охарактеризован процесс денатурации охуHb, который включает автоокисление до метHb с последующей диссоциацией гема (Fe-протопорфирина IX) и разворачиванием ароHb. Образование гемихрома предотвращает диссоциацию гема от молекул белка с измененной конформацией. Это объясняет причину перехода гемоглобинов с неправильной укладкой в гемихромы, которые накапливаются в виде нерастворимых включений (тельца Гейнца) в эритроцитах пациентов с гемоглобинопатиями. Необратимые гемихромы гемоглобина и миоглобина (Mb) образуются под действием гуанидинхлорида [2, 3].

Обратимые гемихромы образуются при воздействии на Hb жирных кислот [5],

алифатических спиртов, высоких концентраций глицерина, полиэтиленгликоля, продуктов реакции Майяра [6], а также в реакции окислительного денитрозилирования [7]. Обсуждается возникновение гемихромов в эритроцитах по механизму анион-индуцируемого автоокисления охуНб [8, 9]. Тетрамерные гемоглобины в состоянии гемихрома склонны к формированию фибрилл [10].

Долгое время гемихромы относили к нефункциональным продуктам денатурации гемоглобина. В настоящее время обсуждаются возможные физиологические роли этой формы Нб [11]. Описан механизм участия гемихромов в формировании «сигнала смерти» в старых и поврежденных эритроцитах [12]. На начальной стадии происходит специфическое ковалентное связывание гемихромов с белком полосы 3, локализованным в эритроцитарной мембране. Еще одна возможная функция гемихромов связана с восстановлением *in vivo* metНб цитохромом b₅-редуктазой [4]. Rifkind с соавторами предположил, что благодаря переходу в состояние гемихрома осуществляется регуляция связывания лигандов в Нб [1], подобно тому, как это происходит в гексакоординированных гемоглобинах – нейроглобине и цитоглобине [13]. Однако такая возможность для эритроцитарного Нб пока не получила экспериментального подтверждения. Вполне правдоподобной представляется точка зрения, что переход в состояние гемихрома снижает реакционную активность гемового железа и тем самым защищает белок от окислительной модификации в условиях сильного окислительного стресса [14].

Цель работы

Подобрать условия для перехода эритроцитарного гемоглобина в обратимые и необратимые гемихромы и исследовать их участие в окислительных реакциях, моделирующих перекисное окисление биомолекул.

Материалы и методы

Образование свободнорадикальных интермедиатов в реакции гемоглобина с гидропероксидом *трет*-бутила (*t*-ВООН) оценивали методом хемилюминесценции, используя в качестве активатора люминол. Реакционная смесь содержала 0,005 мМ гемоглобина в 56 мМ фосфатном буфере (рН 7,2), 2 мМ люминола, 0,06 мМ *t*-ВООН. Реакцию инициировали добавлением (*t*-ВООН). Регистрацию хемилюминесценции осуществляли на хемилюминесцентном анализаторе Lum-5773 (Россия). Время от смешения всех компонентов реакционной смеси до регистрации хемилюминесценции не превышало 3 секунд. Кинетику регистрировали при постоянном перемешивании и термостатировании при 37 °С. Для количественной оценки хемилюминесценции использовали её светосумму за время 2000 секунд.

Участие гемоглобина в генерации свободных радикалов изучали методом обесцвечивания катион-радикала АВТС (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). В реакционной системе, содержащей гемоглобин и *t*-ВООН образуется АВТС^{•+} сине-зеленого цвета. За ходом реакции следили по изменению оптической плотности при 734 нм. Реакционная смесь содержала 0,017 мМ гемоглобина в 73 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,2), 1 мМ АВТС, 0,12 мМ *t*-ВООН.

Продукцию АФК в реакции гемоглобина с *t*-ВООН измеряли в присутствии TMPD (N,N,N',N'-tetramethylbenzene-1,4-diamine). К раствору 0,017 мМ гемоглобина в 64 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,2) с 1 мМ TMPD добавляли *t*-ВООН до конечной концентрации 0,06 мМ и регистрировали оптическое поглощение при 610 нм.

Образование ТБК-реактивных продуктов в ходе реакции окисления мицелл линолевой кислоты и 2-дезоксид-рибозы. К 1 мМ раствора мицелл линолевой кислоты или 10 мМ раствору 2-дезоксид-рибозы в 100 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,2) добавляли 0,01 мМ гемоглобина. Реакцию окисления инициировали добавлением *t*-ВООН до концентрации 0,14 мМ. Смесь инкубировали в течение часа при 37 °С. Затем для остановки окисления добавляли бутилгидрокситолуол до концентрации 0,001 мМ, трихлоруксусную кислоту (ТХУ) до 136 мМ и тиобарбитуровую кислоту (ТБК) до 15,5 мМ и инкубировали 30 минут при 90 °С. После чего образцы охлаждали в ледяной бане и центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 минут. В супернатанте измеряли поглощение ТБК-реактивных продуктов при 532 нм. Результаты выражали в процентах от значений A₅₃₂ в контрольном образце.

Пероксидазную активность определяли спектрофотометрически с помощью измерения гидропероксид-зависимого окисления *o*-дианизидина. Для расчета концентрации продукта использовали коэффициент экстинкции $30 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Состав реакционной смеси: 80 mM К-фосфатный буфер (pH 7,2), 2,5 mM *o*-дианизидин, 5 мкМ гемоглобина. Реакцию инициировали добавлением 0,3 mM *t*-BOOH. Образование продукта окисления *o*-дианизидина регистрировали спектрофотометрически при 454 нм при 25 °С.

Полученные результаты

Получение обратимых и необратимых гемихромов

Об образовании гемихрома из metHb свидетельствуют характерные изменения в спектрах оптического поглощения: уменьшается интенсивность полосы Core и ее максимум сдвигается в длинноволновую область с 405 на 412-414 нм. В видимой области спектра пики с максимумами на 500 и 632 нм, характеризующие высокоспиновое состояние гемового железа, исчезают, а вместо них появляется пик с максимумом на 536 нм и плечо в районе 565 нм.

Сравнительную оценку превращения metHb в гемихром проводили с помощью разностной спектрофотометрии, так как при использовании этого приема более четко проявляются спектральные изменения в области полосы Core. Разностный спектр получали вычитанием из спектра Hb с трансформирующим реагентом (NaNO_2 , H_2O_2 , SDS) спектр metHb или охуHb. Разностные спектры поглощения характеризовали величиной $\Delta A = A_{\text{макс}} - A_{\text{мин}}$, где $A_{\text{макс}}$ и $A_{\text{мин}}$ – величины оптической плотности в максимуме и минимуме разностного спектра поглощения соответственно.

Добавление трансформирующих реагентов к раствору metHb, приводит к появлению разностного спектра с максимумом на 422 нм и минимумом на 403 нм, что является типичным для превращения высокоспиновой формы гемопотеида ($\text{Hb-Fe}^{\text{III}}\text{-H}_2\text{O}$) в низкоспиновую. Обратимый гемихром (rhHb) получали из охуHb в реакции индуцированного анионом (NaNO_2) автоокисления. При этом разностный спектр характеризовался максимумом на 550 нм и минимумом на 567 нм.

Для определения эффективной концентрации NaNO_2 , H_2O_2 , SDS строили зависимость ΔA от концентрации реагента. Обратимые гемихромы получали в реакции охуHb с NaNO_2 , который добавляли к раствору белка в молярном соотношении 1 : 24, а также в реакции metHb с H_2O_2 , добавленной в молярном соотношении 1 : 36. Необратимый гемихром (ihHb) получали добавлением к metHb SDS в молярном соотношении 1 : 8. Также был получен низкоспиновый комплекс metHb с NaN_3 , который добавляли в молярном соотношении 1 : 3. Соотношения указаны в расчете на субъединицу Hb.

Проверку на обратимость осуществляли добавлением кристаллического дитионита натрия к раствору гемихрома. Если гемихром обратимый, то он переходит в восстановленное пентакоординированное состояние с максимумами поглощения на 430 и 557 нм, в противном случае образуется восстановленная низкоспиновая форма – гемохром с максимумами на 412, 532 и 560 нм.

Участие гемихромов в окислительных превращениях

Регистрацию свободных радикалов производили с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции в системе metHb–*t*-BOOH. При взаимодействии пероксильных радикалов с люминолом образуется радикал люминола, из которого затем образуется аминфталевая кислота в возбужденном электронном состоянии (P^*), которая переходит в основное с испусканием кванта света:



Светосумма хемилюминесценции rhHb (NaNO_2 , H_2O_2) и Hb- N_3 была ниже на 25 %, а ihHb (SDS) выше на 25 % по сравнению metHb (контроль), что свидетельствует о том, что гемоглобин в состоянии обратимого гемихрома менее склонен к продукции свободных радикалов. Это, вероятно, связано с тем фактом, что rhHb менее склонен к образованию оксоферрильной формы ($^{\bullet}\text{HbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$) в реакции с гидропероксидами.

Поскольку оксоферрильная форма, как известно, участвует в пероксидазном цикле, была изучена пероксидазная активность гемихромов. У rhHb она оказалась на 35-40% ниже, чем у metHb. В то время как активность ihHb была на уровне контрольных измерений. Полученные данные хорошо согласуются с работой [15], в которой показано, что добавление metMb к линолеатным эмульсиям, содержащим H_2O_2 , приводит к конкурентному образованию радикала $Mb^{IV}=O$ и rhMb в пользу последнего, благодаря чему перекисное окисление липидов (ПОЛ) происходит в незначительной степени [15].

Для проверки этого предположения были поставлены эксперименты по индукции гемихромами перекисного окисления линолевой кислоты и 2-дезоксид-Д-рибозы. Количество ТБК-реактивных продуктов, образованных при окислении мицелл линолевой кислоты в присутствии гемихромов, было на том же уровне, что и у metHb. Иная картина наблюдалась при изучении окисления 2-дезоксид-Д-рибозы. Обратимый rhHb ($NaNO_2$) снижал в два раза количество ТБК-реактивных продуктов по сравнению с metHb, тогда как rhHb (H_2O_2), наоборот, в два раза увеличивал. Необратимый гемихром и комплекс Hb с азидом ($metHb^{III}-N_3$) окисляли 2-дезоксид-Д-рибозу на уровне контрольных измерений.

Антиоксидантное и антирадикальное действие также изучали с помощью широко используемых методических подходов: образование катион-радикала ABTS и окисление TMPD. Начальная скорость формирования в реакционной среде $metHb-t-BOOH$ катион-радикала ABTS в присутствии гемихромов была в два раза ниже, чем в контроле. В присутствии обратимого гемихрома ($NaNO_2$) начальная скорость окисления TMPD была на 30% ниже, чем в контроле. Аналогичный эффект был в присутствии ihHb (SDS) и комплекса Hb с азидом. Обратимый гемихром (H_2O_2) незначительно (~10%) увеличивал окисление TMPD. Эти данные хорошо коррелируют с данными по окислению 2-дезоксид-Д-рибозы.

Выводы

Существует точка зрения, что образование бис-гистидильного комплекса гемоглобина (гемихрома) или пришивку гема к белку можно рассматривать как способ молекулярной адаптации гемоглобина к редокс-условиям. На основе полученных данных можно сделать вывод, что переход гемоглобина в состояние гемихрома является модификацией, стабилизирующей белок и снижающей его восприимчивость к окислению в условиях окислительного стресса.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

- 1) Изучено участие обратимых и необратимых гемихромов в экспериментальных системах, моделирующих перекисное окисление биомолекул, в сравнении с гемоглобином в окисленном пентакоординированном состоянии. Было показано, что обратимые гемихромы во всех исследованных системах оказывают антирадикальное и антиоксидантное действие. Необратимый гемихром в зависимости от условий экспериментальной системы может вести себя разнонаправленно.
- 2) Полученные результаты позволяют сделать вывод, что переход гемоглобина в гемихромное состояние защищает биомолекулы от перекисного окисления при физиологических условиях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Russian Science Foundation) № 24-24-00210.

Литература

1. Rifkind J.M., Abugo O., Levy A., Heim J. Detection, formation, and relevance of hemochromes and hemochromes. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 231. P. 449-480.
2. Culbertson D.S., Olson J.S. Folding and Assembly of Myoglobins and Hemoglobins. In *Protein Folding and Metal Ions: Mechanisms, Biology, Disease*, P. Wittung-Stafshede, C.M. Gomes, eds. (Taylor and Francis, Inc.) 2010. pp.97-122.

3. Samuel P.P., White M.A., Ou W.C., Case D.A., Phillips Jr. G.N., Olson J.S. The interplay between molten globules and heme disassociation defines human hemoglobin disassembly. // *Biophys J.* 2020. V. 118. N 6. P. 1381-1400.
4. Robinson V.L., Smith B.B., Arnone A. A pH-dependent aquomet-to-hemichrome transition in crystalline horse methemoglobin. // *Biochemistry.* 2003. V. 42. P. 10113-10125.
5. Андреев Г.М., Кисель М.А. Образование гемихрома при взаимодействии гемоглобина с полярными производными фосфатидилхолина. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. № 4. С. 290-293.
6. Ioannou A., Varotsis C. Modifications of hemoglobin and myoglobin by Maillard reaction products (MRPs). // *PLoS One.* 2017. V. 12. e0188095.
7. Arnold E.V., Bohle D.S., Jordan P.A. Reversible and irreversible hemichrome generation by the oxygenation of nitrosylmyoglobin. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 4750-4756.
8. Shikama K. The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: a venerable puzzle. // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 1357-1373.
9. Sugawara Y., Kadono E., Suzuki A., Yukuta Y., Shibasaki Y., Nishimura N., Kameyama Y., Hirota M., Ishida C., Higuchi N., Haramoto K., Sakai Y., Soda H. Hemichrome formation observed in human haemoglobin A under various buffer conditions. // *Acta Physiol. Scand.* 2003. V. 179. P. 49-59.
10. Vergara A., Vitagliano L., Verde C., di Prisco G., Mazzarella L. Spectroscopic and crystallographic characterization of bis-histidyl adducts in tetrameric hemoglobins. // *Methods Enzymol.* 2008. V. 436. P. 425-444.
11. Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 2. С. 107-123.
12. Badior K.E., Casey J.R. Molecular mechanism for the red blood cell senescence clock. // *IUBMB Life.* 2018. V. 70. P. 32-40.
13. Pesce A., De Sanctis D., Nardini M., Dewilde S., Moens L. Reversible hexa- to penta-coordination of the heme Fe atom modulates ligand binding properties of neuroglobin and cytoglobin. // *IUBMB Life.* 2004. V. 56. P. 657-664.
14. Feng L., Zhou S., Gu L., Gell D.A., Mackay J.P., Weiss M.J., Gow A.J., Shi Y. Structure of oxidized alpha-haemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem. // *Nature.* 2005. V. 435. P. 697-701.
15. Baron C.P., Skibsted L.H., Andersen H.J. Peroxidation of linoleate at physiological pH: hemichrome formation by substrate binding protects against metmyoglobin activation by hydrogen peroxide. // *Free Radic Biol Med.* 2000. V. 28. P. 549-558.

Сведения об авторах

Ольга Владимировна Космачевская

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: rizobium@yandex.ru

Эльвира Ильгизовна Насыбуллина

канд. биол. наук, науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: lvirus198709@rambler.ru

Ольга Евгеньевна Багрова

мл. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ

Биотехнологии РАН, Москва, Россия;

Московский государственный университет

им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Эл. почта: o-bagrova@mail.ru

Игорь Сергеевич Пугаченко

канд. биол. наук, мл. науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: gewalthaber-igor@mail.ru

Information about authors

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya

PhD (Biol.), Senior Research Scientist

Federal Research Center of Biotechnology

Moscow, Russian Federation

E-mail: rizobium@yandex.ru

Elvira Ilgizovna Nasybullina

PhD (Biol.), Research Scientist,

Federal Research Center of Biotechnology,

Moscow, Russian Federation

E-mail: lvirus198709@rambler.ru

Olga Evgenievna Bagrova,

Junior Research Scientist

Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of

Biotechnology, Moscow, Russia;

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail: o-bagrova@mail.ru

Igor Sergeevich Pugachenko

PhD (Biol.), Junior Research Scientist,

Federal Research Center of Biotechnology,

Moscow, Russian Federation

E-mail: gewalthaber-igor@mail.ru

Алексей Федорович Топунов
д-р биол. наук, профессор,
зав. лабораторией
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва, Россия
Эл. почта: aftopunov@yandex.ru

Alexey Fedorovich Topunov
Doctor of Science (Biol.), Professor,
Head of Laboratory,
Federal Research Center of Biotechnology,
Moscow, Russian Federation
E-mail: aftopunov@yandex.ru

УДК 577.121:577.112.3

ГРНТИ 34.35.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.137-141

**Э.И. Насыбуллина¹, О.В. Космачевская¹, Хвесько К.В.^{1,2},
А.Ф. Топунов¹**

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследователь-
ский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Москва, Россия

²Российский химико-технологический университет им. Д.И.
Менделеева, Москва, Россия

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ЖЕЛЕЗА С КАРНОЗИНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ: ОБРАЗОВАНИЕ, АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИРАДИКАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ

Карнозиновые динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) эффективно ингибируют образование свободных радикалов, образующихся при окислении миоглобина, а также снижают образование диеновых конъюгатов, возникающих в ходе перекисного окисления арахидоновой кислоты. Антирадикальное действие карнозиновых ДНКЖ выше, чем у карнозина. Включение карнозина в качестве лигандов в ДНКЖ усиливает его антиоксидантные свойства.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, карнозин, миоглобин, перекисное окисление, окислительная модификация

**E.I. Nasybullina¹, O.V. Kosmachevskaya¹, K.V. Khvesko^{1,2},
A.F. Topunov¹**

¹Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia

DINITROSYL IRON COMPLEX WITH CARNOSINE LIGANDS: FORMATION, ANTI- OXIDANT AND ANTIRADICAL EFFECT

Carnosine dinitrosyl iron complexes (DNIC) effectively inhibit the formation of free radicals formed during myoglobin oxidation, and also reduce the formation of diene conjugates that occur during arachidonic acid peroxidation. The antiradical effect of carnosine DNIC is higher than that of carnosine. The inclusion of carnosine as a ligand in DNIC enhances its antioxidant properties.

Keywords: dinitrosyl iron complexes, carnosine, myoglobin, peroxidation, oxidative modification

Введение

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), связанные с природными соединениями, являются физиологической формой депонирования и транспорта NO[□]. В биологических системах лигандами ДНКЖ могут быть как тиоловые соединения, так и гистидинсодержащие. Имидазольный лиганд, делает комплексы более устойчивыми к окислительно-восстановительным превращениям. Такие гистидин-содержащие ДНКЖ формируются на пептидах и белках с доступными имидазольными группами, например карнозине и сывороточного

альбумина [1].

В настоящее время ведутся исследования по созданию на основе карнозина соединений, которые совмещают полезную функцию пептида и конъюгирующего фрагмента. К таким соединениям относят аналоги карнозина, содержащие NO-донорные субструктуры. В качестве примера можно привести NO-донорные карнозинамиды, полученные введением одной или двух NO-донорных нитрооксигрупп в боковую цепь амидного азота [2]. Эти соединения продемонстрировали антиоксидантную активность *in vitro* и защиту от ишемии/реперфузии *in vivo*, а также вазодилатационное действие на фрагментах аорты крысы [2]. К NO-донорным производным карнозина можно отнести ДНКЖ, в которых дипептид является лигандом.

Цель работы

Несмотря на множество положительных эффектов ДНКЖ в биологических системах до сих пор возникают вопросы, касающиеся характера и механизмов влияния этих комплексов на свободнорадикальное перекисное окисления биомолекул. Поэтому была поставлена задача изучить антиоксидантное и антирадикальное действие карнозиновых ДНКЖ в условиях, моделирующих окисление биомолекул в живых системах.

Материалы и методы

ДНКЖ с карнозиновыми лигандами получали, добавляя ДНКЖ с фосфатными лигандами к раствору карнозина в молярном соотношении 1 : 2. Образование этих комплексов контролировали с помощью спектроскопии ЭПР. Также ДНКЖ с карнозиновыми лигандами получали путем последовательного смешивания следующих компонентов: 65 мкл 0,1 М HEPES (pH 7,5), 50 мкл 0,5 М раствора карнозина, 5 мкл 8% раствора метилглиоксаля, 5 мкл 20 мМ FeSO₄ и 5 мкл 100 мМ Соли Ангели. Концентрацию ДНКЖ рассчитывали по интегральной интенсивности сигнала ЭПР этих комплексов, используя в качестве стандарта спиновую метку 4-гидрокси-ТЕМРО. Полученные препараты ДНКЖ и замораживали –70 °С или хранили в жидком азоте.

Образование свободнорадикальных интермедиатов в реакции миоглобина с гидропероксидом *трет*-бутила (*t*-BOOH) оценивали методом хемилюминесценции, используя в качестве активатора люминол. Регистрацию хемилюминесценции осуществляли на хемилюминесцентном анализаторе Lum-5773 (Россия) при постоянном перемешивании и термостатировании при 37 °С.

Диеновые конъюгаты – первичные продукты окисления арахидоновой кислоты, индуцированного реакцией Mb с *t*-BOOH, измеряли по величине оптического поглощения при 234 нм на спектрофотометре Cary 300 Bio (США).

Полученные результаты

Антирадикальное действие карнозина и карнозиновых ДНКЖ изучали в системе окисления миоглобина гидропероксидом *трет*-бутила (metMb – *t*-BOOH). Карнозин добавляли к реакционной смеси в двух концентрациях 0,1 и 1 мМ, карнозиновые ДНКЖ – 0,05 и 0,5 мМ, поскольку в состав ДНКЖ входит две молекулы карнозина. Оба соединения в значительной степени снижали продукцию свободных радикалов в исследуемой системе. Причем антирадикальный эффект ДНКЖ превосходил таковой карнозина. На это указывает снижение максимума выхода хемилюминесценции в присутствии комплексов и смещение кинетической кривой вправо. При концентрации 0,5 мМ карнозиновые ДНКЖ полностью подавляли хемилюминесценцию. Карнозин, добавленный в концентрации 0,1 мМ, совместно с Fe²⁺ ингибировал светосумму хемилюминесценции на 55%, в отличие от 80% в случае карнозина и карнозиновых ДНКЖ.

Способность карнозина ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) была ранее показана в различных модельных системах. Основываясь на этих фактах, мы решили провести сравнительное изучение действия карнозина и карнозиновых ДНКЖ на окисление арахидоновой кислоты (омега-6 ненасыщенная жирная кислота), индуцированное свободнорадикальными продуктами, образующимися в реакции metMb с *t*-BOOH. Регистрировали диеновые конъюгаты, образующиеся на начальных стадиях окисления арахидоновой кислоты. Поскольку карнозиновые ДНКЖ содержат ионы Fe²⁺, являющиеся инициатором ПОЛ, в

качестве контроля были поставлены эксперименты с карнозином и Fe^{2+} , добавленным в концентрации, эквивалентной его содержанию в ДНКЖ.

ДНКЖ в концентрации 0,05 мМ практически полностью (на 95%) подавляли образование диеновых конъюгатов, в то время как ингибирующий эффект карнозина (0,1 мМ) составлял 65%, а в сочетании с железом – 55 %. Карнозин (1 мМ) и карнозиновые ДНКЖ (0,5 мМ) снижали окисление арахидоновой кислоты примерно на 80 %.

Наименьшая начальная скорость образования диеновых конъюгатов была в образцах, содержащих карнозиновые ДНКЖ (примерно в 10 раз меньше, чем в контроле), наибольшая (такая же как в контроле) при сочетании карнозина с Fe^{2+} . Эти данные коррелируют с количеством диеновых конъюгатов, образованных к 80 минуте реакции. Добавка Fe^{2+} к контрольному образцу увеличивала скорость реакции окисления арахидоновой кислоты на 30 %, что подтверждает участие ионов железа в качестве инициатора ПОЛ в исследуемой системе. Таким образом, было показано, что сочетание Fe^{2+} с карнозином или включение его в состав ДНКЖ снижает его прооксидантный эффект.

Антиоксидантные свойства гистидиновых дипептидов помимо улавливания свободных радикалов, также могут быть обусловлены способностью имидазольного кольца дипептида связывать ионы редокс-активных металлов. Однако механизмы антиоксидантного действия гистидиновых дипептидов до конца не выяснены.

Ранее мы показали, что карнозин может существовать в виде лигандов ДНКЖ [1, 3]. Предварительное изучение антиоксидантной активности карнозиновых ДНКЖ выявило, что они снижают уровень свободных радикалов пиперазина в реакционной системе, содержащей *t*-BOOH [3]. Это действие мы объяснили способностью комплексов перехватывать органические свободные радикалы, продуцирующиеся при распаде *t*-BOOH. Кроме этого, карнозиновые ДНКЖ взаимодействуют с супероксидными анион-радикалами ($\text{O}_2^{\cdot-}$), образующимися в ферментативной системе ксантин-ксантиноксидаза [3]. Также они восстанавливают оксоферрильную форму гемовой группы, образующуюся в реакции *metMb* с *t*-BOOH [3].

Антиоксидантные свойства карнозиновых ДНКЖ могут быть обусловлены комплексным действием трех составляющих: 1) карнозиновыми лигандами, 2) оксидом азота, 3) ионами Fe^{2+} . Антиоксидантное действие карнозина хорошо известно [4]. Есть данные, что активным элементом дипептида является имидазольное кольцо гистидина [5]. Также существенный вклад в антиоксидантную активность вносит способность карнозина хелатировать Fe^{2+} и Cu^{2+} . Антиоксидантное действие NO в реакциях перекисного окисления липидов показано в различных системах *in vitro* и *in vivo* [6, 7]. В наших работах мы неоднократно описывали возможные механизмы антиоксидантного и антирадикального действия ДНКЖ с различными физиологическими лигандами [8, 9]. Однако в случае карнозиновых ДНКЖ можно предположить еще один дополнительный механизм, связанный с окислением имидазольного кольца гистидина ионами Fe^{2+} , входящими в состав комплексов. В ходе такого окисления образуется 2-оксогистидин, обладающий высокой антиоксидантной активностью [10].

Выводы

Представленное исследование поможет лучше понять функции гистидиновых дипептидов в клетке и оценить вклад металхелатирующей способности карнозина в его антиоксидантный потенциал. Это может быть полезно для дальнейшей разработки алгоритма изучения ДНКЖ с карнозиновыми лигандами для применения в фармакологии. Эти соединения можно рассматривать как прототипы лекарственных средств, совмещающих полезную функцию NO и пептида. Такие препараты могут быть использованы как гипотензивное и ранозаживляющее средство. Наличие дерматопротекторных и антиоксидантных свойств у карнозина и железодинитрозильной группы делает карнозиновые ДНКЖ перспективными для использования в лечебной косметике.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

- 1) Карнозиновые динитрозильные комплексы железа перехватывают свободные радикалы, образующиеся при распаде гидропероксида *трет*-бутила, катализируемого гемовым и негемовым железом, а также ингибируют образование диеновых конъюгатов, возникающих в ходе перекисного окисления арахидоновой кислоты.
- 2) Карнозиновые ДНКЖ оказались более эффективными антиоксидантами, чем карнозин. Это указывает на то, что включение карнозина в качестве лигандов в железонитрозильные комплексы усиливает его антиоксидантные свойства.
- 3) Показанное в работе антиоксидантное действие карнозиновых ДНКЖ намечает еще один механизм, посредством которого карнозин и другие гистидиновые дипептиды могут осуществлять антиоксидантную функцию в живых системах. Это является предпосылкой для их использования в лечении и профилактики различных заболеваний, связанных с окислительным стрессом

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Russian Science Foundation) № 24-24-00210.

Литература

1. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Ruuge E.K., Kalenikova E.I., Topunov A.F. Antioxidant and antiradical properties of histidine-bound dinitrosyl iron complexes. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. N 24. P. 17236. DOI: 10.3390/ijms242417236.
2. Bertinaria M., Rolando B., Giorgis M., Montanaro G., Marini E., Collino M., Benetti E., Daniele P.G., Fruttero R., Gasco A. Carnosine analogues containing NO-donor substructures: Synthesis, physico-chemical characterization and preliminary pharmacological profile. // *Eur. J. Med. Chem.* 2012. V. 54. P. 103-112.
3. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Gromov S.V., Novikov A.A., Topunov A.F. New dinitrosyl iron complexes bound with physiologically active dipeptide carnosine. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2017. V. 22. N 1. P. 153-160.
4. Boldyrev A.A. Does carnosine possess direct antioxidant activity? // *Int. J. Biochem.* 1993. V. 25. N 8. P. 1101-1107.
5. Peiretti G., Medana C., Visentin S., Giancotti V., Zunino V., Meineri G. Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid. // *Food Chemistry.* 2011. V. 126. N 4. P. 1939-1947.
6. Gorbunov N.V., Osipov A.N., Day B.W., Zayas-Rivera B., Kagan V.E., Elsayed N.M. Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylhemoglobin by nitric oxide: a protective mechanism against ferryl hemo-protein-induced oxidations. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 6689-6699.
7. Hummel S.G., Fischer A.J., Martin S.M., Schafer F.Q., Buettner G.R. Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 40. N 3. P. 501-506.
8. Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Грачев Д.И., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных комплексов железа. // *Биомедицинская химия.* 2021. Т. 67. № 2. С. 162-168.
9. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. Protective effect of dinitrosyl iron complexes bound with hemoglobin on oxidative modification by peroxynitrite. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. N 24. e13649.
10. Uchida K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. // *Amino Acids.* 2003. V. 25. P. 249-257.

Сведения об авторах

Эльвира Ильгизовна Насыбуллина
канд. биол. наук, науч. сотр.
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва, Россия
Эл. почта: lvirus198709@rambler.ru

Information about authors

Elvira Ilgizovna Nasybullina
PhD (Biol.), Research Scientist,
Federal Research Center of Biotechnology,
Moscow, Russian Federation
E-mail: lvirus198709@rambler.ru

Ольга Владимировна Космачевская

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: rizobium@yandex.ru

Ксения Владимировна Хвесько

мл. науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: ksenia.nikitich@gmail.com

Алексей Федорович Топунов

д-р биол. наук, профессор,

зав. лабораторией

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: aftopunov@yandex.ru

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya

PhD (Biol.), Senior Research Scientist

Federal Research Center of Biotechnology

Moscow, Russian Federation

E-mail: rizobium@yandex.ru

Kseniya Vladimirovna Khvesko

Junior Research Scientist

Federal Research Center of Biotechnology

Moscow, Russian Federation

E-mail: ksenia.nikitich@gmail.com

Alexey Fedorovich Topunov

Doctor of Science (Biol.), Professor,

Head of Laboratory,

Federal Research Center of Biotechnology,

Moscow, Russian Federation

E-mail: aftopunov@yandex.ru

УДК 577.3

ГРНТИ 34.35.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.141-146

В.И. Петухов, Е.В. Дмитриев

Владимирский гос. университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых

Институт вычислительной математики РАН

NO⁺/NO⁻ - ГЕНЕРИРУЮЩАЯ СИСТЕМА АВТОКАТАЛИЗА В КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМИСА

При анализе большого массива данных спектрометрии волос на содержание металлов (Na, K Ca, Al, Cd, Fe, Cr, Cu, Li, Pb, V и Zn) авторы пришли к выводу о несостоятельности оценки гомеостаза металлов в организме по их содержанию в волосах. По мнению авторов, анализ уровня металлов в деривате эпидермиса с использованием методов математической статистики и основных положений теории самоорганизованной критичности указывает на гомеостатический контроль над трафиком металлов на местном (клеточном) уровне.

Ключевые слова: оксид натрия, металло-лигандный гомеостаз, самоорганизованная критичность.

V.I. Petukhov, E.V. Dmitriev

Vladimir State University

Institute of Numerical Mathematics RUS

NO⁺/NO⁻ -GENERATING SYSTEM OF AUTOCATALYSIS IN EPIDERMAL CELLS

When analyzing a large array of hair spectrometry data on the content of metals (Na, K Ca, Al, Cd, Fe, Cr, Cu, Li, Pb, V and Zn), the authors came to the conclusion that the assessment of metal homeostasis in the body by their content in hair is untenable. According to the authors, the analysis of metal levels in the epidermis derivative using the methods of mathematical statistics and the basic provisions of the theory of self-organized criticality indicates homeostatic control over metal trafficking at the local (cellular) level.

Keywords: sodium oxide, metal-ligand homeostasis, self-organized criticality.

Введение (

Интерес к количественной спектрометрии металлов в придатке эпидермиса (волосы),

который сегодня можно наблюдать в некоторых медицинских центрах, во многом объясняется понятным желанием медиков найти доступный и корректный метод диагностики нарушений металло-лигандного гомеостаза (МЛГ). И хотя на первый взгляд спектрометрия волос кажется наиболее подходящей для этой цели (неинвазивный способ получения образца, возможность его длительного хранения, быстрота и точность количественного анализа), результаты наших исследований указывают на то, что такой выбор несостоятелен [1].

Дело в том, что гомеостаз металлов в эпидермисе (волосы) принципиально отличается от аналогичного процесса во всем организме. Если в первом случае речь идет о локальном гомеостатическом контроле трафика металлов в деривате эпидермиса (который, как известно, не относится к электровозбудимым тканям), то, гомеостаз *in toto* так называемых электрогенных металлов (Na, K, Ca, Mg), например, определяется их непосредственным участием в поддержании водно-электролитного баланса и нормального функционирования электровозбудимых тканей (мышечной и нервной). Поэтому содержание металлов в волосах не может служить «критерием нормальности» МЛГ на уровне всего организма. Мы допускаем возможность локального гомеостаза металлов на уровне эпидермиса.

Цель работы. Подтвердить (или отвергнуть) гипотезу о принадлежности металло-лигандного гомеостаза в деривате эпидермиса (волосы) к явлениям самоорганизованной критичности (СК-феномен).

Материалы и методы. Были проанализированы результаты атомно-эмиссионной спектрометрии (NexION 300D) образцов волос на содержание Na, K, Ca, Al, Cd, Fe, Cr, Cu, Li, Pb, V и Zn, полученные в Центре биотической медицины (Москва) от 10297 здоровых лиц - жителей Москвы и Риги (5160 мужчин и 5137 женщин) в возрасте от 2 до 85 лет. Данные спектрометрии были любезно предоставлены авторам статьи сотрудниками Центра биотической медицины для их последующего анализа методами математической статистики.

Полученные результаты.

Живая клетка, будучи открытой динамической системой, зависит от энергии, поступающей извне и требующей предварительного преобразования в конвертируемые формы (АТФ, Na^+ , H^+ и др.), с помощью которых клетка успешно справляется с энтропией на протяжении всего жизненного цикла. Не менее важна при этом надёжная регуляция внутриклеточного энергетического баланса (расход и адекватное восполнение энергии).

Гомеостаз металлов в эпидермисе имеет тесную связь с клеточной энергетикой. А поскольку нельзя исключить существование у этих процессов общих регуляторных механизмов, то изучение энергообмена может помочь выявлению и гомеостатических регуляторов металлотрафика [2].

Один из возможных подходов, с помощью которого можно анализировать саморегуляцию клеточной биоэнергетики (как в микро-, так и в макросистемах), предлагает теория "самоорганизованной критичности" (СК) [3]. С ее помощью удаётся объяснить статистику землетрясений (закон Гутенберга-Рихтера), численные закономерности роста городов и городского населения, распределение частоты употребления слов в речи и литературных текстах (закон Ципфа), фрактальную геометрию, функционирование нейронных сетей мозга и другие микро- и макроскопические явления, которые называют СК-феноменами.

Наиболее популярной моделью СК, ставшей своеобразным "брендом" этой теории, служит куча песка, образуемая постоянным добавлением его минимальных количеств до появления первых "лавины". Динамические отношения между песчинками в куче, приводящие к образованию "лавины" различного калибра, характеризуются степенной корреляционной зависимостью между размером и количеством лавин в заданном интервале измерений. Обнаружение степенной связи, которая не зависит от масштабов системы (критерий фрактальности), помогает выявлять СК-феномены в самых разных динамических системах.

Представляет интерес выявление возможной степенной связи между содержанием металлов в эпидермисе (спектрометрия волос) и числом индивидов, входящих в заданный диапазон количественных оценок. Очевидно, что такие исследования должны проводиться на

достаточно обширном статистическом материале.

Мембранные помпы - АТРазы (Р-типа), осуществляющие трафик металлов в эпидермисе, будучи осцилляторами, способны (согласно теории СК) к самоорганизации - переходу в критический (синхронный) режим работы. В качестве активаторов этих насосов могут выступать активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА), в частности NO или, точнее, его производные - ионы нитрозония (NO^+) и нитроксила ($\text{NO}^\bullet$). Основным источником этих ионов, способных S-нитрозировать тиоловые группы белков, является трехкомпонентная химическая система, состоящая из NO, негемового Fe^{2+} и низкомолекулярных тиолов, постоянно функционирующая в режиме автокатализа (по типу реакции Белоусова-Жаботинского).

В этой системе, подробно описанной А.Ф.Ваниным и соавторами [4], и назначением которой является продление медиаторной функции нитроксида, происходит постоянное взаимное превращение образующихся динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с тиолсодержащими лигандами ($\{(\text{RS})_2\text{Fe}^{2+}(\text{NO}^+)_2\}^+$) и S-нитрозотиолов (RS-NO).

Поэтому при достаточном поступлении необходимых компонентов (NO, тиолы, Fe^{2+}) такая система превращается в генератор периодических колебаний уровня NO^+ , что может приводить к сопряженным сдвигам в МЛГ за счет активирующего влияния NO^+ на мембранные АТРазы.

Сама активация Na^+/K^+ -АТРазы, Ca^{2+} -АТРазы и, возможно, других АТРаз Р-типа происходит при модификации SH-групп цистеина в их белковой молекуле с участием АФК (окисление) и/или АФА (нитрозирование).

В то же время увеличение продукции АФК и АФА в эпидермисе должно неизбежно приводить к увеличению плотности (количества) активированных АТРаз (Р-типа) на мембране клетки, способствуя тем самым самозапуску процесса синхронизации (критичности). Мы получили доказательства принадлежности МЛГ в деривате эпидермиса (волосы) к явлениям самоорганизованной критичности (СК-феномен).

Наиболее убедительные среди них:

- 1) распределение данных спектрометрии указанных металлов, которое не подчиняется "нормальному закону" и носит фрактальный характер;
- 2) достоверная линейная зависимость (Пирсон) между значениями концентраций натрия (Na) и калия (K), свидетельствующая о синхронной работе мембранных Na^+/K^+ -АТРаз;
- 3) сопряженный (кластерный) характер количественных сдвигов в МЛГ на фоне окислительного/нитрозативного стресса;
- 4) наличие степенной зависимости (подтвержденной графически в двойном логарифмическом масштабе) между содержанием металлов в эпидермисе (волосы) и числом особей в определенных интервалах численных значений для таких металлов, как Na, K, Ca, Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Li, Pb, V и Zn.

Если принять во внимание известную универсальность эволюционных механизмов адаптации, то следует допустить, что локальный (на уровне клетки) гомеостаз металлов в эпидермисе с присущей ему критичностью в работе мембранных насосов (и/или синхронизацией как частного случая критического состояния) может быть обнаружен и в других тканях. При этом основным и обязательным условием функционирования мембранных помп является поступление энергии в виде АТР или других "энергетических валют" (Na^+ , H^+), конвертируемых в клетке. Нельзя исключить при этом, что энергия необходима не только для преодоления электрохимического градиента, но и для достижения критической фазы, с которой авторы связывают возможность гомеостатического контроля трафика металлов на клеточном уровне.

Статистическая модель $\text{RS-NO} \leftrightarrow \text{ДНКЖ}$ систем.

Основным предположением является то, что функционирование $\text{RS-NO} \leftrightarrow \text{ДНКЖ}$ систем может происходить в трех режимах: докритическом, критическом и надкритическом. Каждому из этих режимов соответствует определенный диапазон возможных концентраций микроэлементов, в котором они имеют распределение принадлежащее заданному параметрическому семейству. Основной задачей является аппроксимация распределений

микроэлементов в указанных режимах и определение пороговых значений (диапазонов) концентраций.

Пусть $x = (x_1, \dots, x_n)$ – выборочные значения концентрации выделенного микроэлемента, полученные для определенной группы людей. Критический режим RS-NO↔ДНКЖ системы характеризуется синхронизацией осцилляторов, таким образом концентрации широкой группы микроэлементов подчиняются распределению Парето. Плотность вероятности распределения Парето задается формулой степенного закона

$$p_{k,m}(x) = \begin{cases} \frac{km^k}{x^{k+1}}, & x \geq m, \\ 0, & x < m, \end{cases}$$

где k и m – определяемые параметры, характеризующие носитель распределения и статистические моменты.

Докритический режим характеризуется логнормальным распределением концентраций микроэлементов. Плотность логнормального распределения задается выражением

$$p_{\mu,\sigma}(x) = \begin{cases} \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right), & x > 0, \\ 0, & x \leq 0. \end{cases}$$

Определяемые параметры μ и σ характеризуют математическое ожидание и средне-квадратическое отклонение случайной величины [1].

Плотность предполагаемого (модельного) распределения концентрации микроэлементов в докритическом и критическом режимах выражается формулой

$$p_{k,m}(x) = \begin{cases} (1 - W_{\log}) \frac{km^k}{x^{k+1}}, & x \geq m, \\ \frac{W_{\log}}{(1 - F_{tail})x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right), & 0 < x < m, \\ 0, & x \leq 0. \end{cases}$$

Здесь параметр $W_{\log}$ определяет априорную вероятность функционирования системы в докритическом режиме, а параметр F_{tail} – вероятность попадания случайной величины с логнормальным распределением в интервал соответствующий критическому режиму системы. Таким образом F_{tail} полностью определяется параметрами μ и σ и может быть вычислен по формуле

$$F_{tail} = \int_m^{+\infty} \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) dx.$$

Для аппроксимации распределений данного вида по имеющимся данным измерений строится нормализованная гистограмма с интервалами имеющими равную ширину. Гистограмма отображается и анализируется логарифмическом масштабе. Количество интервалов выбирается как среднее между оценками по правилу Доана и правилу Райса. Таким образом для 10000 измерений мы используем порядка 30 интервалов.

Первым шагом предлагаемого метода является определение критического режима. В логарифмическом (по значениям функции и аргумента) масштабе распределение Парето имеет вид линейной функции. Таким образом, для нормализованной гистограммы выбирается наибольший интервал, на котором нормализованная гистограмма аппроксимируется с помощью линейной регрессии с ошибкой не превышающей заданного порогового значения. Полученные при этом значения коэффициентов наклона и сдвига пересчитываются в значения параметров k и m .

На втором этапе производится аппроксимация распределения в докритическом режиме. Логнормальное распределение в логарифмическом масштабе представляется параболой. Для

определения соответствующих коэффициентов используется алгоритм Левенберга – Марквардта. Начальное приближение выбирается на основе метода линеаризации.

Надкритический режим соответствует наибольшим концентрациям микроэлементов. На сегодняшний день, имеющиеся у нас данные не позволяют сделать предположение о выше распределения в данном режиме. Для большей части измеряемых концентраций микроэлементов надкритическому режиму соответствуют лишь единичные измерения. Таким образом мы ограничиваемся лишь определением надкритической области, как диапазоном концентраций превышающих верхнюю границу критической области.

Для демонстрации работы метода приведем результаты с использованием данных статистического моделирования. Для этого на основе метода инверсии была случайным образом получена выборка объемом 9980 и параметрами, соответствующим характерным значениям для используемых нами данных измерений, а именно $k=2$, $\mu=0.6$, $\sigma=0.4$ и $W_{\log}=0.3$. Результаты представлены на рисунке. Можно видеть, что предлагаемый метод позволяет с приемлемой точностью определить нижнюю границу концентраций критического режима.

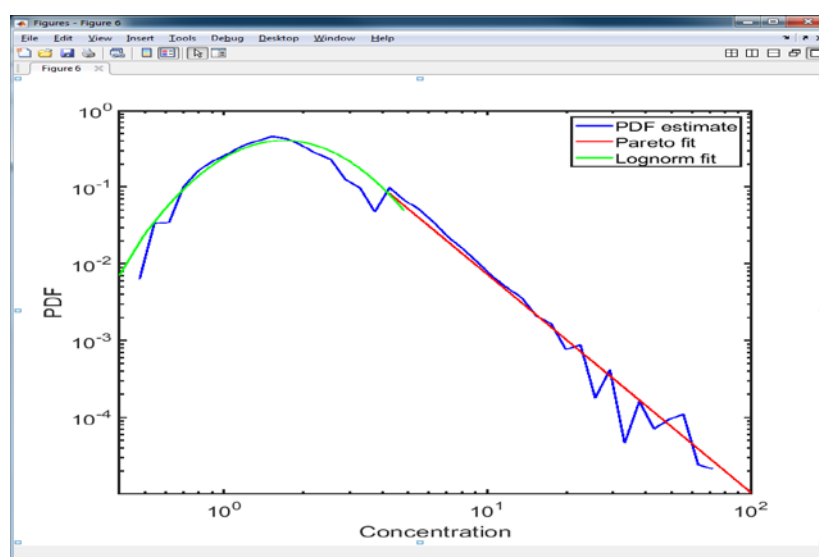


Рис. Результаты определения докритического (зеленая кривая) и критического (красная кривая) режимов по данным статистического моделирования.

Выводы.

1. Содержание металлов в деривате эпидермиса (волосы) не позволяет судить об обеспеченности металлами («нормальности» МЛГ) всего организма.
2. Обнаружение признаков самоорганизованной критичности (СК) в гомеостазе металлов на уровне эпидермиса позволяет отнести его (гомеостаз) к СК-феноменам.

Заключение

Авторы считают, что в работе новыми считаются следующие положения и результаты:

- 1) экстраполяцию данных спектрометрии металлов в таком биосубстрате, как волосы, для оценки МЛГ *in toto* – нельзя считать оправданной;
- 2) анализ спектрометрии волос с использованием методов математической статистики и концепции самоорганизованной критичности позволяет допустить существование гомеостатического контроля над трафиком металлов в деривате эпидермиса (волосы).

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам Центра биотической медицины (Москва), и в первую очередь А.Р. Грабеклису, за любезно предоставленную базу данных масс-спектрометрии волос NexION 300D (Perkin Elmer Inc., Shelton, CT, USA) для определения металлов.

Литература.

1. Petukhov V.I., Dmitriev E.V., Bauman L.Kh., Skalny A.V., Lobanova Yu.N., and Grabeklis A.R. Some aspects of regulatory criteria for metal-ligand homeostasis in epidermal cells // *Journal of Antioxidant Activity*. 2018. V. 1(3). P. 22-32.
2. Petukhov V.I., Dmitriev E.V., Bauman L.Kh., Skalny A.V., and Lobanova Yu.N. Electrogenic metals in epidermis: relationship with cell bioenergetics // *Insights in Biomed.* 2016. V. P. 9-14.
3. Bak P. *How Nature Works. The science of self-organized criticality.* Copernicus, New York, 1996.
4. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working forms” of endogenous nitric oxide. // *Nitric Oxide Biol. Chem.* 2016. V. 54. P. 15-29.

Сведения об авторах

Валерий Иванович Петухов

доктор медицинских наук, профессор. Владимирский гос. университет им. А.Г. и Н.Г. Столетовых А

Владимир, Россия

Эл. почта: vip-val@yandex.ru

Егор Владимирович Дмитриев

канд., ф.-м.н., ведущий научный сотрудник
Институт вычислительной математики РАН
Москва, Россия

Эл. почта: yegor@inm.ras.ru

Information about author

Valery Ivanovich Petukhov

Doctor of Science (Med.), Professor,
Vladimir State University,
Vladimir, Russian Federation

E-mail: vip-val@yandex.ru

Egor Vladimirovich Dmitriev

PhD (Math), Leading Researcher,
Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy
of Sciences, Moscow, Russian Federation

E-mail: yegor@inm.ras.ru

УДК 661.98:547.963.4

ГРНТИ 34.35.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.146-151

Е. С. Протасов^{1,2}, Л.Д. Колева¹,

Е. А. Бовт¹, Е. И. Синаурдзе^{1,2},

Ф. И. Атауллаханов²,

¹ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева минздрава России

²ФГБУН ЦТП ФХФ РАН

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СИСТЕМ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ-БИОРЕАКТОРОВ

Анализ математических моделей метаболических систем эритроцитов-биореакторов позволяет выявить факторы, ограничивающие эффективность работы эритроцитов-биореакторов. Использование результатов такого анализа является ключом к разработке более эффективных эритроцитов-биореакторов, а также позволяет получить оценки ключевых параметров, которые необходимы при изготовлении и использовании таких биореакторов.

Ключевые слова: математическое моделирование метаболических систем, эритроцит, гликолиз, аммоний, этанол, эритроцит-биореактор

E. S. Protasov^{1,2}, L. D. Koleva¹,
E. A. Bovt¹, E. I. Sunauridze^{1,2}, F. I. Ataullakhanov²

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center
of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology
Moscow, Russian Federation

²Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology
Moscow, Russian Federation

MATHEMATICAL MODELLING OF METABOLIC SYSTEMS AS A TOOL FOR DEVELOPMENT OF ERYTHROCYTES-BIOREACTORS

Analysis of the mathematical models of erythrocytes-bioreactors' metabolic systems reveals key factors that constrain bioreactors' efficiency. Results of such analysis are useful for development of new high-effective erythrocytes-bioreactors and obtaining of estimations of key parameters, that are necessary for production and medical use of the bioreactors.

Keywords: mathematical modelling of metabolic systems, erythrocyte, glycolysis, ammonium, ethanol, erythrocyte-bioreactor

Введение

Эритроциты-биореакторы (ЭБР) – искусственно модифицированные эритроциты, в которые помещены ферменты, катализирующие биохимические реакции, отсутствующие в нормальном эритроците. Эти биохимические реакции образуют метаболические пути, производящие или потребляющие целевые вещества. ЭБР могут быть использованы при лечении ряда болезней, в случаях, когда необходимо производить или утилизировать какое-либо вещество в кровотоке пациента. Главное преимущество использования ЭБР по сравнению с прямым введением ферментов в кровоток пациента заключается в изоляции ферментов от иммунной системы. В результате этого практически исключается возможность иммунной реакции на введение чужеродных молекул, а время жизни ферментов в кровотоке увеличивается с десятков часов до десятков дней.

К настоящему времени в различных лабораториях мира создано и исследовано множество вариантов ЭБР для утилизации аспарагина [1-2], аммония [3-4], этанола [5-6], и других веществ. Несмотря на то, что полученные ЭБР были способны функционировать *in vitro* и *in vivo*, эффективность большинства из них оставалась низкой. Причины такого исхода не были выявлены на основе анализа экспериментальных данных.

Несмотря на свою сравнительную простоту, метаболическая система эритроцита представляет собой разветвленную сеть из более чем 200 биохимических реакций, взаимодействующих между собой как прямо (через общие метаболиты), так и косвенно (аллостерическая регуляция, ингибирование и т. д.). Такая сложность метаболической системы приводит к тому, что задачи модификации метаболизма при создании ЭБР становятся практически неразрешимы на интуитивном уровне понимания метаболической системы. Методы системной биологии и математического моделирования успешно применяются в метаболической инженерии для проектирования и оптимизации модификаций метаболических систем в течение последних десятилетий. Однако при проектировании ЭБР эти методы до настоящего момента не применялись. Между тем, теоретический анализ метаболических систем ЭБР мог бы оказаться полезен не только для выявления причин низкой эффективности уже существующих ЭБР, но и для проектирования новых, более эффективных ЭБР разного назначения.

Цель работы

Теоретический анализ факторов, ограничивающих эффективность работы описанных в литературе биореакторов и использование результатов этого анализа для конструирования эффективных биореакторов на примере ЭБР, утилизирующих аммоний и ЭБР, утилизирующих этанол.

Материалы и методы

Анализ метаболических систем ЭБР проводился с помощью математического моделирования. Все математические модели представляют собой системы обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка. Правые части уравнений представляют собой производные концентрации метаболита по времени, левые – алгебраические суммы скоростей процессов, в которых данный метаболит производится или потребляется. В качестве таких процессов выступают ферментативные реакции, либо транспорт метаболита сквозь мембрану эритроцита. Скорости химических реакций описаны согласно представлениям ферментативной кинетики, данные о механизмах реакций и значения кинетических констант взяты из литературы. Процессы транспорта сквозь мембрану описываются либо приближением простой диффузии, либо с учетом физиологических механизмов транспорта (в тех случаях, когда их учет является существенным, например для транспорта пирувата и лактата). Системы дифференциальных уравнений дополнены алгебраическими уравнениями.

Математические модели включают в себя описание реакций основных блоков метаболизма эритроцита – гликолиза, пентозофосфатного пути окисления глюкозы, окислительного метаболизма, а также описание реакций встраиваемых в эритроцит метаболических путей. В работе анализируются ЭБР, утилизирующие аммоний и ЭБР, утилизирующие этанол.

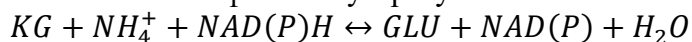
Решения систем уравнений получены численными методами в MATLAB, для анализа результатов применялись методы теории динамических систем.

Экспериментально ЭБР, утилизирующие аммоний получены методом гипотонического диализа, зависимости концентрации аммония от времени в среде *in vitro* измерены с помощью ион-селективных электродов.

Полученные результаты

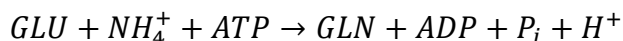
Причины низкой эффективности ранее предложенных вариантов ЭБР для утилизации аммония

Первый предложенный вариант ЭБР для утилизации аммония [3] работает на основе одноферментной системы. Включенный фермент – глутаматдегидрогеназа катализирует реакцию присоединения аммония к альфа-кетоглутарату:



Низкая эффективность этого ЭБР обусловлена низкой проницаемостью мембраны эритроцита для субстрата реакции – альфа-кетоглутарата. Скорость потребления аммония ограничена скоростью притока альфа-кетоглутарата из плазмы крови и составляет десятки мкМ в час.

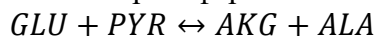
ЭБР для утилизации аммония на основе реакции, катализируемой глутаминсинтетазой [4]:



неэффективен из-за того, что глутамат не проходит сквозь мембрану эритроцита, из-за чего потребление аммония прекращается после исчерпания глутамата в клетке.

Новый вариант ЭБР для утилизации аммония

На основе анализа ранее описанных вариантов ЭБР был предложен ЭБР для утилизации аммония на основе двухферментного метаболического пути. Последовательно протекающий глутаматдегидрогеназная и аланинаминотрансферазная:



реакции. В первой из двух реакций ион аммония присоединяется к молекуле альфа-кетоглутарата с образованием глутамата, во второй аминокетогруппа переносится с глутамата на пируват с высвобождением альфа-кетоглутарата. Использование в качестве начального субстрата и конечного продукта метаболического пути пары пируват-аланин позволяет избежать проблем с транспортом (проницаемость мембраны эритроцита высока для обоих этих веществ). Альфа-кетоглутарат и глутамат потребляются и производятся в данном метаболическом пути циклически, что делает скорость потребления аммония независимой от их транспорта.

Предложенный ЭБР способен потреблять аммония в течение длительного времени, расчетная скорость потребления аммония в среде *in vitro* совпадает с экспериментальной (рис.

1).

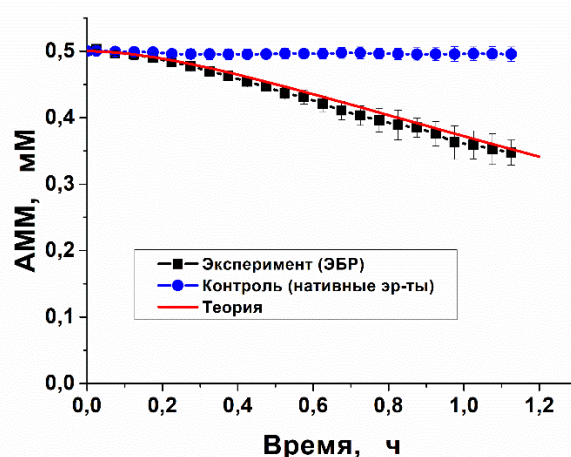


Рис. 1, Зависимость концентрации аммония от времени в среде с ЭБР на основе глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы *in vitro*.

Использование предложенного ЭБР позволяет на два порядка увеличить эффективность утилизации аммония в кровотоке по сравнению с ранее предложенными вариантами ЭБР.

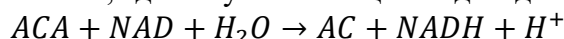
Ограничения максимальной эффективности ЭБР, утилизирующих аммоний и этанол

В стационарном состоянии максимальная скорость потребления целевого субстрата остается ограничена поступлением ключевых веществ из плазмы крови. Как для ЭБР, утилизирующих аммоний, так и для ЭБР, утилизирующих этанол таким веществом является пируват. Для реакций метаболического пути потребления аммония пируват является субстратом, максимальная скорость потребления аммония равна скорости притока пирувата извне.

Для ЭБР, потребляющих этанол, метаболический путь окисления этанола состоит из двух последовательных реакций – алкогольдегидрогеназной, где этанол окисляется до ацетальдегида:



и альдегиддегидрогеназной, где полученный ацетальдегид окисляется до ацетата:



Хотя пируват не является субстратом для этого метаболического пути, максимальная скорость окисления этанола в стационарном состоянии все равно лимитируется скоростью поступления пирувата извне. Это происходит из-за того, что пируват является субстратом лактатдегидрогеназной реакции, в которой происходит окисление NADH, восстановленного в реакциях окисления этанола. Максимальная скорость окисления этанола равна половине скорости притока пирувата из внешней среды.

В обоих метаболических путях существуют максимально допустимые значения скорости потребления целевых субстратов. При превышении этих значений в метаболической системе эритроцита происходит потеря устойчивости стационарного состояния и начинается накопление метаболитов гликолиза в клетке, что приводит к гибели клетки от осмотического лизиса. Это происходит из-за взаимодействия встраиваемых метаболических путей с собственным метаболизмом эритроцита. Непосредственной причиной потери устойчивости является снижение скорости одной из метаболических реакций из-за конкуренции за общий субстрат (NAD в случае ЭБР, утилизирующих этанол, NADPH – в случае ЭБР, утилизирующих аммоний) между собственным метаболизмом эритроцита и встраиваемым метаболическим путем. Для ЭБР, утилизирующих этанол максимально допустимая скорость окисления этанола около 1,5 мМ/ч, для ЭБР, утилизирующих аммоний максимально допустимая скорость окисления аммония – около 12 мМ/ч.

Выводы

При проектировании эритроцитов биореакторов необходимо учитывать три главных фактора, от которых зависит эффективность ЭБР

1) Мембрана эритроцита должна быть проницаема для субстратов и продуктов встраиваемых в эритроцит метаболических путей;

2) Необходимо выбирать такие встраиваемые реакции, которые протекают в нужном направлении в физиологических условиях;

3) Необходим предварительный анализ взаимодействия встраиваемых метаболических путей с собственным метаболизмом эритроцита с целью получения оценок максимально допустимых скоростей потребления субстрата

Литература

1. Борсакова, Д. В. L-аспарагиназа: новые подходы к улучшению фармакологических свойств. / Д. В. Борсакова, Е. И. Синауридзе. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. – V. 17. – №4. – P. 82-99.
2. Sinauridze, E. I. A new chemotherapeutic agent: L-asparaginase entrapped in red blood cells. / E. I. Sinauridze, V. M. Vitvitsky, A. V. Pichugin, A. M. Zhabotinsky. // The use of resealed erythrocytes as carriers and bioreactors. – 1992. – 326. P. 203-206.
3. Sanz, S. In vitro and in vivo study of glutamate dehydrogenase encapsulated into mouse erythrocytes by a hypotonic dialysis procedure. / S. Sanz, C. Lizano, J. Luque, M. Pinilla. // Life sciences. – 1999. – V. 65. – №26. – P. 2781-2789.
4. Kosenko, E. A. Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification. / E. A. Kosenko, N. I. Venediktova, A. A. Kudryavtsev, F. I. Ataullakhanov, Y. G. Kaminsky, V. Felipo, C. Montoliu. // Biochem. Cell Biol. – 2008. – V. 86. – P. 469-476.
5. Sanz, S. Biochemical properties of alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase encapsulated into human erythrocytes by a hypotonic dialysis procedure. / S. Sanz, C. Lizano, M. I. Garin, J. Luque, M. Pinilla. // Erythrocytes as drug carriers in medicine. – 1997. – P. 101-108.
6. Alexandrovich, Y. G. Rapid elimination of blood alcohol using erythrocytes: mathematical modeling and in vitro study. / Y. G. Alexandrovich, E. A. Kosenko, E. I. Sinauridze, S. I. Obydennyi, I. I. Kireev, F. I. Ataullakhanov, Y. G. Kaminsky. // BioMed Research International. – 2017. – 2017.

Сведения об авторах

Евгений Сергеевич Протасов

канд. физ.-мат. наук, мл. науч. сотр.
НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева
Москва, Россия
Эл. почта: protasov_evgenii@mail.ru

Лариса Дмитриевна Колева

канд. биол. наук, науч. сотр.
НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева
Москва, Россия
Эл. почта: larulea@mail.ru

Елизавета Андреевна Бовт

канд. биол. наук, науч. сотр.
НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева
Москва, Россия
Эл. почта: ie.bovt.rv@gmail.com

Елена Ивановна Синауридзе

д-р хим. наук., зав. лабораторией био-
физики
НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева
Москва, Россия
Эл. почта: sinaurid@list.ru

Information about authors

Eugeny Sergeevich Protasov

PhD (Phys.), Junior Research Scientist
Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology
Moscow, Russian Federation
E-mail: protasov_evgenii@mail.ru

Larisa Dmitrievna Koleva

PhD (Biol.), Research Scientist,
Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology
Moscow, Russian Federation
E-mail: larulea@mail.ru

Elizaveta Andreevna Bovt

PhD (Biol.), Research Scientist,
Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology
Moscow, Russian Federation E-mail: ie.bovt.rv@gmail.com

Olesya Viktorovna Pokidova

Doctor of Science (Chem.), Head of Laboratory of Biophysics
Institute of Problems of Dmitry Rogachev National Medical Re-
search Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology
Moscow, Russian Federation
E-mail: sinaurid@list.ru

Фазойл Иноятвич Атауллаханов

д-р биол. наук, академик РАН

ФГБУН ЦТП ФХФ РАН

Эл. почта:

ataullakhanov.fazly@gmail.com

Fazoil Inoyatovich Ataulakhanov

Doctor of Science (Biol.), RAS Academician

*Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical
Pharmacol-ogy*

E-mail: ataullakhanov.fazly@gmail.com

УДК

577.121.7:[591.463.1+591.111.1].044.3:636.1

ГРНТИ 34.35.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.151-155

А. М. Шитикова^{1,2}, М. М. Атрощенко²,

В. И. Звягина¹, Н. А. Фролова², О. В. Широкова²,

Аронова М.А.¹

¹ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

²ФГБНУ «ВНИИ коневодства»

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ СПЕРМАТОЗОИДАХ И МОНОНУКЛЕАРАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕРЕБЦОВ С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ КРИОУСТОЙЧИВОСТЬЮ СПЕРМЫ

В статье представлены результаты исследования окислительного статуса в оттаянной сперме и МЯЛ периферической крови жеребцов с высокой и низкой прогрессивной подвижностью сперматозоидов после криоконсервации.

Ключевые слова: криоконсервация спермы, МЯЛ, окислительный стресс, проточная цитометрия с визуализацией, жеребцы

A.M. Shitikova^{1,2}, M. M. Atroschenko²,

V. I. Zvyagina¹, N. A. Frolova²,

O. V. Shirokova², Aronova M.A.¹

¹Ryazan State Medical University

²All-Russian Research Institute
for Horse Breeding

OXIDATIVE STRESS IN CRYOPRESERVED SPERMATOOZOA AND PBMC OF STALLIONS WITH HIGH AND LOW SPERM CRYOSTABILITY.

The article presents the results of a study of the oxidative status in thawed sperm and PBMC of stallions with high and low progressive sperm motility after cryopreservation.

Keywords: sperm cryopreservation, PBMC, oxidative stress, imaging flow cytometry, stallions

Введение.

Применение криоконсервированной спермы нашло широкое применение в репродукции человека и животных. Однако воздействие криостресса негативно сказывается на качественных характеристиках спермы, одним из основных механизмов данного явления может явиться развитие окислительного стресса. В сперматозоидах происходит естественный синтез активных форм кислорода и азота (АФК и АФА), включая супероксидный анион, пероксид водорода и оксид азота (NO). Эти соединения участвуют в поддержании энергетического обмена мужских половых клеток и прогрессивной подвижности на достаточном уровне, а также в запуске акросомной реакции, критически важной для процесса оплодотворения. Однако при избыточном накоплении АФК/АФА возникают негативные последствия: нарушается структура и функции белков и липидов, снижается активность ферментов, дестабилизируется цитоскелет и ухудшается передача клеточных сигналов [1]. В данном контексте

особую значимость приобретает детекция уровня АФК, окислительной модификации белков (ОМБ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также определение активности антиоксидантных ферментов в криоконсервированной сперме.

Кроме того, важно исследовать окислительно-восстановительный статус мононуклеарных клеток крови у жеребцов с разной устойчивостью к криоконсервации, поскольку дисфункция иммунных клеток может провоцировать аутоиммунные реакции и повышенный синтез цитокинов и АФК, что негативно сказывается на микроокружении семенников и процессе сперматогенеза. На сегодняшний день подобных исследований крайне мало. Например, Becatti M. и соавт. (2023) обнаружили обратную зависимость между продукцией АФК лейкоцитами крови и объемом эякулята, а также между уровнем ПОЛ в плазме и общим числом сперматозоидов. Ученые предполагают, что системный окислительный стресс крови может служить маркером окислительного статуса спермы, а анализ АФК в лейкоцитах — перспективным неинвазивным методом диагностики идиопатического бесплодия перед ЭКО [2]. Этот подход также может быть потенциально полезен при отборе животных для эффективной криоконсервации спермы.

Согласно ГОСТ 24168-2017, сперма жеребцов, пригодная для оплодотворения после криоконсервации, должна иметь прогрессивную подвижность сперматозоидов не менее 25%. В связи с вышеизложенным, целью данного исследования явилось изучение показателей окислительного стресса в криоконсервированных сперматозоидах и МЯЛ периферической крови в группах жеребцов с нормальной и низкой прогрессивной подвижностью сперматозоидов после криоконсервации.

Материалы и методы.

Объект исследования

Работа выполнена на поголовье племенных хозяйств АО «Терский конный завод» (Ставропольский край) и ФГБНУ «ВНИИ коневодства» (Рязанская область). В исследование были включены 45 жеребцов арабской чистокровной породы в возрасте от 3 до 23 лет. Животные содержались в соответствии с зоотехническими нормативами при сбалансированном рационе кормления.

Сбор материала, криоконсервация и оценка качества спермы

Забор спермы проводили в период случной кампании с интервалом 48 часов. Первые две эякуляции исключали из анализа, для дальнейших исследований использовали третий эякулят. Полученный материал разбавляли средой ЛХЦЖ в пропорции 1:3. Заморозку семенного материала осуществляли в парах жидкого азота по методике ВНИИ коневодства с последующим хранением при -196°C . После размораживания в водяной бане (40°C , 90 сек) проводили оценку прогрессивной подвижности гамет с использованием системы компьютерного анализа спермы Argus CASA (ArgusSoft LTD, Россия).

Биохимические исследования

Содержание АФК определяли на проточном цитометре Cytex® Amnis® Flowsight (США) с флуоресцентными зондами DCFH-DA/PI и DHE/Calcein AM. Активность каталазы измеряли спектрофотометрически по образованию окрашенного комплекса перекиси водорода с молибдатом [3]. Активность СОД оценивали по ингибированию аутоокисления кверцетина [4]. Уровень малонового диальдегида определяли колориметрическим методом с TBARS (Elabscience®, Китай). Содержание карбонильных производных белков анализировали по методу R.L. Levine в модификации Дубининой (1995) [5]. Область под кривой спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков состоит из областей под кривой альдегиддинитрофенилгидразонов и кетондинитрофенилгидразонов, регистрируемых в ультрафиолетовой и видимой частях спектра, как описано в патенте (Фомина и др., 2014) [6]. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда с использованием коммерческого набора (Servicelabio, Китай).

Статистический анализ

Жеребцов делили на 2 группы: с нормальной ($>25\%$, $n=26$) и низкой ($<25\%$, $n=19$)

прогрессивной подвижностью сперматозоидов после криоконсервации. Обработку данных проводили в программах GraphPad Prism 9 и Excel 2016. Проверку нормальности распределения осуществляли критерием Шапиро-Уилка. Для сравнения групп применяли U-критерий Манна-Уитни. Результаты представлены как медиана [Q1; Q3]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Полученные результаты.

В оттаянной сперме жеребцов с высокой прогрессивной подвижностью после криоконсервации был обнаружен достоверно более низкий уровень АФК по сравнению с группой жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью после криоконсервации. Данные отличия были обнаружены в живых сперматозоидах как с использованием неспецифического зонда для детекции АФК DCFH-DA (рис.1, А), так и специфического маркера супероксид-аниона - DHE (рис.1, Б).

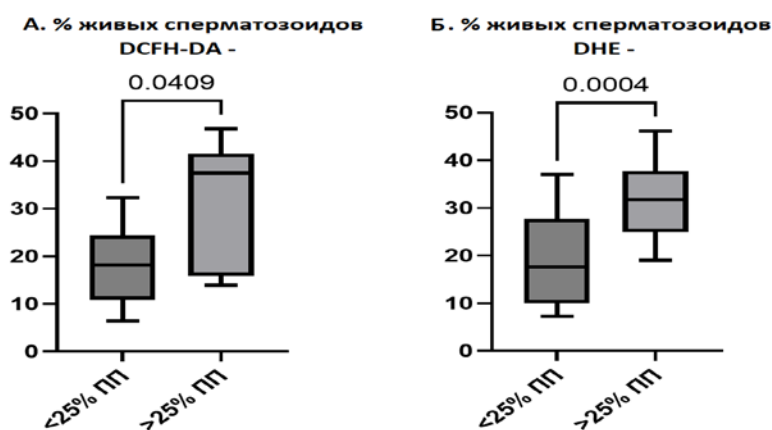


Рис.1 График, отражающий процент живых сперматозоидов, отрицательных по АФК, обнаруженных с использованием флуоресцентных зондов в криоконсервированной сперме жеребцов с низкой и высокой прогрессивной подвижностью (ПП) после криоконсервации, Me [Q1; Q3] (А- доля живых сперматозоидов, отрицательных по DCFH-DA (DCFH-DA-PI-); Б-доля живых сперматозоидов, отрицательных по DHE (DHE-Calcein AM+))

При этом в группе жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью сперматозоидов после криоконсервации наблюдалась более высокая активность ферментов антиоксидантной защиты – СОД в сперматозоидах (рис.2, А) и каталазы в МЯЛ периферической крови (рис.2, Б).

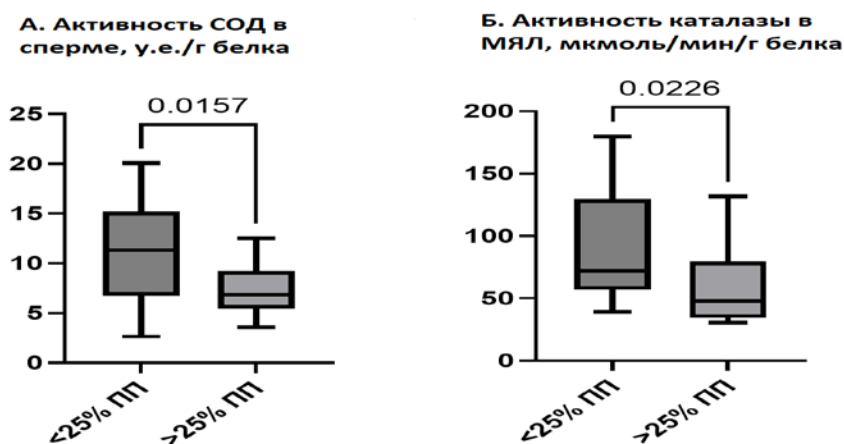


Рис.2 График, отражающий активность ферментов антиоксидантной защиты в группах жеребцов с низкой и высокой прогрессивной подвижностью (ПП) после криоконсервации, Me [Q1; Q3] (А-в оттаянной сперме; Б- в МЯЛ периферической крови)

Выводы.

Полученные данные могут говорить об интенсивной продукции первичных АФК в

группе жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью. Активность СОД, вероятно, повышается как следствие компенсаторного механизма, препятствующего развитию окислительного стресса [7], что проявляется в отсутствии достоверных отличий в изучаемых группах в концентрации вторичных маркеров окислительного повреждения, таких как ОМБ и ПОЛ. Тем не менее, происходит падение прогрессивной подвижности после криоконсервации, что является предпосылкой для добавления антиоксидантов в среду для криоконсервации в сперму жеребцов с низкой криоустойчивостью.

В МЯЛ периферической крови жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью после криоконсервации был обнаружен достоверный рост другого фермента антиоксидантной защиты- каталазы, при этом достоверных отличий в уровне ОМБ также не было обнаружено. Оценка системного окислительного статуса МЯЛ и его связи с параметрами спермы требует дальнейшего изучения, в частности, необходима детекция АФК в МЯЛ методом проточной цитометрии, который является высокочувствительным, однако, не совсем доступным в условиях коневодческих хозяйств.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: в группе жеребцов с низкой прогрессивной подвижностью после криоконсервации наблюдается более высокий общий уровень АФК, супероксида, активности СОД в оттаянной сперме и более высокая активность каталазы в МЯЛ периферической крови по сравнению с группой с нормальной прогрессивной подвижностью после криоконсервации. В группе жеребцов с низкой криоустойчивостью спермы рекомендуется добавление антиоксидантов в среду для криоконсервации. Также рекомендуется дальнейшее изучение системного окислительного статуса МЯЛ периферической крови и его связи с качественными характеристиками спермы.

Литература:

1. Peña FJ, O'Flaherty C, Ortiz Rodríguez JM, et al. Redox Regulation and Oxidative Stress: The Particular Case of the Stallion Spermatozoa. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(11):567. Published 2019 Nov 19. doi:10.3390/antiox8110567.
2. Becatti M. et al. Blood leukocyte ROS production reflects seminal fluid oxidative stress and spermatozoa dysfunction in idiopathic infertile men // *Antioxidants*. – 2023. – Т. 12. – №. 2. – С. 479.
3. Королюк М. А. и др. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело*. – 1988. – №. 1. – С. 16-19.
4. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // *Вопросы медицинской химии*. – 1990. – Т. 36. – №. 2. – С. 88-91.
5. Дубинина Е. Е. и др. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // *Вопросы медицинской химии*. – 1995. – Т. 41. – №. 1. – С. 24-26.
6. Фомина М. А., Абаленихина Ю. В. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях. – 2014.
7. Jena A. B. et al. Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2023. – Т. 162. – С. 114606.

Сведения об авторах

Шитикова Анна Михайловна

к.б.н., доцент, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России; старший научный сотрудник лаборатории криобиологии ФГБНУ «ВНИИ коневодства» Рязань, Россия
Эл. почта: anyakudlaeva@mail.ru

Information about author

Shitikova Anna Mikhailovna

PhD, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry at Ryazan State Medical University; Senior Researcher at the Laboratory of Cryobiology at the All-Russian Research Institute for Horse Breeding Ryazan, Russia
E-mail: anyakudlaeva@mail.ru

Атрошенко Михаил Михайлович

к.б.н., заведующий лабораторией, ведущий научный сотрудник лаборатории криобиологии ФГБНУ «ВНИИ коневодства»
пос. Дивово, Рыбновский район, Рязанская обл., Россия
Эл. почта: atomiks-77@mail.ru

Mikhail Mikhailovich Atroschenko

PhD, head of the laboratory, leading researcher of Cryobiology Laboratory of the All-Russian Research Institute for Horse Breeding
Divovo Village, Rybnovsky district, Ryazan region, Russia
E-mail: atomiks-77@mail.ru

Звягина Валентина Ивановна

д.м.н., доцент, доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия
Эл. почта: vizvyagina@yandex.ru

Zvyagina Valentina Ivanovna

MD, PhD, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry at Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia
E-mail: vizvyagina@yandex.ru

Фролова Наталья Александровна

младший научный сотрудник лаборатории криобиологии ФГБНУ «ВНИИ коневодства»
пос. Дивово, Рыбновский район, Рязанская обл., Россия
Эл. почта: natalya.frolowa2009@yandex.ru

Frolova Natalia Alexandrovna

junior Researcher of Cryobiology Laboratory of the All-Russian Research Institute for Horse Breeding
Divovo Village, Rybnovsky district, Ryazan region, Russia
E-mail: natalya.frolowa2009@yandex.ru

Широкова Ольга Владимировна

младший научный сотрудник лаборатории криобиологии ФГБНУ «ВНИИ коневодства»
пос. Дивово, Рыбновский район, Рязанская обл., Россия
Эл. почта: olga.shirokova.89@list.ru

Shirokova Olga Vladimirovna

junior Researcher of Cryobiology Laboratory of the All-Russian Research Institute for Horse Breeding
Divovo Village, Rybnovsky district, Ryazan region, Russia
E-mail: olga.shirokova.89@list.ru

Аронова Мария Александровна

к.п.н., доцент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия
Эл. почта: mariia.aronova@mail.ru

Aronova Maria Alexandrovna

PhD, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry at Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia
E-mail: mariia.aronova@mail.ru

УДК 616.12-008.331.1:577.152.3+577.2
ГРНТИ
76.29.35 (Кардиология)
34.35.07 (Биохимия гомоцистеина)
34.35.37 (Митохондрии)
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.155-160

**Урясьев О.М., Марсянова Ю.А.,
Бельских Э.С., Звягина В.И.**
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

**ГОМОЦИСТЕИН-ИНДУЦИРОВАННАЯ МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ:
КЛЮЧЕВОЙ МЕХАНИЗМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ**

Статья посвящена вопросу влияния гипергомоцистеинемии на показатели функционирования митохондрий сердца крыс. Нетяжелая экспериментальная гипергомоцистеинемия связанная с нагрузкой D,L-гомоцистеина тиолактона сопровождается повышением активности сукцинатдегидрогеназы и снижением интенсивности окислительной модификации белков. Применение экзогенного карнитина хлорида предотвращает изменения активности митохондриальных ферментов и поддерживает уровень окислительных процессов в кардиомиоцитах в условиях экспериментальной гипергомоцистеинемии.

Ключевые слова: гомоцистеин, гипергомоцистеинемия, карнитин, митохондрии.

HOMOCYSTEINE-INDUCED MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION: A KEY MECHANISM OF ENDOTHELIAL PATHOLOGY

The article is devoted to the issue of the influence of hyperhomocysteinemia on the indices of mitochondrial functioning in rat hearts. Mild experimental hyperhomocysteinemia associated with the load of D, L-homocysteine thiolactone is accompanied by an increase in the activity of succinate dehydrogenase and a decrease in the intensity of oxidative modification of proteins. The use of exogenous carnitine chloride prevents changes in the activity of mitochondrial enzymes and maintains the level of oxidative processes in cardiomyocytes under conditions of experimental hyperhomocysteinemia.

Keywords: homocysteine, hyperhomocysteinemia, carnitine, mitochondria.

Введение.

Гомоцистеин – промежуточный метаболит обмена протеиногенных аминокислот метионина и цистеина – является признанным маркёром эндотелиальной дисфункции [1, 2]. Его уровень может рассматриваться даже в качестве индикатора эффективности антигипертензивной терапии [3]. Высокие уровни гомоцистеина ассоциированы с повышенными рисками тромбообразования, развитием ишемической болезни сердца, метаболическим синдромом и диабетом, риском развития атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний. Повреждение эндотелия, вызванное гипергомоцистеинемией (ГГЦ), является важнейшим иницирующим событием при перечисленных состояниях. Влияние гомоцистеина на развитие эндотелиальной дисфункции и атеросклероза обусловлено несколькими факторами: активация эндотелиальных натриевых каналов и нарушение эндотелий-зависимой релаксации [4], повышение активности матриксных металлопротеиназ, что приводит к нарушению метаболизма внеклеточного матрикса, увеличению отложения коллагена и, как следствие, к сосудистому фиброзу [5]; предполагается, что цитотоксичность повышенного уровня гомоцистеина также можно объяснить S-гомоцистеинилированием цистеиновых остатков белков, что сопровождается потерей функций последних [6], увеличением продукции активных форм кислорода (АФК) и окислительного стресса (ОС) [7]. Кроме того, гомоцистеин способен нарушать функционирование синтазы оксида азота (II) (NOS), что, с одной стороны, усугубляет продукцию АФК, а с другой – вызывает снижение вазодилатирующих эффектов NO [8].

Основным механизмом развития ОС, вызванного ГГЦ, является нарушение функционирования митохондрий [9]. Митохондрии выполняют множество функций для поддержания клеточного гомеостаза: производство энергии путём окислительного фосфорилирования, объединение биосинтетических и катаболических путей, регуляция гомеостаза кальция, окислительно-восстановительного баланса, выживания и смерти клеток. Известно, что гомоцистеин способен нарушать функционирование электрон-транспортной цепи митохондрий, следствием чего становится несколько патологических последствий: снижение продукции АТФ и развитие гипоэнергетического состояния, повышение образования АФК, нарушение гомеостаза кальция, открытие митохондриальной поры проницаемости, набухание митохондрий, выход проапоптотических факторов и апоптоз клетки [10].

Одним из модуляторов метаболизма, регулирующим функционирование митохондрий, является L-карнитин. Его протективное действие при митохондриальных дисфункциях давно является предметом исследований как отечественных, так и зарубежных учёных [11, 12, 13]. В исследованиях на животных установлено положительное влияние карнитина на степень выраженности гипергомоцистеинемии [14].

Таким образом, повышенный уровень гомоцистеина отрицательно влияет на функцию митохондрий, что приводит к нарушению выработки энергии и повышению окислительного стресса, усугубляя тем самым повреждение клеток. Митохондриальная дисфункция нарушает нормальные метаболические процессы в клетке, что способствует сосудистой патологии, способствуя развитию эндотелиальной патологии. В этой связи представляет интерес

исследование влияния L-карнитина на показатели функционирования митохондрий кардиомиоцитов, как возможного метаболического регулятора, способного устранять эффекты гипергомоцистеинемии.

Цель работы.

Установить взаимосвязь между показателями митохондрий сердца и уровнем гомоцистеина крови самцов крыс Wistar в моделях легкой формы гипергомоцистеинемии на фоне воздействия экзогенного L-карнитина.

Материалы и методы.

Исследование выполнено на 24 половозрелых самцах крыс сток Wistar. Работа с животными была одобрена на заседании комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и выполнена в соответствии с этическими нормами и принципами гуманного обращения с животными. Животные содержались на базе вивария РязГМУ, получали воду и корм *ad libitum*. В эксперименте выделили 3 группы животных: контрольная – группа 1 (n=8), экспериментальные группа 2 (ГГЦ, n=8), получавшая раствор D,L-гомоцистеина тиолактона в дозе 1 г/кг массы тела/сут на протяжении 7 дней [15], и группа 3 (ГГЦ+КХ, n=8), получавшая раствор D,L-гомоцистеина тиолактона по той же схеме, что и животные группы 2, и раствор карнитина хлорида в дозе 300 мг/кг массы тела/сут в течение 21 дня. Растворы веществ готовили на питьевой воде и вводили внутривенно через зонд в два приёма: в 9.00 и в 16.00.

По окончании эксперимента животных наркотизировали, отбирали кровь для получения сыворотки, и сердце, из которого выделяли митохондриальную фракцию после гомогенизации и дифференциального центрифугирования. В плазме крови определяли содержание гомоцистеина с помощью набора ELISA Kit for Homocysteine (Cloud-Clone Corp., Китай), в митохондриях сердца – окислительную модификацию белков по реакции карбонилированных остатков аминокислот в белках с 2,4-динитрофенилгидразом, активность АТФ-синтазы по скорости гидролиза АТФ, активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) по скорости восстановления феррицианида калия, общий карнитин по методу Wan L. и Hubbard R.W., для пересчёта использовали показатель общего белка в пробе митохондрий, который определяли по методу Лоури. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 9.5.1.

Полученные результаты.

Моделирование гипергомоцистеинемии с помощью внутривенного введения водного раствора гомоцистеина тиолактона привело к повышению уровня этой аминокислоты в сыворотке крови животных на 390% относительно контрольной группы, что соответствовало лёгкой степени ГГЦ (16-30 мкмоль/л). При этом моделирование ГГЦ на фоне получения животными карнитина вызвало прирост этого показателя на 115%, однако при этом содержание гомоцистеина оставалось в пределах нормы (<16 мкмоль/л), что свидетельствовало о способности карнитина модулировать метаболизм гомоцистеина, предотвращая его накопление. Содержание общего карнитина в митохондриальной фракции сердца значимо не менялось, однако у животных, получавших одновременно гомоцистеин и карнитин – возрастало на 205% относительно животных, получавших только гомоцистеин, что подтверждало его накопление в тканях при дополнительном введении. Активность СДГ достоверно повышалась в обеих экспериментальных группах относительно контроля: на 458% и 102% соответственно, сравнение моделей ГГЦ+КХ и ГГЦ выявило достоверное снижение активности СДГ в группе 3 на 64%. Полученные данные могли указывать на компенсаторную активацию митохондриального дыхания в условиях легкой гипергомоцистеинемии и протективном действии карнитина на функционирование митохондрий в обсуждаемых условиях. Статистически значимых различий в активности АТФ-синтазы между группой 1 и группой 2 выявлено не было, но этот показатель был достоверно выше у животных группы 3 на 15% относительно контроля и на 11,8% относительно ГГЦ, что указывает на улучшение энергетического метаболизма под действием карнитина. Однако показатель окислительной модификации белков у животных с лёгкой формой ГГЦ был ниже контрольных значений на 48%, но в условиях ГГЦ+КХ –

повышался до значений контрольной группы. Неожиданное снижение ОМБ в условиях гипергомоцистеинемии может указывать на усиление адаптационных механизмов в условиях умеренного окислительного стресса, таких как активация антиоксидантных систем (глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы) или подавление прооксидантных процессов на ранних стадиях ГГЦ через модуляцию активности ферментов окислительного фосфорилирования [16]. Также снижение степени карбонилирования белков при моделировании легкой степени ГГЦ может быть обусловлено уменьшением количества мишеней для данной модификации белков, в связи с тем, что белки подвергаясь S-гомоцистеинилированию, могут становиться более устойчивыми к карбонильному стрессу. Уровень ОМБ зафиксированный в экспериментальной модели на фоне введения экзогенного карнитина хлорида был сопоставим с контрольной группой и мог указывать на нормализацию баланса окислительно-восстановительных реакций. Карнитин усиливает митохондриальное дыхание и β -окисление жирных кислот, что, вероятно, связано с умеренным увеличением продукции АФК. Об улучшении митохондриального метаболизма свидетельствует также повышение активности АТФ-синтазы и снижение СДГ в условиях получения животными карнитина. Таким образом, карнитина хлорид в условиях экспериментальной ГГЦ нормализует метаболические потоки, что может сопровождаться физиологическим уровнем АФК.

Выводы.

Гипергомоцистеинемия лёгкой степени вызывает сложные изменения в окислительном статусе, включая снижение ОМБ, что может отражать ранние компенсаторные механизмы. Карнитина хлорид в свою очередь не подавляет этот процесс, а нормализует его, одновременно улучшая энергетический метаболизм (повышение активности АТФ-синтазы) и приводя активность СДГ близкой к показателям контрольной группы. Это подтверждает гипотезу о том, что карнитин не просто антиоксидант, а может выполнять роль регулятора митохондриального гомеостаза, способного корректировать последствия ГГЦ на в митохондриях кардиомиоцитах.

Заключение.

Авторы полагают, что новизна данной работы заключается в следующих положениях и результатах: впервые показано, что лёгкая форма гипергомоцистеинемии (ГГЦ) может сопровождаться снижением окислительной модификации белков (ОМБ) в митохондриях сердца, также установлено, что карнитин не только снижает уровень гомоцистеина, но и нормализует окислительный статус митохондрий.

При поддержке гранта Президента РФ МК-4805.2022.3 и научно-исследовательского гранта ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России Акселератор грантов - 2.0: «Метаболические маркеры нарушения адаптации к гипоксии при ХОБЛ: роль гипергомоцистеинемии и дефицита карнитина»

Литература.

1. Zhang J. Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases // *Rev Cardiovasc Med.* 2022. Vol. 23, no. 2. P. 73. DOI: 10.31083/j.rcm2302073.
2. Langman L.J., Cole D.E. Homocysteine // *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1999. Vol. 36, no. 4. P. 365–406. DOI: 10.1080/10408369991239231.
3. Qin X., Li Y., Sun N., Wang H., Zhang Y., Wang J. et al. Elevated Homocysteine Concentrations Decrease the Antihypertensive Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Hypertensive Patients // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017. Vol. 37. P. 166–172. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308515.
4. Liang C., Wang Q.S., Yang X., Zhu D., Sun Y., Niu N. et al. Homocysteine Causes Endothelial Dysfunction via Inflammatory Factor-Mediated Activation of Epithelial Sodium Channel (ENaC) // *Front Cell Dev Biol.* 2021. Vol. 9. Art. 672335. DOI: 10.3389/fcell.2021.672335.
5. Pushpakumar S., Kundu S., Sen U. Endothelial Dysfunction: The Link Between Homocysteine and Hydrogen Sulfide // *Curr Med Chem.* 2014. Vol. 21, no. 32. P. 3662–3672. DOI: 10.2174/0929867321666140706142335.
6. Silla Y., Sundaramoorthy E., Talwar P., Sengupta S. S-linked Protein Homocysteinylation: Identifying Targets Based on Structural, Physicochemical and Protein-Protein Interactions of

- Homocysteinylated Proteins // *Amino Acids*. 2013. Vol. 44, no. 5. P. 1307–1316. DOI: 10.1007/s00726-013-1465-5.
7. Loscalzo J. The Oxidant Stress of Hyperhomocyst(e)inemia // *J Clin Invest*. 1996. Vol. 98, no. 1. P. 5–7. DOI: 10.1172/JCI118776.
 8. Weiss N., Heydrick S.J., Postea O., Keller C., Keaney J.F. Jr., Loscalzo J. Influence of Hyperhomocysteinemia on the Cellular Redox State — Impact on Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction // *Clin Chem Lab Med*. 2003. Vol. 41, no. 11. P. 1455–1461. DOI: 10.1515/CCLM.2003.223.
 9. Давыдкин И.Л., Мордвинова Е.В., Кузьмина Т.П., Наумова К.В., Фатенкова Е.С. Роль метаболизма гомоцистеина в развитии эндотелиальной дисфункции и артериальной гипертензии у больных множественной миеломой // *Рос кардиол журн*. 2021. № S4. С. 4573. DOI: 10.15829/1560-4071-2021-4573.
 10. Kaplan P., Tatarkova Z., Sivonova M.K., Racay P., Lehotsky J. Homocysteine and Mitochondria in Cardiovascular and Cerebrovascular Systems // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, no. 20. Art. 7698. DOI: 10.3390/ijms21207698.
 11. Modanloo M., Shokrzadeh M. Analyzing Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Apoptosis: Potential Role of L-carnitine // *Iran J Kidney Dis*. 2019. Vol. 13, no. 2. P. 74–86.
 12. Звягина В.И., Бельских Э.С. Сравнительная оценка функциональной активности митохондрий эпидидимиса крыс при окислительном стрессе, опосредованном гипергомоцистеинемией и введением L-NAME // *Журн эвол биохим физиол*. 2022. Т. 58, № 2. С. 126–140. DOI: 10.31857/S0044452922020097.
 13. Mantle D., Hargreaves I.P. Mitochondrial Dysfunction and Neurodegenerative Disorders: Role of Nutritional Supplementation // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, no. 20. Art. 12603. DOI: 10.3390/ijms232012603.
 14. Звягина В.И., Бельских Э.С., Медведев Д.В., Головач Н.А. Изучение функционального состояния митохондрий придатка яичка крыс в условиях изменения синтеза оксида азота (II) // *Казан мед журн*. 2015. Т. 96, № 5. С. 814–818. DOI: 10.17750/KMJ2015-814.
 15. Звягина В.И., Бельских Э.С. Карнитина хлорид снижает степень выраженности экспериментальной гипергомоцистеинемии и способствует утилизации лактата митохондриальной фракцией эпидидимиса крыс // *Биомед химия*. 2021. Т. 67, № 4. С. 338–346. DOI: 10.18097/PBMC20216704338.
 16. Пат. 2821656 С1 Рос. Федерация. МПК А61М 25/01, А61К 31/365, А61К 31/195. Способ моделирования легкой формы гипергомоцистеинемии у крыс : № 2024102140 : заявл. 29.01.2024 : опубл. 25.06.2024 / Э.С. Бельских, В.И. Звягина, Ю.А. Марсянова [и др.] ; заявитель ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.
 17. Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense // *World Allergy Organ J*. 2012. Vol. 5, no. 1. P. 9–19. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.

Сведения об авторах

Урясьев Олег Михайлович

д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской терапии имени профессора В.Я. Гармаша, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Эл. почта: uryasev08@yandex.ru

Юлия Александровна Марсянова

ассистент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Эл. почта: yuliyamarsyanova@yahoo.com

Эдуард Сергеевич Бельских

к.м.н., доцент кафедры факультетской терапии имени профессора В.Я. Гармаша ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Эл. почта: ed.bels@yandex.ru

Information about author

Uryasev Oleg Mikhailovich

MD, professor, Head of the Department of Faculty Therapy named after Professor V.Ya. Garmash, Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia

E-mail: uryasev08@yandex.ru

Yuliya Alexandrovna Marsyanova

Assistant Professor of the Department of Biological Chemistry, Ryazan State Medical University
Ryazan, Russian Federation

E-mail: yuliyamarsyanova@yahoo.com

Eduard Sergeevich Belskikh

PhD, Associate Professor of the Department of Faculty Therapy named after Professor V.Ya. Garmash, Ryazan State Medical University
Ryazan, Russian Federation

E-mail: ed.bels@yandex.ru

Валентина Ивановна Звягина

д.м.н., доцент кафедры биологической химии
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Эл. почта: vizvyagina@yandex.ru

Valentina Ivanovna Zvyagina

Doctor of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry, Ryazan State Medical University

Ryazan, Russian Federation

E-mail: vizvyagina@yandex.ru

УДК 57.043 ГРНТИ 34.35.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.160-164

О.И. Баум, А.К. Дмитриев, О.А. Тифлова

НИЦ «Курчатовский институт»

ЦИТОГЛОБИН В ЧАСТОТНОЙ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ ХОНДРОЦИТОВ

Диагностика сигнальной сети в хондроцитах выявила эффективность импульсного лазерного излучения (1560нм, 5Гц) в отношении синтеза протеогликана в условиях нормоксии. Предполагается, что мишенью частотной фотобиомодуляции является динамический комплекс цитоглобина с ядерной мембраной, регулирующий его распределение между ядром и цитоплазмой.

Ключевые слова: частотная фотобиомодуляция, хондроциты, протеогликан, цитоглобин, ядерная мембрана, лазерное излучение.

O.I. Baum, A.K. Dmitriev, O.A. Tiflova

NRC "Kurchatov Institute"

CYTOGLOBIN IN FREQUENCY PHOTOBIO-MODULATION OF CHONDROCYTES

Diagnostics of the signaling network in chondrocytes revealed the effectiveness of pulsed laser radiation (1560 nm, 5 Hz) in relation to proteoglycan synthesis under normoxia conditions. It is assumed that the target of frequency photobiomodulation is the dynamic complex of cytoglobin with the nuclear membrane, regulating its distribution between the nucleus and the cytoplasm.

Key words: frequency photobiomodulation, chondrocytes, proteoglycan, cytoglobin, nuclear membrane, laser radiation.

Введение

В последнее время активно исследуется роль цитоглобина – одного из представителей семейства глобинов, в функционировании генно-метаболической сети, обеспечивающей метаболизм липидов, гомеостаз железа, а также ответ на окислительный стресс, ассоциированный с воспалительными процессами и канцерогенезом [1, 2]. Спектральные характеристики глобинов [3] позволяют рассматривать цитоглобин как один из потенциальных фоторецепторов в составе сигнальной сети, индуцируемой в процессе фотобиомодуляции [4] в том числе и в наиболее перспективном для медицинского применения диапазоне оптического излучения, втором ближнем инфракрасном (NIR-II), с длинами волн 1000-1700нм, обеспечивающем глубину проникновения в ткани 4-8см при отсутствии канцерогенеза или мутагенеза [5]. Ранее нами была предложена конструкция сигнальной сети в хондроцитах, обеспечивающая фотобиомодуляцию процесса синтеза компонентов клеточного матрикса *in vitro* с помощью непрерывного ближнего инфракрасного с длиной волны 1560нм (NIR-II) лазерного излучения на основе сопоставления эффективных параметров лазерного излучения со спектральными характеристиками глобинов [6]. Перспективным подходом к выявлению фоторецепторной роли глобинов является кинетическая диагностика сигнальной сети, то есть частотная

фотобиомодуляция с помощью импульсного лазерного излучения с частотами повторения импульсов лежащих в диапазоне скоростей реакции характерных для конкретных фоторецепторов. Такой подход позволил нам выявить роль бактериальных глобинов в фотобиомодуляции биопленок опухолевого микробиома [7]. Задачей настоящего исследования является сравнение уровня фотобиомодуляции синтеза протеогликана в монослое хондроцитов при воздействии непрерывного лазерного излучения с длиной волны 1560 нм и такого же излучения с частотой повторения импульсов, соответствующей кинетическим характеристикам цитоглобина.

Цель работы

Целью данной работы является диагностика сопряженной с цитоглобином фото-индуцируемой сигнальной сети в хондроцитах с помощью импульсного лазерного излучения в NIR-II диапазоне, индуцирующего частотную фотобиомодуляцию их синтетической активности.

Методы и материалы

Для выделения клеточной культуры был взят биоптат коленного сустава кролика. Клеточная культура хрящевой ткани кролика культивировалась с использованием питательной среды DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), L-глутамина (2 мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицина (50 мкг/мл) в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). В процессе культивирования каждые 3 дня происходила смена ростовой среды. По достижению клеточной культурой монослоя клетки были рассажены для проведения эксперимента. Процедура открепления клеток проводилась по стандартному протоколу с использованием 0,25% раствора трипсина. Эксперимент проводился на клеточной культуре 1-го пассажа. За день до эксперимента клеточная культура 0-го пассажа была рассажена в два 96-луночных планшета в плотности $2,5 \cdot 10^4$ кл/лунка (в каждом по 30 лунок). На следующий день клетки подвергались различного режима лазерному воздействию. Непосредственно перед обработкой в планшетах сливали ростовую среду и добавляли в каждую лунку по 36 мкл ростовой среды, чтобы уровень жидкости в лунке составлял 1 мм. Сначала обрабатывалась половина одного планшета, затем половина другого, потом оставшиеся лунки. Обработка половины лунок каждого планшета составляла ~ 30 минут. Лазерное воздействие на клеточные культуры осуществляли с помощью эрбиевого волоконного лазера с длиной волны 1560 нм, длительность импульса 100 мс (IPG Photonics, USA) или диодного лазера с длиной волны 670 нм («Мустанг», РФ). Плотность мощности составляла 0,3 Вт/см², время экспозиции 60 с. После окончания воздействия к клеткам добавлялось по 164 мкл ростовой среды и один планшет ставился в инкубатор со стандартными условиями (37°C, 5% CO₂, 20% O₂), а второй в инкубатор с пониженным содержанием кислорода (37°C, 5% CO₂, 5% O₂). Клетки культивировались в течение двух недель. Каждый день производилась смена ростовой среды. Для оценки синтетической активности клеточной культуры использовалась окраска альциановым синим на 14 день после лазерного воздействия. Количество точек окраски в контрольных (необлученных, инкубированных в условиях нормоксии) образцах составляло – $16,5 \pm 1$. В таблице представлены данные, отражающие отношение количества протеогликана накопленного в опытных образцах к таковому в контрольных (необлученных, инкубированных в нормоксии) образцах. Каждая точка является средней из по крайней мере двух экспериментов.

Полученные результаты

При переносе клеток хондроцитов первого пассажа уже имеющих метаболизм, соответствующий условиям нормоксии [8], для дальнейшего роста в условиях гипоксии (5% O₂) накопление протеогликана после двухнедельного культивирования увеличивается четырехкратно (Таблица 1). При облучении таких хондроцитов красным (670 нм) или ближним ИК (1560 нм) лазерным излучением перед перенесением их для роста в условиях гипоксии уровень гипоксической стимуляции в те же сроки не достигает такового в контрольных (необлученных) образцах. Снижение уровня гипоксической стимуляции может достигать 20-40%. В случае культивирования облученных образцов в условиях нормоксии (20% O₂) накопление

протеогликана интенсифицируется по сравнению с необлученным контролем. Уровень стимуляции зависит от длины волны и частоты повторения импульсов. Непрерывное лазерное излучение с длиной волны 1560нм или такое излучение с частотой повторения импульсов 1Гц слабо влияют на синтез протеогликана. ИК излучение с частотой повторения импульсов 5Гц обеспечивает более чем двукратную стимуляцию синтеза по сравнению с необлученным контролем. После облучения клеток хондроцитов непрерывным красным светом уровень стимуляции синтеза протеогликанового компонента внеклеточного матрикса приближается к 300%.

Таблица 1. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на накопление протеогликана хондроцитами кролика первого пассажа.

Параметры лазерного излучения	Нормоксия, 20% O ₂	Гипоксия, 5% O ₂
Контроль	1	4.02. ± 0.1
1560нм, непрерывное	0.93 ± 0.2	3.14 ± 0.9
1560нм, 2Гц	1.11 ± 0.2	2.65 ± 0.4
1560нм, 5Гц	2.31 ± 0.5	3.33 ± 1.0
670нм, непрерывное	2.89 ± 0.6	3.4 ± 1.0

Ранее в наших экспериментах по фотобиомодуляции синтеза коллагена в хондроцитах, находившихся до облучения в условиях гипоксии наблюдалось существенное превышение уровня синтетической активности в монослое клеток, облученных непрерывным лазерным излучением с длиной волны 1560нм над контрольными показателями как в образцах, культивируемых после облучения при гипоксии, так и нормоксии [6]. Видимое же излучение в красном диапазоне не влияло в таких условиях на синтез коллагена, что резко контрастирует с ярко выраженной реакцией на такое облучение уровня синтеза протеогликана хондроцитами в условиях нормоксии (Таблица), подтверждая корреляцию эффекта с наличием в момент облучения в клетках цитохромоксидазы – фоторецептора красного света [6]. Поскольку глобины имеют полосы поглощения вблизи 1500нм [3], можно предположить, что синтез коллагена в цитоплазме интенсифицируется под действием NIR-II непрерывного излучения как ответ на активацию 2-оксоглутаратзависимой пролилгидроксилазы коллагена за счет фотостимуляции цитоглобина известного как O₂ -провайдер этого фермента в хондроцитах [1]. Одним из возможных объяснений активации после лазерного сигнала синтеза второго компонента внеклеточного матрикса - протеогликана, может служить предположение о том, что цитоглобин в хондроцитах является O₂ - провайдером и для других 2-оксоглутаратзависимых диоксигеназ, таких как деметилазы гистонов [9], транслокация которых из цитоплазмы в ядро требует тех же окислительно-восстановительных условий [10], что и транслокация через ядерную мембрану цитоглобина [11]. В наших экспериментах максимальная стимуляция наблюдается при частоте повторения импульсов 5Гц (Таблица), что совпадает с константой скорости диссоциации комплекса цитоглобин – мембранный липид *in vitro*, составляющей 5 с⁻¹ [12]. В цитоплазме фотоактивация O₂-провайдерных функций цитоглобина может приводить также и к модуляции пролилгидроксилазного домена факторов, индуцируемых гипоксией (HIF), определяющих возможность синтетической активности хондроцитов реагировать на уровень гипоксии [13]. Лазерное управление распределением HIF между ядерным и цитоплазматическим компартментами может служить одним из объяснений наблюдаемого нами ингибирующего эффекта света на синтез протеогликана в условиях гипоксии (Таблица). Таким образом, результаты наших экспериментов позволяют предположить, что мишенью частотной фотобиомодуляции синтеза протеогликанового компонента внеклеточного

матрикса хондроцитами является динамический комплекс цитоглобина с ядерной мембраной, регулирующий его распределение между ядром и цитоплазмой. С одной стороны, предлагаемый подход, учитывающий соответствие частотных параметров лазерного излучения кинетическим характеристикам глобинов, открывает возможность более корректно выявлять роль индивидуальных фоторецепторов в лазерную индукцию сигнальных сетей в определенных физиологических и патологических условиях. С другой стороны, частотная фотобиомодуляция с помощью лазерного излучения в NIR-II диапазоне может внести свой вклад в оптимизацию актуальных методик регенерации хрящевой ткани как в целях тканевой инженерии [14], так и при терапии артрита [15].

Выводы

1. Импульсное лазерное излучение в NIR-II диапазоне, поглощаемое глобинами, может служить эффективным средством для стимуляции синтеза протеогликана хондроцитами в условиях нормоксии.
2. Частотная фотобиомодуляция синтетической активности обусловлена возможностью выбора эффективных частот повторения импульсов импульсного лазерного излучения, соответствующих кинетическим параметрам цитоглобина.
3. Частотная фотобиомодуляция является необходимым инструментом для корректной оценки роли индивидуальных фоторецепторов в лазерную индукцию сигнальных сетей в определенных физиологических и патологических условиях.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые выявлена мишень частотной фотобиомодуляции синтеза протеогликанового компонента внеклеточного матрикса хондроцитами - динамический комплекс цитоглобина с ядерной мембраной, регулирующий его распределение между ядром и цитоплазмой.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература.

1. Schlosser A, Helfenrath K, Wisniewsky M, Hinrichs K, Burmester T, Fabrizius A. The knockout of cytoglobin 1 in zebrafish (*Danio rerio*) alters lipid metabolism, iron homeostasis and oxidative stress response // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2023. V. 1870(8):119558. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119558.
2. De Backer J, Hoogewijs D. The cytoglobin-dependent transcriptome in melanoma indicates a protective function associated with oxidative stress, inflammation and cancer-associated pathways // *Sci Rep.* 2024. Aug 6;14(1):18175. doi: 10.1038/s41598-024-69224-7.
3. Tse W, Whitmore N, Cheesman MR, Watmough NJ. Influence of the heme distal pocket on nitrite binding orientation and reactivity in Sperm Whale myoglobin // *Biochem J.* 2021. V. 478. P. 927-942
4. Тифлова, О.А. Laser Induction of Signal Networks in Adaptation and Regeneration: Investigation of the Contribution of Endogenous Photoreceptors and Thermoreceptors // *J. Surf. Investig.* 2020. V. 14. P. 316–317.
5. Kashiwagi S, Morita A, Yokomizo S, Ogawa E, Komai E, Huang PL, Bragin DE, Atochin DN. Photobiomodulation and nitric oxide signaling // *Nitric Oxide.* 2023. V. 130. P. 58-68.
6. О.И.Баум, А.К.Дмитриев, О.А.Тифлова. Фотобиомодуляция хондроцитов: сопряженная с цитоглобином сигнальная сеть // *Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`23 (Гурзуф, с 28 мая по 7 июня 2023г.). - 2023. - с. 132–136.*
7. Тифлова, О. А. Глобины в фотобиомодуляции биопленок опухолевого микробиома // *Biotehnologiya.* 2024. T. 40. C.109–114.
8. Boubriak O.A., Brooks J. T.S., Urban J. P. G. Cytochrome c oxidase levels in chondrocytes monolayer expansion and after return to three dimensional culture // *Osteoarthritis and Cartilage* 2009. V. 17. P. 1084-1092.

9. Hridayanka K.S.N., Duttaroy A.K., Basak S. Bioactive Compounds and Their Chondroprotective Effects for Osteoarthritis Amelioration: A Focus on Nanotherapeutic Strategies, Epigenetic Modifications, and Gut Microbiota // *Nutrients*. 2024. V.16(21):3587. doi: 10.3390/nu16213587.
10. Hahner F., Moll F., Warwick T., Hebchen D.M., Buchmann G.K., Epah J., Abplanalp W., Schader T., Günther S., Gilsbach R., Brandes R.P., Schröder K. Nox4 promotes endothelial differentiation through chromatin remodeling // *Redox Biol.* 2022. V.55:102381. doi: 10.1016/j.redox.2022.102381
11. Mathai C., Jourde'heil F., Pham L.G.C., Gilliard K., Howard D., Balnis J., Jaitovich A., Chittur S.V., Riley M., Peredo-Wende R., Ammoura I., Shin S.J., Barroso M., Barra J., Shishkova E., Coon J.J., Lopez-Soler R.I., Jourde'heil D. Regulation of DNA damage and transcriptional output in the vasculature through a cytoglobin-HMGB2 axis // *Redox Biol.* 2023.V. 65:102838. doi: 10.1016/j.redox.2023.102838.
12. Reeder B.J., Svistunenko D. A., Wilson M.T. Lipid binding to cytoglobin leads to a change in haem co-ordination: a role for cytoglobin in lipid signalling of oxidative stress // *Biochem. J.* 2011. V. 434, P. 483–492.
13. Arai Y., Cha R., Nakagawa S., Inoue A., Nakamura K., Takahashi K. Cartilage Homeostasis under Physioxia // *Int J Mol Sci.* 2024. V. 25(17):9398. doi: 10.3390/ijms25179398.
14. Hang N.L.T., Chuang A.E., Chang C.J., Yen Y., Wong C.C., Yang T.S. Photobiomodulation associated with alginate-based engineered tissue on promoting chondrocytes-derived biological responses for cartilage regeneration // *Int J Biol Macromol.* 2024. V. 280:135982. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135982.
15. Zhang R., Qu J. The Mechanisms and Efficacy of Photobiomodulation Therapy for Arthritis: A Comprehensive Review // *Int J Mol Sci.* 2023. V. 24(18):14293. doi: 10.3390/ijms241814293.

Сведения об авторах

Ольга Игоревна Баум, д. ф.-м. н., в.н.с.
НИИЦ «Курчатовский институт»
Москва, Россия
Эл. почта: baumolga@gmail.com

Александр Константинович Дмитриев,
н.с. НИИЦ «Курчатовский институт»
Москва, Россия
Эл. почта: dmitriev_a62@mail.ru

Ольга Антоновна Тифлова,
к. б. н., с.н.с. НИИЦ «Курчатовский институт»
Москва, Россия
Эл. почта: olantp@gmail.com

Information about author

Olga Igorevna Baum,
leading researcher NRC “Kurchatov Institute”
Moscow, Russian Federation
E-mail: baumolga@gmail.com

Alexander Konstantinovich Dmitriev,
researcher, NRC “Kurchatov Institute”,
Moscow, Russian Federation
E-mail: dmitriev_a62@mail.ru

Olga Antonovna Tiflova, senior researcher, NRC
“Kurchatov Institute”
Moscow, Russian Federation
E-mail: olantp@gmail.com

УДК 577.112
ГРНТИ 34.35.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.165-168

М.А. Семенова¹, О.М. Смирнова¹, В.В. Бритиков², Е.В. Бритикова²,
Я.В. Бершацкий¹, Э.В. Бочаров¹, Д.А. Долгих^{1,3}, Р.В. Черткова¹
¹ГНЦ Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Ше-
мякина и Ю. А. Овчинникова РАН
²Институт биоорганической химии НАН Беларуси
³Биологический факультет,
МГУ имени М.В. Ломоносова

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА ИЗОТОПНО-МЕЧЕНОГО НЕЙРОГЛОБИНА

Данная статья посвящена разработке системы биосинтеза изотопно-меченого нейроглобина человека. Был получен штамм-продуцент E. coli, подобраны температуры инкубирования, состав питательной среды и условия индукции экспрессии. Накоплен и охарактеризован двумерный ¹H/¹⁵N-ЯМР-спектр нейроглобина человека.

Ключевые слова: нейроглобин, глобины, изотопно-меченые белки, гемсодержащие белки, ЯМР, рекомбинантные белки

M.A. Semenova¹, O.M. Smirnova¹, V.V. Britikov², E.V. Britikova²,
Y.V. Bershatsky¹, E.V. Bocharov¹,
D.A. Dolgikh^{1,3}, R.V. Chertkova¹

¹Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

²Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus

³Biological faculty, Lomonosov Moscow State University

ISOTOPICALLY LABELED NEUROGLOBIN BIOSYNTHESIS SYSTEM DEVELOPMENT

The article is devoted to the development of a biosynthesis system for isotopically labeled human neuroglobin. E. coli producer strain was obtained, incubation temperatures, nutrient medium composition, and expression induction conditions were selected. Two-dimensional ¹H/¹⁵N-NMR spectrum of human neuroglobin was obtained and described.

Keywords: neuroglobin, globins, isotopically labeled proteins, heme proteins, NMR, recombinant proteins

Введение

Нейроглобин (Ngb) – это небольшой (16.9 кДа) гемсодержащий глобиновый белок [1, с. 520]. Ngb способен защищать нейроны, в которых он преимущественно локализован, от клеточной гибели, при этом механизмы нейропротекторной функции Ngb изучены недостаточно, но предположительно обусловлены его возможными взаимодействиями с белками-партнерами [2, с. 2306]. Хорошая водорастворимость и небольшие размеры делают Ngb перспективным объектом для исследования методами ЯМР-спектроскопии, при условии его получения в ¹³C/¹⁵N-меченом состоянии. Следовательно, необходима разработка эффективной системы биосинтеза изотопно-меченой холоформы Ngb. Структурно-динамические исследования Ngb и его предполагаемых белок-белковых комплексов методами гетероядерной ЯМР-спектроскопии позволят прояснить механизмы его нейропротекторного действия, что необходимо для последующей разработки терапевтических препаратов на основе Ngb.

Цель работы – разработка и оптимизация системы биосинтеза ¹³C/¹⁵N изотопно-меченого Ngb.

Материалы и методы.

Ночная культура клеток E. coli BL21(DE3) (10 мл среды), трансформированных плазмидным экспрессионным вектором pET-17b-Ngb, была инокулирована в 2 л LB среды. Полученную клеточную суспензию инкубировали в течение 8 часов при температуре 37°C и при перемешивании 180 об/мин. Далее клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 g и полученный осадок ресуспендировали в 1 л M9 среды, содержащей 1.3 mM MgSO₄, 0.6 mM CaCl₂, 46 мкМ тиамина, 25 мкМ пиридоксина, 10.6 мкМ рибофлавина, 0.02%

раствора микроэлементов. Далее полученную клеточную суспензию продолжали инкубировать в 2 литровых колбах Эрленмейера (по 500 мл среды на колбу) при 37°C и при перемешивании 180 об/мин. По истечении 90 мин в среду добавляли 2 г/л D-глюкозы и 0.6 г/л $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ и дополнительно инкубировали 1 ч при тех же условиях и 30 мин при 28°C и перемешивании 200 об/мин. Индукцию экспрессии осуществляли добавлением в среду ИПТГ до конечной концентрации 0.15 мМ, а также добавляли δ -аминолевулиновую кислоту (АЛК) до конечной концентрации 0.8 мМ для дополнительного обеспечения синтеза гемовой группы. Экспрессию Ngb осуществляли при 28°C и перемешивании 200 об/мин в течение 16 ч. Полученные клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 6000 g. Выделение и очистку рекомбинантного ^{15}N -меченого Ngb осуществляли с помощью методики, разработанной ранее в нашей лаборатории [3, с. 327]. Для регистрации ЯМР-спектров был подготовлен раствор Ngb (0.4 мМ) в 20 мМ фосфатном буфере, содержащем 10 мМ NaCl и 5% D_2O , pH 6.5. Полученный препарат Ngb помещали в 5 мм ЯМР-ампулу для накопления ^1H и ^{15}N -HSQC спектров при 30°C на ЯМР-спектрометре AVANCE II (Bruker, Германия) с резонансной частотой 700 МГц для протонов, оборудованном криогенно-охлаждаемым датчиком.

Полученные результаты.

Протокол экспрессии рекомбинантного Ngb человека в бактериальной системе *E. coli* на минимальной среде M9 был разработан с учетом литературных данных для других гемсодержащих белков [4, с. 72; 5, с. 17; 6, с. 155]. Схема биосинтеза предполагает культивирование клеток на богатой среде с последующим переносом культуры на минимальную среду. В ходе подбора условий были протестированы различные штаммы компетентных клеток *E. coli*: SHuffle T7, BL21(DE3), BL21(DE3) *pLysS*, но только штамм BL21(DE3) был способен обеспечить достаточный выход целевого белка. Для предотвращения существенного протекания T7 промотора перед индукцией экспрессии в среду с клетками BL21(DE3) добавляли 20 г/л D-глюкозы. Также были оптимизированы температура и времена культивирования на каждом из этапов (богатая среда/минимальная среда). Было показано, что концентрация индуктора экспрессии ИПТГ (0.15-1 мМ) не оказывает значительного влияния на эффективность экспрессии. Был проведен анализ влияния варьирования состава минимальной среды на уровень экспрессии, в том числе источников углерода и азота с использованием немеченых D-глюкозы (2-5 г/л) и хлорида аммония (0.6-2 г/л). Повышение концентрации хлорида аммония не влияло на уровень экспрессии рекомбинантного Ngb, тогда как при повышении концентрации D-глюкозы в среде наблюдали увеличение выхода итогового белка.

Для оптимизации выхода холоформы Ngb в качестве предшественника гема использовали дрожжевой экстракт в низких концентрациях (0.0002%) или АЛК в концентрациях от 0.1 до 1 мМ. Было показано, что добавление АЛК в культуральную среду увеличивает выход холоформы Ngb в более чем 10 раз по сравнению с добавлением дрожжевого экстракта.

Схема выделения и очистки рекомбинантного Ngb человека, разработанная нами ранее [3, с. 327] для экспрессии на богатой среде, оказалась эффективной и для белка, наработанного на минимальной среде. С помощью разработанной методики экспрессии и очистки можно получить 12-14 мг эффективно изотопно-меченого Ngb с высокой степенью чистоты с 1 л M9 среды, обогащенной $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ изотопами, что сопоставимо с выходом Ngb при наработке на богатой среде.

В результате был наработан, выделен и очищен ^{15}N -меченый Ngb человека, зарегистрированы его одномерный ^1H - и двумерный $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC ЯМР-спектры. Согласно накопленным спектрам, холоформа рекомбинантного Ngb получена в нативной конформации. Вместе с тем присутствие в ЯМР-спектрах двойного набора сигналов, согласуется с изомерной координацией гемовой группы [6, с. 155].

Выводы.

Таким образом, была разработана и оптимизирована система биосинтеза $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченого рекомбинантного Ngb человека, которая позволяет наработать Ngb в количествах, достаточных для анализа структурно-динамических свойств данного белка методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: получена высокоэффективная система биосинтеза $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченого Ngb человека, впервые зарегистрирован и описан двумерный $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC спектр Ngb человека.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 25-14-00436).

Литература.

1. Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain // *Nature*. 2000. V. 407. P. 520–523.
2. Brittain T., Skommer J., Raychaudhuri S., Birch N. An antiapoptotic neuroprotective role for neuroglobin // *Int. J. Mol. Sci.* 2010. V. 11. P. 2306–2321.
3. Семенова М.А., Бочкова Ж.В., Смирнова О.М., Игнатова А.А., Паришина Е.Ю., Зиганшин Р.Х., Бочаров Э.В., Браже Н.А., Максимов Г.В., Кирпичников М.П., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Разработка системы биосинтеза, выделения и очистки холодоформы рекомбинантного нейроглобина и его физико-химическая характеристика // *Биоорг. химия*. 2023. Т. 3. С. 319–330.
4. Marley J., Lu M., Bracken C. J. A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins // *J. Biomol. NMR*. 2001. V. 20. P. 71–75.
5. Britikov V.V., Bocharov E.V., Britikova E.V., Dergousova N.I., Kulikova O.G., Solovieva A.Y., Shipkov N.S., Varfolomeeva L.A., Tikhonova T.V., Timofeev V.I., Shtykova E.V., Altukhov D.A., Usanov S.A., Arseniev A.S., Rakitina T.V., Popov V.O. Unusual cytochrome c552 from *Thioalkalivibrio paradoxus*: Solution NMR structure and interaction with thiocyanate dehydrogenase // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 9969.
6. Yang Y., Allemand F., Guca E., Vallone B., Delbecq S., Roumestand C. ^1H , ^{15}N and ^{13}C backbone resonance assignments of murine met-neuroglobin, free and in complex with cyanide // *Biomol. NMR Assign.* 2015. V. 9. P. 153–156.

Сведения об авторах

Марина Андреевна Семенова

Аспирант, м.н.с.

Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Москва, Россия

Эл. почта: marinaapbch@mail.ru

Ольга Михайловна Смирнова

инженер-исследователь

Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Москва, Россия

Эл. почта: olyasmirnova00@mail.ru

Владимир Владимирович Бритиков

н.с. Институт биоорганической химии НАН Беларуси Минск, Беларусь

Эл. почта: britikov@iboch.by

Елена Вячеславовна Бритикова

н.с. Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Эл. почта: britikova@iboch.by

Ярослав Витальевич Бершацкий

м.н.с.

Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Москва, Россия

Эл. почта: bershacky.jaroslav@gmail.com

Эдуард Валерьевич Бочаров

К.х.н., с.н.с. Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Эл. почта: edvbon@mail.ru

Information about authors

Marina Andreevna Semenova

PhD student, Junior researcher

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: marinaapbch@mail.ru

Olga Mikhailovna Smirnova

Research engineer

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: olyasmirnova00@mail.ru

Vladimir Vladimirovich Britikov

Researcher Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus

Minsk, Belarus

E-mail: britikov@iboch.by

Elena Vyacheslavovna Britikova

Researcher

Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus

Minsk, Belarus, E-mail: britikova@iboch.by

Yaroslav Vytalevich Bershatsky

Junior researcher

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: bershacky.jaroslav@gmail.com

Eduard Valerevich Bocharov

PhD (Chem.), Senior researcher

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russian Federation

E-mail: edvbon@mail.ru

Дмитрий Александрович Долгих

Д.б.н., профессор, г.н.с.

*Институт биоорганической химии имени академи-
ков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломо-
носова*

Москва, Россия

Эл. почта: dolgikh@nmr.ru

Рита Валерьевна Черткова

К.б.н., с.н.с.

*Институт биоорганической химии имени академи-
ков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН*

Москва, Россия

Эл. почта: cherita@inbox.ru

Dmitry Aleksandrovich Dolgikh

*Doctor of Science(Biol.), Professor, Chief re-
searcher*

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, RAS, Biological faculty, Lomonosov
Moscow State University*

Moscow, Russian Federation

E-mail: dolgikh@nmr.ru

Rita Valerevna Chertkova

PhD (Biol.), Senior researcher

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, RAS*

Moscow, Russian Federation

E-mail: cherita@inbox.ru

УДК 612.111.6
ГРНТИ 27.39.19, 29.19.49, 29.15.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.169-172

Е.Р.Никитина
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им.И.М.Сеченова, Российской Академии Наук

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЕ И ФАРМАКОЛОГИИ

В статье обсуждается методика осмотической градиентной эктацитометрии, позволяющая исследовать реологию крови, в частности, изменение деформируемости эритроцитов, которое может быть связано с течением многих заболеваний. Известно, что снижение деформируемости эритроцитов происходит не только при анемиях различного генеза, но и при диабете, ишемических повреждениях, сердечно-сосудистых заболеваниях и онкологии. В некоторых случаях степень дефектной деформируемости может предсказать тяжесть заболевания или возникновение серьезных осложнений. К сожалению, данная методика отсутствует в клинической практике в нашей стране, а за рубежом благодаря многочисленным исследованиям, она развивается и уже введена в клиническую практику (пока только в диагностике и лечении различного рода анемий).

Ключевые слова: осмотическая градиентная эктацитометрия, эритроциты, деформируемость, диагностический потенциал

E.R.Nikitina
Sechenov institute of evolutionary physiology and biochemistry,
Russian Academy of Sciences

NEW TECHNOLOGIES IN BIOLOGY, MEDICINE AND PHARMACOLOGY

The article discusses the technique of osmotic gradient ektacytometry, which allows to study blood rheology, in particular, changes in the deformability of erythrocytes, which can be associated with the course of many diseases. It is known that a decrease in the deformability of erythrocytes occurs not only in anemia of various origins, but also in diabetes, ischemic damage, cardiovascular diseases and oncology. In some cases, the degree of defective deformability can predict the severity of the disease or the occurrence of serious complications. Unfortunately, this technique is absent in clinical practice in our country, and abroad, thanks to numerous studies, it is developing and has already been introduced into clinical practice (so far only in the diagnosis and treatment of various types of anemia).

Keywords: osmotic gradient ektacytometry, erythrocytes, deformability, diagnostic potential

Введение.

Эритроциты, являющиеся самыми многочисленными клетками крови, способны оказывать наибольшее влияние на реологию крови [1,2]. Деформируемость эритроцитов является ключевым фактором, определяющим кровоток в микроциркуляции. Во время транспорта по сосудам эритроциты подвергаются вызванному кровотоком напряжению сдвига и окислительному стрессу. Благодаря уникальным биохимическим и биофизическим свойствам эритроцитов, определяющих их функциональность, они противостоят этим условиям. Метод осмотической градиентной эктацитометрии направлен на исследование деформационных свойств и установление нарушений в мембранах эритроцитов. Оксигенация клеток и тканей организма зависит не только от способности гемоглобина связывать и отдавать кислород, но и от реологических свойств крови, которые определяются способностью эритроцитов деформироваться, поскольку их функции реализуются через свободную поверхность мембран. Деформируемость эритроцитов также является одним из главных показателей их функционального состояния. Именно благодаря этому свойству, а также высокому отношению площади к объему, эритроциты способны проникать через сеть тончайших капилляров и эффективно транспортировать газы. Среди факторов, влияющих на деформируемость эритроцитов можно выделить следующие: концентрация гемоглобина в эритроците, температура, осмотическое давление, истощение запасов АТФ, концентрация NO, нарушение белково-липидных взаимодействий.

Мембрана эритроцитов представляет собой сложную структуру, состоящую из липидного бислоя, связанного с мембранным каркасом на основе спектрина/актина, который придает эритроцитам уникальные свойства деформируемости и механической стабильности. Поддержание оптимальной формы эритроцита, обеспечивающей адекватное участие клетки в газообмене, достигается также за счет стабильности катион-транспортных систем клетки и хорошо сбалансированной молекулярной организации белкового и липидного компонентов мембраны эритроцита. Нарушение деформируемости эритроцитов, повышенная вязкость крови, гиперагрегация приводят к снижению капиллярного кровотока, ишемии и гипоксии органов и тканей, что играет важную роль в патогенезе различных заболеваний.

Цель работы.

Цель данной работы - информирование широкого круга ученых и врачей, работающих в области реологии крови и не только, о новых достижениях в диагностике различных заболеваний, как связанных, так и несвязанных с кровью.

Материалы и методы.

Исследование эритроцитов при диабете 1 типа и ишемии/реперфузии головного мозга проводилось на крысах породы Wistar. Исследование эритроцитов при гибернации (изменение температуры в диапазоне от 4 до 37°C) и подготовке к ней проводилось на крови малых сусликов (*Spermophilus pigmaeus*). Кровь для исследований деформируемости эритроцитов при гипохромной анемии была предоставлена с информированного согласия пациента.

Метод осмотической градиентной эктацитометрии (osmotic gradient ektacytometry) используется для измерения деформируемости эритроцитов при непрерывном изменении осмоляльности при различных напряжениях сдвига (от 0.5 до 30 Па). В эктацитометре используется система Куэтта для приложения напряжения сдвига к клеткам. Вращающийся внешний цилиндр и статический внутренний цилиндр используются для создания напряжения сдвига путем создания ламинарного потока при 37°C [3, 4, 5]. Поливинилпирролидон (вязкая жидкость, в которую погружаются эритроциты) находится между внешним и внутренним цилиндром. Осмотический градиент создается путем смешивания двух растворов поливинилпирролидона с аналогичными физиологическими значениями pH и вязкости, но разными осмотическими значениями. Лазерный луч проходит через суспензию крови и рассеивается из-за присутствия эритроцитов. Дифракционная картина проецируется и анализируется камерой. Этот метод позволяет оценить деформируемость эритроцитов, осмотическую хрупкость и состояние клеточной гидратации [4, 6, 7, 8]. Результатом анализа является профиль осмотической деформируемости эритроцитов - осмоскан, который характеризует изменение индекса деформируемости в зависимости от осмоляльности суспензионной среды и имеет несколько информативных параметров. К ним относятся EI max – индекс максимального удлинения или показатель максимальной деформируемости эритроцитов в ответ на возрастающее напряжение сдвига; EI min - минимальный индекс удлинения, показатель отношения поверхности к объему. Устойчивость эритроцитов к сдвигу определялась минимальной (O_{min}) и максимальной (O_{hyper}) осмоляльностями, которые клетки могли переносить при сдвиге; разница между ними (ΔO) – определяет диапазон осмотической устойчивости эритроцитов. Общая устойчивость эритроцитов к напряжению сдвига во всем диапазоне переносимых осмоляльностей определялась как площадь под кривой (Auc), которая коррелирует с деформируемостью эритроцитов.

Полученные результаты.

Уникальность нашего проекта обусловлена наличием собранного сотрудниками группы эктацитометра, способного измерять деформируемость эритроцитов в широком градиенте осмоляльности суспензионной среды при высоком (20 Па) и низком (1 Па) напряжениях сдвига, получая при этом комплексную информацию о деформируемости мембран эритроцитов, содержании воды в клетках, площади поверхности, осмотической

устойчивости эритроцитов, и, косвенно, о состоянии микровязкости мембран (данная методика модифицирована нами по сравнению с зарубежными аналогами). Эритроциты все чаще признаются в качестве биомаркеров различных заболеваний. С помощью нашего прибора мы пытаемся раскрыть потенциал осмотической градиентной эктацитометрии в диагностике и в лечении заболеваний, связанных с нарушением реологии. Проведены пилотные эксперименты по исследованию изменения деформируемости эритроцитов при различных заболеваниях и лечении: сахарный диабет 1 типа, ишемия/реперфузия головного мозга, гипохромная анемия. Данные, полученные на собранном нами приборе, хорошо согласуются с данными зарубежных исследователей, полученными на оригинальном приборе производства Нидерланды.

Считается, что осмоскан может предоставлять косвенную информацию о возрасте эритроцитов, морфологии (как статической, так и в потоке), а также об окислительно-восстановительном состоянии эритроцитов [9]. Эктацитометрия в настоящее время за рубежом широко используется для диагностики наследственных нарушений мембраны эритроцитов, таких как наследственный сфероцитоз, наследственный эллиптоцитоз и наследственный пиропойкилоцитоз [10-12]. Она зарекомендовала себя как полезный и надежный тест в диагностике наследственных гемолитических анемий, связанных с мутациями в белках цитоскелета, ионных каналах, метаболических ферментах и гемоглобине (Hb), поскольку каждая патология приводит к характерному сдвигу кривой осмоскана. Старение эритроцитов, также связано с метаболическими и структурными изменениями [13], которые приводят к ремоделированию клеточной мембраны и изменению состава цитоплазмы [14] и, в конечном счете, к снижению деформируемости.

Однако, несмотря на многочисленные преимущества метода эктацитометрии, такие функциональные тесты в настоящее время доступны только в нескольких клинических лабораториях на Западе, а оборудование для их проведения в стандартизированных условиях ограничено. В Российской Федерации данная методика не используется, по-видимому, по двум причинам: во-первых, недостаточная информированность о наличии такой методики и, во-вторых, очень высокая стоимость прибора (эктацитометра) западного производства, который выпускается только в одной стране - Нидерландах.

Выводы.

Преимущества осмотической градиентной эктацитометрии по сравнению с другими методами исследования включают чувствительность, точность и простоту использования. Поскольку нарушения реологии крови являются отличительной чертой патофизиологии большого количества заболеваний, мы полагаем, что эктацитометрию можно использовать в РФ как инструмент для диагностики тяжести различных заболеваний и в процессе лечения (для коррекции лечения). Более того, в описании к лекарственным препаратам отсутствуют данные по действию препаратов на реологию крови. Выбирая препараты для лечения больных, необходимо учитывать если не их способность улучшать, то, по крайней мере, не оказывать отрицательного влияния на реологические свойства крови, такие как деформируемость.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

1. Сконструирован и работает прибор, измеряющий деформируемость эритроцитов – осмотический градиентный эктацитометр.
2. Сделаны пилотные эксперименты по исследованию изменения деформируемости эритроцитов при различных заболеваниях и лечении: сахарный диабет 1 типа, ишемия/реперфузия головного мозга (на животных); гипохромная анемия (на людях).
3. Данные, полученные на собранном нами приборе, хорошо согласуются с данными зарубежных исследователей, полученными на оригинальном приборе производства Нидерланды.

Таким образом, анализ деформируемости эритроцитов может стать ценным

дополнением к другим методам диагностики заболеваний, а мониторинг свойств эритроцитов с помощью эктацитометра может помочь в диагностике и оценке эффективности проводимого лечения.

Литература.

1. Pop G. A., Duncker D. J., Gardien M., Vranckx P., Versluis S., Hasan D., Slager C.J. The clinical significance of whole blood viscosity in (cardio)vascular medicine // *Netherlands Heart Journal*. 2002. № 10. P.512–516.
2. Goldsmith H. L., Frank J. M., MacIntosh C. Flow behaviour of erythrocytes. Rotation and deformation in dilute suspensions // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1972. No. 182. P. 351–384.
3. Fischer T. M., Stohr-Lissen M., Schmid-Schonbein H. The red cell as a fluid droplet: tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow // *Science*. 1978. No. 202. P. 894–896. DOI:10.1126/science.715448
4. Bessis M., Mohandas N., Feo C. Automated ektacytometry: a new method of measuring red cell deformability and red cell indices // *Blood Cell*. 1980. V. 6, No. 3. P. 315–327.
5. Corry W.D. and Meiselman H.J. Centrifugal method of determining red cell deformability // *Blood*. 1978. V. 51. No.4. P.693-701.
6. Chien S. Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability // *Blood Cells*. 1980. No. 3. P.71-99.
7. Mohandas N., Clark M. R., Jacobs M. S., Shohet S. B. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability // *Journal of Clinical Investigation*. 1980b. No. 66. P. 563–573. DOI:10.1172/JCI109888
8. Linderkamp O., Nash G.B., Wu P.Y., Meiselman H.J. Deformability and intrinsic material properties of neonatal red blood cells // *Blood*. 1986. V. 67. P. 1244–1250. DOI: 10.1182/blood.V67.5.1244.1244
9. Tóth K., Mezey B., Juricskay I., Simor T., Jávör T. Hemorheologic parameters during the 6 months following myocardial infarct // *Orvosi Hetilap*. 1990. V. 131. No. 14. P. 727-730.
10. Tikhomirova I., Petrochenko E., Muravyov A., Malysheva Y., Petrochenko A., Yakusevich V., Osllyakova. Microcirculation and blood rheology abnormalities in chronic heart failure // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2017. V. 65. No. 4. P. 383-391. DOI: 10.3233/CH-16206
11. Caimi G., Carlisi M., Montana M., Gallà E., Lo Presti R., Hopps E., Siragusa S. Erythrocyte deformability and hemorheological profile in multiple myeloma // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2018. V. 68, No.1. P.25-34. DOI: 10.3233/CH-170267
12. Sengoz T., Kilic-Toprak E., Yaylali O., Kilic-Erkek O., Ozdemir Y., Oymak B., Senol H., Yuksel D., Kucukatay V., Bor-Kucukatay M. Hemorheology and oxidative stress in patients with differentiated thyroid cancer following I-131 ablation/metastasis treatment // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2020. V. 74, No. 2. P. 209-221. DOI:10.3233/CH-190717
13. Davydov DA, Marchenko VN, Katiukhin LN. Gradient ektacytometry is an objective method for assessing the determinant of the deformation properties of red blood cells // *Thrombosis, hemostasis and rheology*. 2022. P.47-52. doi: 10.25555/THR.2022.2.1019.
14. Renoux C, Parrow N, Faes C, Joly P, Hardeman M, Tisdale J, Levine M, Garnier N, Bertrand Y, Kebaili K, Cuzzubbo D, Cannas G, Martin C, Connes P. Importance of methodological standardization for the ektacytometric measures of red blood cell deformability in sickle cell anemia // *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016. No 62(2). P.173-179. doi: 10.3233/CH-151979.

Сведения об авторах

Никитина Елена Романовна

кандидат биол. наук, вед.н.с., руководитель группы
Институт эволюционной физиологии и биохимии им.И.М.Сеченова РАН
Санкт-Петербург, Россия
Эл.почта: elena.nikitina@bk.ru

Information about author

Nikitina Elena Romanovna

PhD, leading researcher, head of the group
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia
E-mail: elena.nikitina@bk.ru

УДК 616-71/-78
ГРНТИ 27.39.19, 29.19.49, 29.15.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.173-180

А.Н. Черных, М.С. Булатов, Д.А. Жидков, Г.И. Кленов,
К.С. Красильщиков, Д.Г. Орлов
НИЦ «Курчатовский институт»

ПРОЕКТ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ С ФИКСИРОВАННЫМ НАПРАВЛЕНИЕМ ПРОТОННОГО ПУЧКА ДЛЯ КОМПЛЕКСА ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ «ЛУЧ-ПРОТОН»

Протонная лучевая терапия занимает особое место в дистанционной лучевой терапии. В частности, протонная лучевая терапия показывает исключительную эффективность при лечении опухолей, расположенных вблизи критических органов, таких как зрительные нервы или ствол головного мозга. В статье представлены результаты работы по реализации многофункциональной установки с фиксированным направлением протонного пучка для протонной лучевой терапии, в частности обсуждается компоновка оборудования для реализации работы установки в двух режимах – активном формировании дозового распределения и пассивном. Приводятся текущие результаты разработки системы формирования и контроля параметров протонного пучка.

Ключевые слова: протонная лучевая терапия, комплекс протонной лучевой терапии.

УДК 616-71/-78

A.N. Chernykh, M.S. Bulatov, D.A. Zhidkov, G.I. Klenov,
K.S. Krasilshchikov, D.G. Orlov
National Research Center "Kurchatov Institute"

DESIGN OF A MULTIFUNCTIONAL FACILITY WITH A FIXED DIRECTION OF A PROTON BEAM FOR THE PROTON RADIATION THERAPY COMPLEX "LUCH-PROTON"

Proton beam therapy occupies a special place in external beam radiation therapy. In particular, proton beam therapy shows exceptional efficiency in the treatment of tumors located near critical organs, such as the optic nerve or the brain stem. The article presents the results of work on the implementation of a multifunctional facility with a fixed direction of the proton beam for proton radiation therapy, in particular, the layout of the equipment for the implementation of the facility in two modes is discussed – an active scanning and a passive scattering. The current results of the development of the beam delivery system and the system for control of the proton beam profiles are presented.

Keywords: proton beam therapy, complex of proton beam therapy.

Введение

Протонная лучевая терапия находит широкое применение в клинической практике лучевого лечения пациентов с различными локализациями злокачественных новообразований, что обусловлено, прежде всего, возможностью формирования дозовых распределений с высокими градиентами спада дозы на границах распределения. Это обеспечивает кардинальное снижение лучевой нагрузки на здоровые ткани по сравнению с традиционно используемыми для этих целей в конвенциональной лучевой терапии пучками электронов и γ -квантов, что показывает исключительную эффективность протонной терапии при лечении опухолей, расположенных вблизи критических органов, таких как зрительные нервы [1], [2] или ствол головного мозга [3]. Увеличение дозы на мишень заметно повышает вероятность локального контроля опухоли.

В настоящее время в мире насчитывается более 100 центров протонной лучевой терапии, сосредоточенных в основном в США, Японии, Европе и Китае [4]. Действующие центры протонной лучевой терапии имеют различный состав оборудования от однокабинных и специализированных установок до многокабинных центров. Правительством РФ в марте 2020 года утверждена Федеральная научно-техническая программа

развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 годы (ФНТП). В соответствии с Указом на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (далее – НИЦ «Курчатовский институт») в рамках проекта «Луч-Протон» создается комплекс протонной лучевой терапии [5].

Комплекс протонной лучевой терапии НИЦ «Курчатовский институт» включает – ускоритель с каналами транспортировки протонного пучка в два процедурных помещения: с лучевой установкой гантри для многопольного облучения пациента в положении лежа и лучевой установкой с фиксированным в горизонтальной плоскости направлением протонного пучка для облучения пациента в положении лежа и сидя, как показано на рис. 1 [6].

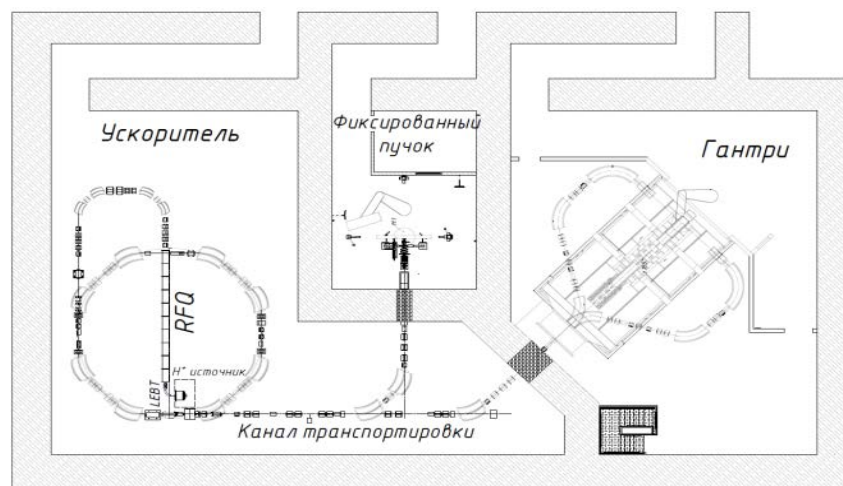


Рис. 1. Схема компоновки оборудования Комплекса протонной лучевой терапии

В статье основное внимание будет уделено лучевой установке с фиксированным в горизонтальной плоскости направлением протонного пучка. В этой работе исследуется компоновка установки, позволяющая объединить известные технологии формирования дозового распределения. Разработанная система формирования дозового поля и контроля протонного пучка, позволяет формировать пассивным методом дозовые распределения, предназначенные для проведения протонной лучевой терапии мишеней глаза (ОФТ) и орбиты глаза (ОРБ), а также включает активную систему формирования для реализации послойного формирования дозовых распределений больших размеров с размерами слоя до 400x400 мм.

Цель работы

Целью работы является разработка концепции многофункциональной специализированной установки с фиксированным направлением протонного пучка для комплекса протонной лучевой терапии «Луч-Протон», построение 3D модели системы формирования, учитывающей характеристики протонного пучка и особенности формирования дозовых распределений для протонной лучевой терапии пациентов с локализациями в области глаз и абдоминальной области (предстательной железы).

Материалы и методы

Установка с фиксированным в горизонтальной плоскости направлением протонного пучка (ГФП) предназначена для проведения протонной лучевой терапии (ПЛТ) пациентов в положении «сидя» (в базовом варианте для лечения онкоофтальмологических пациентов, далее - ОФТ) и «лежа» (в базовом варианте для пациентов с новообразованиями в абдоминальной области, в основном лечение злокачественных новообразований предстательной железы, далее - ПР).

Для ОФТ режима работы установки используется пучок протонов с энергией до 70 МэВ, формируются дозовые поля диаметром до 30 мм, с использованием пассивного

формирования методом однократного рассеяния пучка.

Для ПР режима работы установки используется пучок протонов с энергией 70-230 МэВ формируются дозовые поля до 400х400 мм, с применением метода активного формирования сканирующим пучком.

Таким образом, два режима работы установки требует двух различных компоновок оборудования на оптической скамье (ОС) ГФП для каждого из режимов работы. При ПР режиме работы для формирования дозового распределения используются два дипольных сканирующих магнита, установленных стационарно в начале ОС по ходу распространения протонного пучка. При ОФТ режиме работы на ОС должны быть размещены элементы пассивного формирования дозового распределения такие как: рассеиватель, коллиматоры, модификаторы энергетического спектра, тормозители, индивидуальные диафрагмы и болюсы.

Результаты предварительного моделирования методом Монте-Карло системы формирования дозового распределения, размещаемой на ОС и реализующей два режима работы установки, показали, что в ПР режиме для получения в плоскости изоцентра требуемых параметров поперечного распределения (в единицах сигма нормального распределения) пучка в режиме работы установки активным методом формирования (сканирующего пучка), необходимо внутри сканирующих дипольных магнитов и после них разместить гелиевую камеру, при этом расстояние, которое пучок проходит по воздуху после нее до изоцентра, не должно превышать 500 мм.

Предусматривается использование для каждого из режимов работы установки (ОФТ и ПР) отдельные приборы мониторинга положения пучка (ионизационные камеры - профилометры), и поглощенной дозы (дозиметрические ионизационные камеры) поз.10, 11, рис.2.

Для обоих режимов работы установки ГФП предполагается использовать общее оборудование рентгеновской и лазерной центрации (поз. 19 – 21, рис.2).

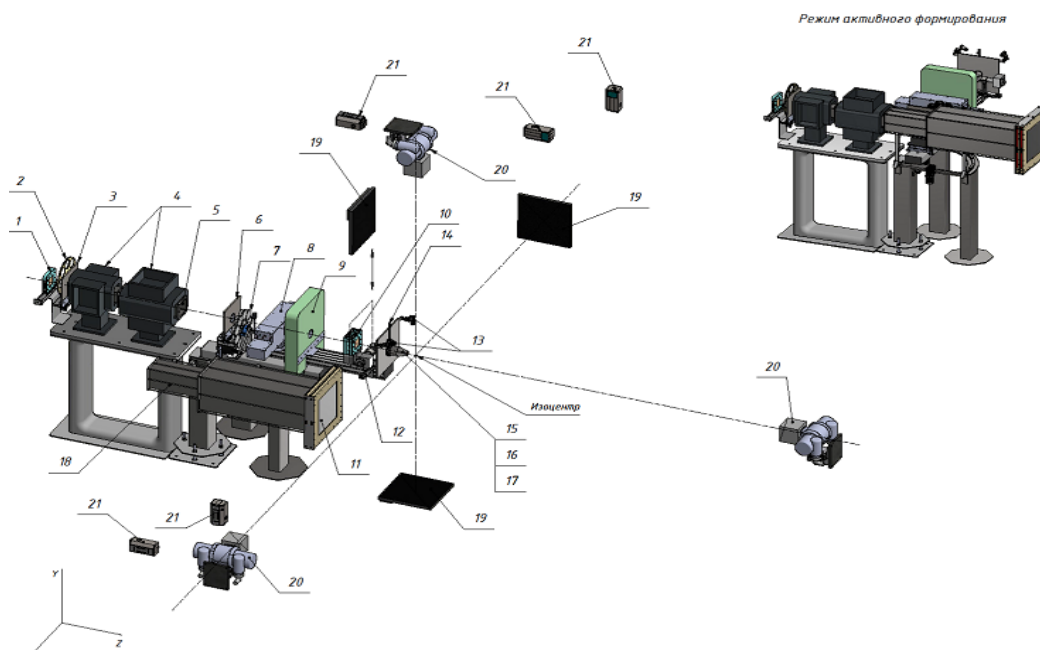


Рис.2 Общий вид компоновки оборудования для формирования, контроля протонного пучка и позиционирования пациента.

1. ИК –профилометр;
2. Барабан с рассеивателями;
3. Коллиматор;
4. Сканирующие дипольные магниты;
5. Гелиевая камера (стационарная);

6. Коллиматор;
7. Барабан с МЭСП;
8. Устройство регулирования глубины пробега протонного пучка – тормозитель;
9. Биологическая защита;
10. Блок ионизационных камер для режима ОФТ;
11. Блок ионизационных камер для режима ПР;
12. Световой центратор;
13. Камера контроля взора;
14. Фиксационная точка;
15. Выходной коллиматор со съёмным коллиматором «носиком»;
16. Чистовая диафрагма;
17. Болюс;
18. Дополнительная гелиевая камера (устанавливаемая при ПР-режиме);
19. Рентгеновские детекторы;
20. Рентгеновские трубки;
21. Лазерные центраторы;

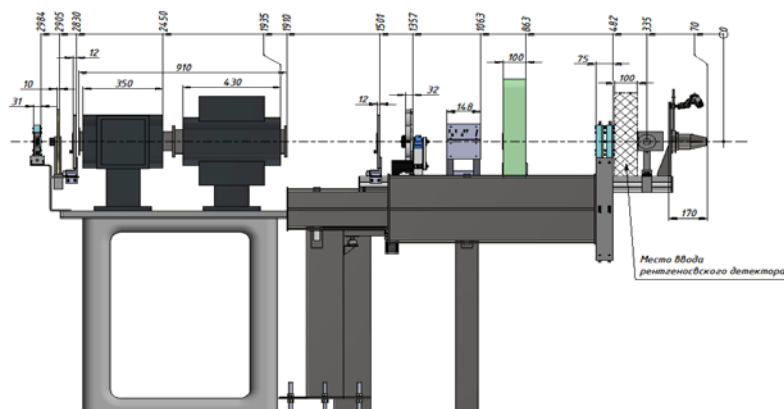


Рис.3 Размещение на оптической скамье оборудования для формирования дозовых распределений при ОФТ режиме работы установки.

Схема ОС для ОФТ режима: Схема размещения оборудования представлена на Рис.3 и учитывает размещение всех необходимых элементов. Изоцентр установки находится на расстоянии 7 см от обреза чистовой диафрагмы. Окончательное размещение всего набора оборудования для облучения ОФТ-мишеней будет определено после проведения верификационного моделирования методом Монте-Карло - с учетом размещения всех рассеивающих элементов в интервале 900-1200 мм расстояния от изоцентра.

Основная рассматриваемая схема компоновки ОС для рассеянного пучка предполагает следующее расположение рабочих элементов после плиты биологической защиты (поз. 9, рис.2):

- блок ионизационных камер: комбинированной (профилометр и дозиметрическая) и отдельной дозиметрической с рабочими размерами окна 80 x 80 мм и толщиной ~ 75 мм располагается на расстоянии от изоцентра 482 мм;
- зазор (около 50-80мм) для размещения рентгеновского детектора, устанавливаемого на время проведения процедуры рентгеновской центрации;
- световой центратор (около 100 мм);

- выходной коллиматор со съемным коллиматором «носиком» (около 170 мм);
- необходимое расстояние от изоцентра до обреза чистовой диафрагмы - 70 мм.

При этом элементы пп. 6 – 10 и 12 – 17 (рис.2) расположены на едином конструкционном профиле и при смене режима работы установки убираются с оси распространения протонного пучка путем автоматизированного поворота профиля на 90 градусов.

Схема ОС для ПР режима: Схема размещения оборудования для ПР режима работы установки (сканирующий пучок) представлена на рис.4.

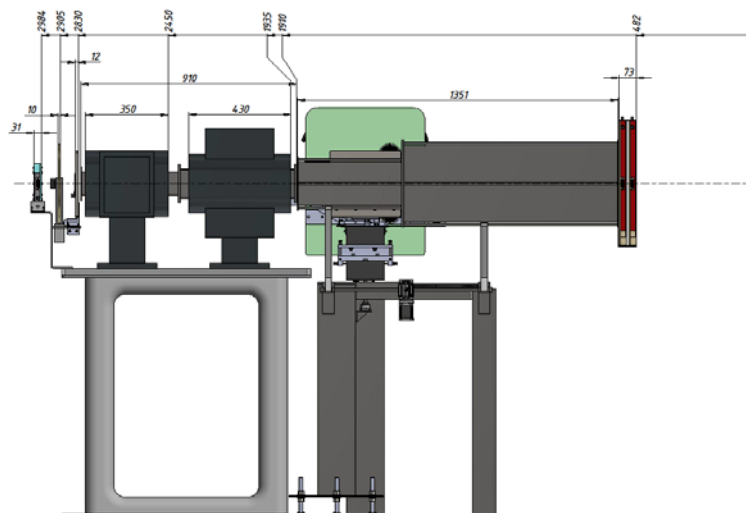


Рис.4 Размещение оборудования на оптической скамье для формирования дозовых распределений при ПР режиме работы установки.

В ПР режиме работы установки после сканирующих дипольных магнитов со стационарной гелиевой камерой устанавливается дополнительная гелиевая камера (поз. 18, рис.2), на выходном фланце которой установлен блок ионизационных камер (поз.11, рис.2). Общая длина дополнительной гелиевой камеры составляет 1351 мм и размещается она до отметки 482 мм от изоцентра (см. рис.4). Блок ионизационных камер (ИК), установленный на выходном фланце камеры состоит из: комбинированной (профилометр и дозиметрическая) ИК и отдельно дозиметрической с рабочими размерами окна 350 x 350 мм и толщиной до 100 мм. В воздушном промежутке от блока ИК до изоцентра в непосредственной близости к блоку ИК размещается детектор рентгеновского излучения (поз. 19, рис.2), ввод которого осуществляется на время проведения процедуры рентгеновской центрации.

При этом элементы поз. 11, 18 (рис.2) расположены на едином поворотном механизме и при смене режима работы устанавливаются/убираются с оси распространения протонного пучка путем поворота на 90 градусов.

Оборудование системы мониторинга пучка и поглощенной дозы (СМПД): СМПД установки ГФП состоит из двух типоразмеров ионизационных камер с чувствительной областью сигнальных электродов не менее 80x80 мм и 300x300 мм - для контроля геометрических параметров пучка (профилометры) и для контроля отпускаемой дозы (дозовые).

Контроль геометрических параметров пучка. Точность определения центра тяжести пучка будет составлять не хуже 0,5 мм. Предположительно, достижение требуемой точности возможно при использовании стриповой ИК 350 x 350 мм с количеством

стрипов 128x128 (с шагом 2,73 мм). Для этого понадобится цифровая обработка сигналов в реальном времени, выполняемая посредством реализации электрометром и встроенным программным обеспечением (ВПО), аппаратурой FPGA алгоритмов нахождения центра тяжести.

Для ОФТ режима работы установки для анализа формы поперечного сечения и центра тяжести пучка предлагается использовать ИК типоразмера 80x80 мм с количеством стрипов 64x64 (с шагом 1,25 мм).

Также, в составе СМПД имеется встроенное программное обеспечение (ВПО), решающее эти задачи.

Контроль отпускаемой дозы. Отпуск дозы для двух режимов работы установки существенно различается.

Для режима ПР с помощью дозиметрических ИК измеряется величина отпускаемой дозы в облучаемый спот (в мониторинговых единицах - МЕ).

Для ОФТ режима с помощью дозиметрических ИК измеряется величина отпускаемой дозы (в МЕ) на весь объем мишени.

Электрометр дозиметрической ионизационной камеры должен работать в режиме непрерывного счета, интегрального измерения тока в течение нескольких секунд.

Средства систем позиционирования пациента включает в себя универсальный роботизированный позиционер с возможностью трансформирования рентгенопрозрачной деки в кресло, ортогональную систему 2D лазерной визуализации системы координат установки и ортогональную систему 2D рентгеновской визуализации для проверки положения пациента в изоцентре.

Универсальный роботизированный позиционер для размещения пациента в положении лежа и сидя.

Для позиционирования пациента используется роботизированная система с шестью степенями свободы.

Лазерные позиционеры.

Для визуализации координатных осей установки, с центром в изоцентре установки предлагается использовать 5 лазерных блоков (поз. 21, рис.2), при этом все блоки работают в режиме развертки лазерной плоскости.

Для визуализации плоскостей XZ и XY используется две пары лазерных блоков, расположенных по обе стороны от системы формирования дозового распределения на стенах процедурного помещения друг напротив друга.

Для визуализации плоскости YZ используется один лазерный блок, расположенный на потолке процедурного помещения.

Рентгеновские позиционеры.

Для рентгеновского позиционирования предлагается использовать три идентичные пары рентгеновских источников и детекторов (поз. 19, 20, рис.2). При этом предлагается источники рентгеновского излучения расположить стационарно, а детекторы на выдвижных механизмах, позволяющих размещать их в рабочем положении при выполнении рентгеновских снимков и убирать в защитные боксы при проведении процедуры облучения.

Пара источник/детектор расположенная на оси Z (ось системы формирования дозового распределения) используется при обоих режимах работы установки. При этом детектор располагается на расстоянии 400 – 450 мм от изоцентра установки. Две других пары источник/детектор расположенные на осях X и Y используется только при режимах работы ОФТ и ПР соответственно. При этом для размещения источников относительно изоцентра установки имеется большой запас по расстоянию до стен процедурного помещения (около 2,5 м). Высота несущего потолка согласно проектной документации 8 м.

Система рентгеновского позиционирования согласно проведенным расчетам обеспечит точность позиционирования пациента в пределах $\pm 0,5$ мм.

Заключение

В статье представлены результаты предварительной разработки конструкции многофункциональной установки с фиксированным направлением протонного пучка для комплекса протонной лучевой терапии НИЦ «Курчатовский институт». Для выполнения функциональных требований к лучевой установке сформирована концепция компоновки оборудования многофункциональной установки с фиксированным направлением протонного пучка.

Проведенные предварительные исследования конструкции многофункциональной установки с фиксированным направлением протонного пучка закладывают основу для дальнейшего выполнения технического проекта и изготовление основных элементов установки.

Проведенные исследования выполнялись в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература

1. Eva Biewald et al. "Feasibility of proton beam therapy as a rescue therapy in heavily pre treated retinoblastoma eyes". In: *Cancers (Basel)* 13.8 (2021), p. 1862.
2. Marina Marinkovic et al. "Clinical outcomes after international referral of uveal melanoma patients for proton therapy". In: *Cancers (Basel)* 13.24 (2021), p. 6241.
3. Stephanie G C Kroeze et al. "A prospective study on health-related quality of life and patient-reported outcomes in adult brain tumor patients treated with pencil beam scanning proton therapy". In: *Cancers (Basel)* 13.19 (2021), p. 4892.
4. WWW.PTCOG (Particles Therapy Co-Operative Group), Online 2025.
5. Ковальчук М.В., Нарайкин О.С., Сергунова К.А. и др. Распределенный центр ядерной медицины НИЦ «Курчатовский институт»: история, современное состояние и перспективы развития (научная статья), *Кристаллография*, 2022, №67, Том 5, С. 801 – 817
6. Черных А.Н. Проект центра протонной лучевой терапии в НИЦ «Курчатовский институт», Москва / Булатов М.С., Жидков Д.А., Кленов Г.И., Хорошков В.С., Черных А.Н.// Сборник трудов Международной конференции NT + ME`22. - С. 343-352.

Сведения об авторах

Алексей Николаевич Черных

кандидат техн. наук, старший научный сотрудник
НИЦ «Курчатовский институт»
123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Эл. почта: Chernykh_AN@nrcki.ru

Геннадий Иванович Кленов

доктор техн. наук, зам. начальника отдела
НИЦ «Курчатовский институт»
123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Эл. почта: Klenov_GI@nrcki.ru

Константин Сергеевич Красильщиков

лаборант исследователь
НИЦ «Курчатовский институт»
123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

E-mail: Krasilshchikov_KS@nrcki.ru

Дмитрий Алексеевич Жидков

научный сотрудник
НИЦ «Курчатовский институт»
123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

Эл. почта: Zhidkov_DA@nrcki.ru

Information about author

Alexey Nikolaevich Chernykh

PHD, senior researcher,
National Research Center "Kurchatov Institute"
123182 Russia, Moscow, pl. Academician Kurchatov, 1
E-mail: Chernykh_AN@nrcki.ru

Gennady Ivanovich Klenov

Doctor of Science (Tech.), deputy head of department,
National Research Center "Kurchatov Institute"
123182 Russia, Moscow, pl. Academician Kurchatov, 1
E-mail: Klenov_GI@nrcki.ru

Konstantin Sergeevich Krasilshchikov

laboratory assistant researcher
National Research Center "Kurchatov Institute"
123182 Russia, Moscow, pl. Academician Kurchatov, 1
E-mail: Krasilshchikov_KS@nrcki.ru

Dmitriy Alexeevich Zhidkov

researcher
National Research Center "Kurchatov Institute"
123182 Russia, Moscow, pl. Academician Kurchatov, 1
E-mail: Zhidkov_DA@nrcki.ru

Михаил Сергеевич Булатов

лаборант исследователь

НИИЦ «Курчатовский институт»

123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчато-
това, 1

E-mail: Bulatov_MS@nrcki.ru

Дмитрий Георгиевич Орлов

кандидат физ. мат. наук, старший научный
сотрудник

НИИЦ «Курчатовский институт»

123182 Россия, Москва, пл. Академика Курча-
това, 1

Эл. почта: Orlov_DG@nrcki.ru

Mikhail Sergeevich Bulatov

laboratory assistant researcher

National Research Center "Kurchatov Institute"

123182 Russia, Moscow, pl. Academician Kurchatov, 1

E-mail: Bulatov_MS@nrcki.ru

Dmitry Georgievich Orlov

PHD, senior researcher,

National Research Center "Kurchatov Institute"

123182 Russia, Moscow, pl. Academician Kurchatov, 1

E-mail: Orlov_DG@nrcki.ru

УДК 616-71, 519.612.4

ГРНТИ 27.39.19, 29.19.49, 29.15.35

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.180-189

А.Б. Коновалов

ФГУП «Российский федеральный ядерный центр –

ВНИИ технической физики

им. академика Е.И. Забабахина»

ОПОЗНАВАНИЕ СО СЖАТИЕМ В МЕДИЦИНСКОМ ИМИДЖИНГЕ: ОБЗОР С ПРИМЕРАМИ

В последние годы алгоритмы, основанные на теории опознавания со сжатием (compressed sensing, CS), нашли широкое применение в медицинском имиджинге, в частности в интроскопии магнитного резонанса (magnetic resonance imaging, MRI) и компьютерной томографии (computed tomography, CT). В настоящей статье изложены основы теории CS применительно к реконструкции сигналов и изображений, основные принципы ее применения в MRI и CT, а также приведены примеры томограмм из литературных источников, наглядно демонстрирующие преимущество алгоритмов CS над традиционными итерационными алгоритмами реконструкции. В заключение обзора подчеркнута важность скорейшего внедрения алгоритмов CS в повседневную практику клинической диагностики.

Ключевые слова: опознавание со сжатием, интроскопия магнитного резонанса, компьютерная томография, алгоритмы реконструкции.

A.B. Konovalov

FSUE "Russian Federal Nuclear Center – Zababakhin All-Russia Research In-
stitute of Technical Physics"

COMPRESSED SENSING IN MEDICAL IMAGING: A REVIEW WITH EXAMPLES

Last years the compressed sensing (CS)-based algorithms have been found wide application in medical imaging, including magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT). This paper presents the basics of the CS theory, the philosophy of its application to MRI and CT, as well as the tomogram examples from the literature sources, which demonstrate visually the advantage of the CS-based algorithms over the traditional iterative reconstruction techniques. In review conclusion the significance of the fastest CS algorithm introduction into day-to-day practice of clinical diagnostics is underlined.

Keywords: compressed sensing, magnetic resonance imaging, computed tomography, reconstruction algorithms.

Введение

В середине 2000-х Д. Донохо, Э. Кандэс, Д. Ромберг и Т. Тао разработали теорию опознавания со сжатием (compressed sensing, CS) [1, 2], которая произвела революцию в области обработки сигналов. Миру открылась уникальная возможность реконструкции сигнала по очень ограниченному числу наблюдений, минуя жесткие ограничения теоремы отсчетов Шеннона-Найквиста-Котельникова [3-5]. Сегодня CS нашло широкое применение во многих практических областях, связанных с реконструкцией сигналов: интроскопии магнитного резонанса (magnetic resonance imaging, MRI) [6], компьютерной томографии (computed tomography, CT) [7], оптической молекулярной томографии (optical molecular tomography) [8], флуоресцентной микроскопии (fluorescence microscopy) [9], одно пиксельном имиджинге (single-pixel imaging) [10], сжатии видеосигналов (video compression) [11], информационной безопасности (information security) [12] и т.д. В настоящей работе автор поставил целью обозреть основные принципы применения CS в медицинском имиджинге т.е. в MRI и CT. Нетрудно объяснить, почему именно эти модальности медицинского имиджинга оказались наиболее заинтересованными в пособничестве CS. В MRI в связи с развитием параллельной [13, 14] и динамической [15] MRI возникла острая необходимость в сокращении времени сбора данных. Это можно сделать, устранив избыточность 1) измерений в k -пространстве (традиционная анатомическая MRI), 2) приемных катушек (параллельная MRI) и 3) отсчетов во временном домене (динамическая MRI). Поэтому открывшаяся благодаря CS возможность качественной реконструкции MRI-изображений по ограниченному числу измерений, каналов регистрации сигнала и временных отсчетов пришлась как нельзя кстати. В CT одной из стратегий сокращения дозы ионизирующего излучения, которую получает пациент при сканировании, является минимизация числа ракурсов съемки [7]. При этом крайне важно иметь возможность восстановить томограмму без потери качества, что, как мы увидим далее, и позволяют сделать алгоритмы CS. Обзор организован следующим образом. В разделе “Основы теории CS” изложены основы теории опознавания со сжатием. В разделе “CS в MRI и CT” дана постановка задач реконструкции в MRI и CT, описаны основные подходы к их решению с использованием теории CS, а также перечислены основные алгоритмы CS, применяемые для реконструкции изображений в MRI и CT. Раздел “Примеры реконструкции изображений” представляет некоторые примеры реконструкции изображений из литературных источников, наглядно демонстрирующие преимущество алгоритмов CS над традиционными итерационными алгоритмами. В заключении сформулированы выводы, а также подчеркнута важность внедрения алгоритмов CS в клиническую практику медицинского имиджинга.

Основы теории CS

Пусть сигнал $\mathbf{h}$ удовлетворяет матричному уравнению

$$\mathbf{g} = \mathbf{A}\mathbf{h}, \quad (1)$$

где $\mathbf{g}$ – вектор измерений, а $\mathbf{A}$ – матрица чувствительности, моделирующая оператор решения прямой задачи. Применительно к реконструкции сигналов и изображений основной постулат теории CS можно сформулировать следующим образом. Если сигнал $\mathbf{h}$ разрежен или может быть приведен к таковому посредством некоторого ортонормального преобразования $\mathbf{T}$, то он может быть точно восстановлен по очень ограниченному числу измерений посредством минимизации его L_p -нормы, где $0 \leq p \leq 1$. Следует заметить, что точная реконструкция сигнала возможна только при выполнении дополнительных условий, которые получили название условия опознавания со сжатием (CS-условия) [1]. Эти условия следующие. 1) Матрица чувствительности $\mathbf{A}$ должна быть некогерентной по отношению к преобразованию $\mathbf{T}$. 2) Матрица $\mathbf{A}$ должна удовлетворять свойству “ограниченной изометрии”. 3) Выборка из пространства измерений должна быть случайной. Согласно условию некогерентности линейные комбинации столбцов произведения $\mathbf{AT}$ (или матрицы $\mathbf{A}$, если сигнал разрежен, и преобразование $\mathbf{T}$ не применяется)

должны быть линейно независимы. Свойство ограниченной изометрии означает, что должна существовать некоторая константа $\delta \in (0,1)$, получившая название константы ограниченной изометрии, для которой выполняется условие

$$(1 - \delta) \|\mathbf{Th}\|_2^2 \leq \|\mathbf{A}\mathbf{Th}\|_2^2 \leq (1 + \delta) \|\mathbf{Th}\|_2^2, \quad (2)$$

где $\|\mathbf{z}\|_p$ обозначает L_p -норму $\mathbf{z}$.

Задача реконструкции сигнала $\mathbf{h}$ в постановке теории CS формулируется как задача условной оптимизации

$$\min_{\mathbf{h}} \|\mathbf{Th}\|_p \text{ such that } \|\mathbf{g} - \mathbf{Ah}\|_2^2 < \varepsilon, \quad (3)$$

где $0 \leq p \leq 1$, а ε – константа, определяющая уровень шума измерений. Задача (3) обычно решается методом неопределенных множителей Лагранжа, согласно которому (3) переформулируется в задачу уже безусловной оптимизации

$$\min_{\mathbf{h}} \left\{ \|\mathbf{g} - \mathbf{Ah}\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{Th}\|_p \right\}, \quad (4)$$

где λ – параметр регуляризации.

Для решения (4) применяются различные оптимизационные алгоритмы, выбор которых зависит от значения p . Если $p=0$, используются грубые алгоритмы (greedy algorithms) [16, 17] или алгоритм жесткой пороговой фильтрации (hard thresholding algorithm) [18]. В случае $p=1$ работают алгоритмы выпуклой оптимизации, такие как алгоритм сопряженных градиентов для минимизации L_1 -нормы (conjugate gradient algorithm for L_1 -norm minimization, CGL1) [19], проксимальные алгоритмы, такие как алгоритм мягкой пороговой фильтрации (iterative shrinkage thresholding algorithm, ISTA) [20] и ускоренный ISTA (fast ISTA, FISTA) [21], раздельный алгоритм Брегмана (splitting Bregman algorithm) [22] и другие. Если $0 < p < 1$, то мы имеем дело с невыпуклой оптимизацией. Поэтому сначала задачу невыпуклой оптимизации преобразуют в задачу выпуклой оптимизации с помощью итерационных алгоритмов взвешенной регуляризации (iterative reweighted regularization algorithms) [23], а затем применяют алгоритмы выпуклой оптимизации.

CS в MRI и СТ

Постановка задач реконструкции

Рассмотрим сначала постановку задачи реконструкции на примере традиционной анатомической MRI [24]. Пусть вектор $\mathbf{G}(t) = [G_x(t), G_y(t)]^T$ в некоторый момент времени t определяет градиентное магнитное поле, используемое в MRI для кодирования x - y пространственной информации в тонком z -слое, выделенном методами селективного возбуждения. Здесь $G_x(t)$, $G_y(t)$ – градиентные поля в направлениях осей x и y . И пусть $\mathbf{k}(t) \propto \int_0^t \mathbf{G}(t) dt$ – вектор пространственных частот. Тогда MRI сигнал, регистрируемый в пространстве пространственных частот (так называемом k -пространстве) представляется следующим выражением

$$g[\mathbf{k}(t)] = \int_D h(\mathbf{r}) \exp(-j2\pi \mathbf{k}(t)\mathbf{r}) d^2r, \quad (5)$$

где $h(\mathbf{r})$ – искомое MRI-изображение, взвешенное различными информативными MRI-параметрами, такими как спиновая плотность, времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации, коэффициент диффузии и пр. Выполнив дискретизацию (5) и принимая во внимание совокупность измерений в k -пространстве, приходим к матричному уравнению аналогичному уравнению (1):

$$\mathbf{g} = \mathbf{Fh}, \quad (6)$$

где $\mathbf{g}$ – вектор измерений в k -пространстве, $\mathbf{F}$ – матричный оператор, реализующий дискретное преобразование Фурье в x - y пространстве, а $\mathbf{h}$ – вектор, описывающий искомое изображение $h(\mathbf{r})$.

В СТ реконструкции подлежит пространственное распределение линейного коэффициента поглощения. Обозначим его для аналогии также через $h(\mathbf{r})$. Тогда для проекции, регистрируемой детектором вдоль луча L , будет справедливо выражение

$$g(L) = \int_L h(\mathbf{r}) dl, \quad (7)$$

получившее название преобразования Радона [25]. После дискретизации (7) и объединения измерений, сделанных вдоль различных лучей, приходим к еще одному аналогу уравнения (1):

$$\mathbf{g} = \mathbf{W}\mathbf{h}. \quad (8)$$

В данном случае $\mathbf{g}$ – вектор проекционных данных, $\mathbf{W}$ – матрица весовых коэффициентов, которые рассчитываются традиционным способом как длины отрезков пересечения лучей с ячейками области реконструкции [25], а вектор $\mathbf{h}$, как и в уравнении (6), описывает искомое изображение $h(\mathbf{r})$. Таким образом, и в случае MRI и в случае СТ задача реконструкции сводится к обращению уравнения вида (1) с возможностью использования подхода и алгоритмов, кратко представленных в разделе “Основы теории CS”.

Основные подходы CS к решению задач реконструкции в MRI и СТ

В MRI за исключением случая MRI-ангиографии искомое изображение $\mathbf{h}$ не является разреженным. Поэтому в анатомической MRI качестве преобразования $\mathbf{T}$ применяются дискретное вейвлет преобразование $\mathbf{T}_w$ или дискретное градиентное преобразование $\mathbf{T}_v$. Для сокращения числа измерений выполняется субдискретизация измерений в k -пространстве. Чтобы удовлетворить CS-условиям эта субдискретизация должна быть случайной и давать некогерентные артефакты в пространстве изображения при традиционной реконструкции методом обращения по Фурье. В MRI наиболее популярной является минимизация L_1 -нормы. Так известная технология SPARSE MRI [19] рассматривает варианты минимизации нормы $\|\mathbf{T}_w\mathbf{h}\|_1$ и суммы двух норм $\|\mathbf{T}_w\mathbf{h}\|_1 + \alpha \|\mathbf{T}_v\mathbf{h}\|_1$. Решение соответствующих оптимизационных задач находится с помощью алгоритма CGL1 [19]. В работе [26] для решения второй задачи также с успехом используется отдельный проксимальный алгоритм, который является трансформацией ISTA [20] и FISTA [21] на случай минимизации суммы двух L_1 -норм.

В параллельной MRI с целью ускорения сбора данных выполняется многоканальная регистрация сигнала с помощью нескольких приемных катушек. Один из вариантов реализации подхода CS – это применение технологии SPARSE-SENSE [27], которая подразумевает решение оптимизационной задачи

$$\min_{\mathbf{h}} \left\{ \sum_{i=1}^S \|\mathbf{g}_i - \mathbf{F}\mathbf{S}_i\mathbf{h}\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{T}_v\mathbf{h}\|_1 \right\}, \quad (9)$$

где $\mathbf{S}_i$ – диагональная матрица, содержащая информацию о чувствительности i -ой приемной катушки, а S – число приемных катушек, участвующих в многоканальной регистрации. Задача (9) решается с помощью отдельного алгоритма Брегмана [22]. Альтернативной технологией для реализации CS в параллельной MRI является технология L_1 -SPIRiT [28, 29], которая решает оптимизационную задачу

$$\min_{\mathbf{h}} \left\{ \|\mathbf{g} - \mathbf{F}\mathbf{h}\|_2^2 + \|(\mathbf{M} - \mathbf{I})\mathbf{h}\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{T}_w\mathbf{h}\|_{2,1} \right\}, \quad (10)$$

где $\mathbf{M}$ – специальный SPIRiT оператор, вычисляемый по калибровочным данным, $\mathbf{I}$ – единичная матрица, а $\|\mathbf{z}\|_{2,1}$ – гибридная L_2 - L_1 -норма $\mathbf{z}$, такая, что L_2 -норма работает в измерении катушек, а L_1 -норма – в пространственном измерении. В работах [28, 29] задача (10) решается с помощью того же CGL1, а также с помощью алгоритма проецирования в выпуклые множества (projection onto convex sets, POCS) [30]. Оба алгоритма дают близкие результаты. Принципиальным отличием технологий SPARSE-SENSE и L_1 -SPIRiT является то, что первая восстанавливает одно синергетическое изображение, а вторая – вектор $\mathbf{h} = [\mathbf{h}_1, \dots, \mathbf{h}_S]^T$, который содержит S изображений, соответствующих отдельным катушкам.

В динамической параллельной MRI сердца данные $\mathbf{g}$ регистрируются в трехмерном k - t пространстве, а искомый вектор $\mathbf{h}$ представляет собой серию изображений, подлежащих реконструкции в x - y - t пространстве. В случае технологии k - t SPARSE-SENSE

[31] оптимизационная задача CS формулируется в виде

$$\min_{\mathbf{h}} \{ \|\mathbf{g} - \mathbf{FSh}\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{T}_{\text{FFT}} \mathbf{h}\|_1 \}, \quad (11)$$

где $\mathbf{S} = [\mathbf{S}_1, \dots, \mathbf{S}_S]^T$, а $\mathbf{T}_{\text{FFT}}$ – временное быстрое преобразование Фурье. Задача (11) решается с помощью CGL1. Динамическую серию изображений можно представить в виде пространственно-временной матрицы, где каждый временной кадр соответствует столбцу. Вследствие пространственных и временных корреляций такая матрица обычно имеет низкий ранг. Это обстоятельство эффективно используется в динамической CS-MRI. Матрица $\mathbf{h}$ представляется в виде суммы двух компонентов: матрицы низкого ранга $\mathbf{h}_{\text{LR}}$ и разреженной матрицы $\mathbf{h}_{\text{SPARSE}}$. Оптимизационная задача CS формулируется в виде [32]

$$\min_{\mathbf{h}_{\text{LR}}, \mathbf{h}_{\text{SPARSE}}} \{ \|\mathbf{g} - \mathbf{F}(\mathbf{h}_{\text{LR}} + \mathbf{h}_{\text{SPARSE}})\|_2^2 + \lambda_{\text{LR}} \|\mathbf{h}_{\text{LR}}\|_* + \lambda_{\text{SPARSE}} \|\mathbf{T}_{\text{FFT}} \mathbf{h}_{\text{SPARSE}}\|_1 \}, \quad (12)$$

где $\|\mathbf{z}\|_*$ – так называемая “ядерная” норма, представляющая собой сумму сингулярных значений $\mathbf{z}$. В работе [32] для решения (12) используется проксимальный алгоритм ISTA [20]. Можно добавить, что в последние годы в динамической параллельной MRI все чаще вместо случайной картезианской субдискретизации используется радиальная субдискретизация [33], которая обеспечивает большую степень некогерентности и меньшую чувствительность к ошибкам, вызванным движением объекта.

В СТ линейный коэффициент ослабления различается для различных органов человеческого тела, но приблизительно одинаков внутри каждого органа. Поэтому хорошо работает модель кусочно-постоянного изображения. Такое изображение легко переводится в разреженное с помощью дискретного градиентного преобразования $\mathbf{T}_\nabla$. Следовательно, в CS-СТ в основном минимизируют норму $\|\mathbf{T}_\nabla \mathbf{h}\|_1$, которая также является нормой полной вариации (total variation, TV) вектора $\mathbf{h}$. В отличие от матричного оператора $\mathbf{F}$ в MRI матрица весовых коэффициентов $\mathbf{W}$ в СТ является сильно разреженной и лишь частично удовлетворяет свойству некогерентности. Поэтому точная реконструкция изображений в СТ в рамках теории CS невозможна. Однако, несмотря на это, как показывает практика (см. например, обзор [7]), с помощью алгоритмов CS, все же удается получать приемлемые по качеству изображения, сократив число ракурсов более чем в 10 раз. Один из наиболее популярных применяемых в СТ алгоритмов CS – это алгебраический алгоритм реконструкции с TV-регуляризацией (algebraic reconstruction technique with TV regularization, ART-TV) [34]. Он решает задачу

$$\min_{\mathbf{h}} \|\mathbf{T}_\nabla \mathbf{h}\|_1 \text{ such that } \|\mathbf{g} - \mathbf{Wh}\|_2^2 < \varepsilon \quad (13)$$

посредством последовательного выполнения двух шагов: ART-шага, на котором выполняются итерации алгебраической реконструкции [35], и TV-шага, на котором норма $\|\mathbf{T}_\nabla \mathbf{h}\|_1$ минимизируется безусловно с помощью алгоритма сопряженных градиентов. На базе ART-TV разработана эффективная технология PICCS [36] для реконструкции изображений в динамической СТ сердца. PICCS решает задачу

$$\min_{\mathbf{h}} \{ \lambda \|\mathbf{T}_\nabla (\mathbf{h} - \mathbf{h}_{\text{prior}})\|_1 + (1 - \lambda) \|\mathbf{T}_\nabla \mathbf{h}\|_1 \} \text{ such that } \|\mathbf{g} - \mathbf{Wh}\|_2^2 < \varepsilon, \quad (14)$$

где $\mathbf{h}_{\text{prior}}$ – априорное изображение, которое реконструируется для полного набора ракурсов и начального отсчета времени с помощью алгоритма обратного проецирования с фильтрацией проекций (filtered backprojection, FBP) [25]. На настоящий момент в литературе представлено много различных модификаций ART-TV, которые эффективно применяются в низко-дозовой СТ для реконструкции изображений по малому числу ракурсов. Так для устранения излишней сглаженности на краях изображения авторы работы [37] предлагают алгоритм с адаптивной взвешенной TV-регуляризацией (adaptive-weighted TV, AwTV), а авторы работы [38] минимизируют TV-норму дробного порядка (fractional-order TV, FTV). В работе [39] автор настоящего обзора с коллегами дополнил ART-TV эвристической процедурой сегментации. Показано, что такой модернизированный алгоритм позволяет качественно восстановить фантом Шеппа-Логана всего по 7

ракурсам.

В работе [40] для низко-дозовой СТ предложен алгоритм сопряженных градиентов для минимизации TV-нормы (conjugate gradient algorithm for TV-norm minimization, CGTV), который решает безусловную оптимизационную задачу

$$\min_{\mathbf{h}} \{ \|\mathbf{g} - \mathbf{W}\mathbf{h}\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{T}_v \mathbf{h}\|_1 \}, \quad (15)$$

минуя ART-шаг, свойственный ART-TV. Также как и в случае ART-TV целый ряд модификаций CGTV освещается в литературных источниках по низко-дозовой СТ. В работе [41] для реализации TV-регуляризации используется метод “штрафных” взвешенных наименьших квадратов (penalized weighted least squares, PWLS), который принимает во внимание свойства шума проекционных данных. При этом

норма $\|\mathbf{g} - \mathbf{W}\mathbf{h}\|_2^2$ в (15) заменяется на $(\mathbf{g} - \mathbf{W}\mathbf{h})^T \mathbf{N}^{-1}(\mathbf{g} - \mathbf{W}\mathbf{h})$, где $\mathbf{N}$ – диагональная матрица с диагональными элементами, равными дисперсии шума. В работе [42] для низко-дозовой конической СТ предложен алгоритм проекции градиента Барзилая-Борвейна (gradient-projection-Barzilai-Borwein), который позволяет находить решение задачи (15) в направлении проекции градиента при условии введения неотрицательности. Наконец, в работе [43] алгоритм сопряженных градиентов применяется для реализации гибридной регуляризации с минимизацией суммы $\|\mathbf{T}_w \mathbf{h}\|_1 + \alpha \|\mathbf{T}_v \mathbf{h}\|_1$. Пример реконструкции приведен в следующем разделе.

Проксимальные алгоритмы также активно применяются в CS-СТ. В работе [44] проксимальный алгоритм ISTA [19] реализует TV-регуляризацию. А в работе [45] TV-норма минимизируется с помощью оригинальной модификации проксимального алгоритма, которая сочетает алгебраическую реконструкцию с мягкой пороговой фильтрацией. Авторы [46] успешно применяют тот же алгоритм уже для минимизации взвешенной нормы полной разности, которая является эффективным приближением TV нормы.

В работе [47] для реализации TV-регуляризации в СТ используется отдельный алгоритм Брегмана [21]. В работе [48] этот же алгоритм работает в рамках технологии FRESH и реализует итерационную схему минимизации взвешенной TV-нормы. На каждой n -итерации решается оптимизационная задача

$$\min_{\mathbf{h}^n} \{ \|\mathbf{g} - \mathbf{W}\mathbf{h}^n\|_2^2 + \lambda \|\mathbf{V}^n \mathbf{T}_v \mathbf{h}^n\|_1 \}, \quad (16)$$

где $\mathbf{V}^n$ – взвешенная диагональная матрица с диагональными элементами $v_{jj}^n = (|h_j^{n-1}| + \gamma)^{-1}$, где γ – малое положительное число. Показано, что технология FRESH позволяет почти точно восстановить фантом головы FORBILD по 15 ракурсам. И это далеко не полный перечень технологий и алгоритмов CS, разработанных для MRI и СТ.

Примеры реконструкции изображений

Рассмотрим несколько примеров, демонстрирующих преимущество алгоритмов CS при реконструкции изображений в условиях сильной недостаточности данных.

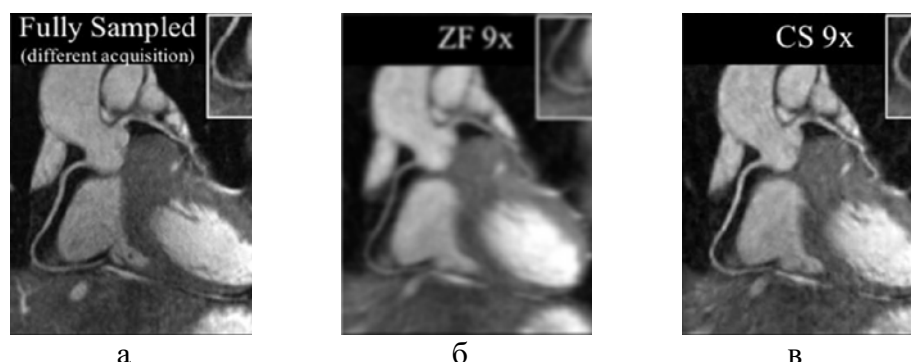


Рисунок 1 – MRI ангиография: (а) полный набор измерений, традиционная реконструкция, (б) 9-ти кратное сокращение числа измерений, традиционная реконструкция, (в) 9-ти кратное сокращение числа измерений, технология SPARSE MRI. Воспроизведено из [49] в соответствии с лицензией CC-BY

На рисунке 1 представлены MRI ангиограммы сердца [49]. При 9-ти кратном сокращении числа измерений в k-пространстве традиционная реконструкция (метод обращения по Фурье) дает сильно размытое изображение (рисунок 1(б)). Технология SPARSE MRI исправляет ситуацию и позволяет получить изображение (рисунок 1(в)), близкое по качеству к изображению рисунка 1(а), которое восстановлено по полному набору измерений.

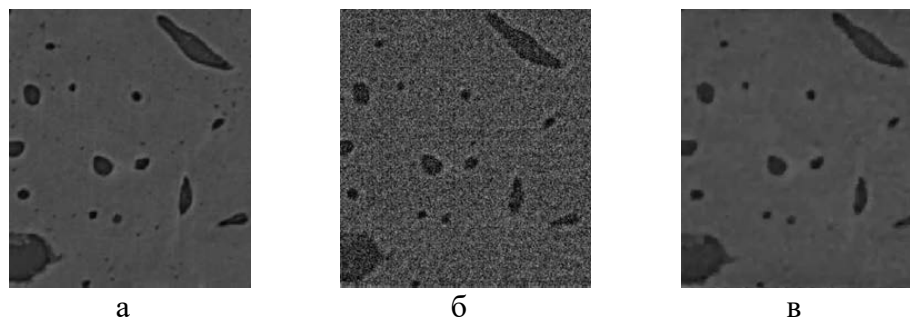


Рисунок 2 – Фрагмент CT реконструкции бедренной кости: (а) FBP по 1800 ракурсам, (б) FBP по 50 ракурсам, (в) алгоритм сопряженных градиентов по 50 ракурсам. Воспроизведено из [43] в соответствии с лицензией CC-BY

На рисунке 2 приведен пример CT реконструкции кортикального слоя бедренной кости человека [43]. Видно, что FBP по 50 ракурсам восстанавливает сильно зашумленную томограмму (рисунок 2(б)), а алгоритм сопряженных градиентов, минимизирующий сумму норм L_1 и TV, по 50 ракурсам реконструирует изображение фактически с той же точностью, что и FBP – по 1800 (рисунки 2(в) и 2(а) соответственно).

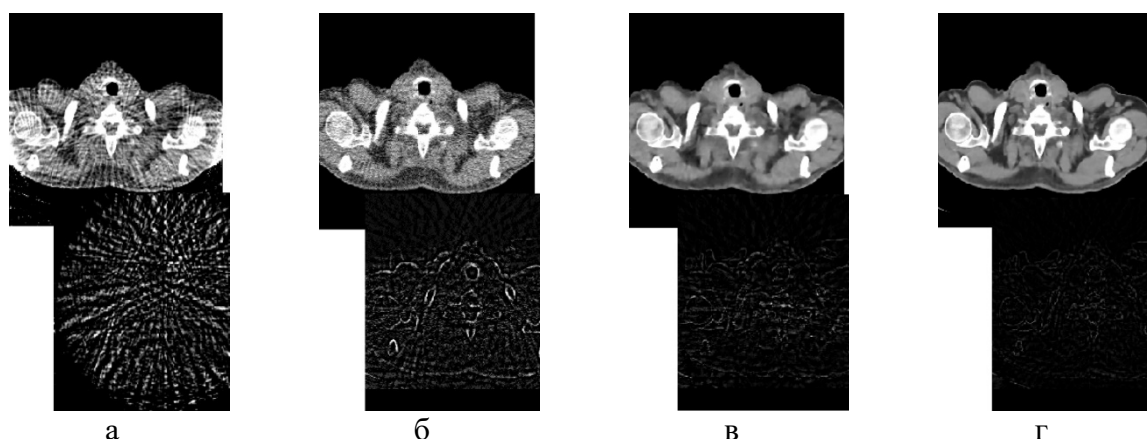


Рисунок 3 – CT реконструкции таза по 48 ракурсам: (а) FBP, (б) ART, (в) технология PICCS, (г) улучшенная технология PICCS. Воспроизведено из [50] в соответствии с лицензией CC-BY

Рисунок 3 представляет результаты численного эксперимента. Томограмма таза человека использовалась для моделирования 48 проекций, по которым восстанавливались изображения с помощью FBP, ART, а также технологии PICCS и улучшенной технологии PICCS [50]. На рисунке 3 верхняя строка изображений – это результаты реконструкции, а нижняя – разностные изображения, полученные вычитанием результатов реконструкции и исходной томограммы. На разностных изображениях рисунков 3(в) и 3(г) белый цвет фактически полностью отсутствует, что свидетельствует об очень хорошем совпадении результатов, полученных с применением технологии PICCS и улучшенной технологии PICCS, с исходной томограммой. Чего нельзя сказать о результатах реконструкции по FBP и ART (рисунки 3(а) и 3(б)).

Заключение

В настоящей работе представлен краткий обзор основных принципов использования теории CS в MRI и CT. На самом деле технологий и алгоритмов CS, разработанных и уже сегодня применяемых в медицинском имиджинге пока что на исследовательском

уровне, гораздо больше, нежели рассмотрено в настоящей работе. И многие из них готовы к внедрению в повседневную практику медицинской диагностики. Именно поэтому автор обзора считает весьма важным скорее поставить и решить вопрос о коммерческом будущем алгоритмов CS. В этом видится главная цель настоящего обзора. Конечно, существуют трудности, которые предстоит преодолеть совместно разработчикам алгоритмов, врачам и инженерам, прежде чем будут созданы соответствующие коммерческие системы медицинской диагностики. Это не всегда удовлетворительная вычислительная эффективность новых итерационных алгоритмов, сложности их коммерческой реализации в железе, одобрение органами государственного регулирования и пр. Однако автор обзора не сомневается, что все трудности будут обязательно преодолены, и технологии опознавания со сжатием будут внедрены в коммерческую медицинскую диагностику.

Литература

1. Donoho D.L. *Compressed sensing* // IEEE Trans. Inf. Theory. 2006. V. 52. P. 1289-11306.
2. Candès E.J., Romberg J., Tao T. *Stable signal recovery from incomplete and inaccurate measurements* // Commun. Pure Appl. Math. 2006. V. 59. P. 1207-1223.
3. Shannon C.E. *Communication in the presence of noise* // Proc. Inst. Radio Eng. 1949. V. 37. P. 10-21.
4. Nyquist H. *Certain topics in telegraph transmission theory* // Trans. Am. Inst. Electric. Eng. 1928. P. 617-644.
5. Котельников В.А. *О пропускной способности “эфира” и проволоки в электросвязи* // В сб. Всесоюзный энергетический комитет. Материалы к I Всесоюзному съезду по вопросам технической реконструкции дела связи и развития слаботочной промышленности. По радиосекции. Москва: Управление связи РККА. 1933. С. 1-19.
6. Ye J.C. *Compressed-sensing MRI: A review from signal processing perspective* // BMC Biomed. Eng. 2019. V. 1. Article ID. 8.
7. Konovalov A.B. *Compressed-sensing-inspired reconstruction algorithms in low-dose computed tomography: A review* // Physica Medica. 2024. V. 124. Article ID. 104491.
8. Wang B., Li S., Zhang L., et al. *A review of methods for solving the optical molecular tomography* // J. Appl. Phys. 2023. V. 133. Article ID. 130701.
9. Calisesi G., Ghezzi A., Ancora D., et al. *Compressed sensing in fluorescence microscopy* // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2022. V. 168. P. 66-80.
10. Zhao W., Gao L., Zhai A., et al. *Comparison of common algorithms for single-pixel imaging via compressed sensing* // Sensors. 2023. V. 23. Article ID. 4678.
11. Shi W., Liu S., Jiang F., et al. *Video compressed sensing using a convolutional neural network* // IEEE Trans. Circ. Syst. Video Technol. 2020. V. 31. P. 425-438.
12. Zhang Y., Zhang L.Y., Zhou J., et al. *A review of compressive sensing in information security field* // IEEE Access. 2016. V. 4. P. 2507-2519.
13. Pruessmann K.P., Weiger M., Scheidegger M.B., Boesiger P. *SENSE: sensitivity encoding for fast MRI* // Magn. Reson. Med. 1999. V. 42. P. 952-962.
14. Griswold M.A., Jakob P.M., Heidemann R.M., et al. *Generalized autocalibrating partially parallel acquisitions (GRAPPA)* // Magn. Reson. Med. 2002. V. 47. P. 1202-1210.
15. Tsao J., Boesiger P., Pruessmann K.P. *k-t BLAST and k-t SENSE: Dynamic MRI with high frame rate exploiting spatiotemporal correlations* // Magn. Reson. Med. 2003. V. 50. P. 1031-1042.
16. Mallat S. and Zhang Z. *Matching pursuit with time-frequency dictionaries* // IEEE Trans. Signal Process. 1993. V. 41. P. 3397-3415.
17. Tropp J.A. and Gilbert A.C. *Signal recovery from random measurements via orthogonal matching pursuit* // IEEE Trans. Inf. Theory. 2007. V. 53. P. 4655-4666.
18. Blumensath T. and Davis M.E. *Iterative hard thresholding for compressed sensing* // Appl. Comput. Harmon. Anal. 2009. V. 27. P. 265-274.
19. Lustig M., Donoho D., Pauly J.M. *Sparse MRI: The application of compressed sensing for rapid MR imaging* // Magn. Reson. Med. 2007. V. 58. P. 1182-1195.
20. Daubechies I., Defrise M., Mol C.D. *An iterative thresholding algorithm for linear inverse problems with a sparsity constraint* // Commun. Pure Appl. Math. 2004. V. 57. P. 1413-1457.

21. Beck A. and Teboulle M. A fast iterative shrinkage-thresholding algorithm for linear inverse problems // *SIAM J. Imaging Sci.* 2009. V. 2. P. 183-202.
22. Goldstein T. and Osher S. The split Bregman method for L1-regularized problems // *SIAM J. Imaging Sci.* 2009. V. 2. P. 323-343.
23. Chartrand R. and Yin W. Iteratively reweighted algorithms for compressive sensing // *In Proc. 33rd Int. Conf. Acoust. Speech Signal Process. (ICASSP)*. 2008. P. 3869-3872.
24. Wright G. Magnetic resonance imaging // *IEEE Signal Process. Mag.* 1997. V. 14. P. 56-66.
25. Kak A.C. and Slaney M. *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. New York: IEEE Press. 1988.
26. Huang J., Zhang S., Li H., Metaxas D. Composite splitting algorithms for convex optimization // *Comput. Vis. Image Understanding*. 2011. V. 115. P. 1610-1622.
27. Liu B., Zou Y.M., Ying L. SparseSENSE: Application of compressed sensing in parallel MRI // *In Proc. Int. Special Topic Conf. Inf. Technol. Appl. Biomed.* 2008. V. 1 and 2. P. 261-264.
28. Lustig M. Pauly J.M. SPIRiT: Iterative self-consistent parallel imaging reconstruction from arbitrary k-space // *Magn. Reson. Med.* 2010. V. 64. P. 457-471.
29. Murphy M., Alley M., Demmel J., et al. Fast L1-SPIRiT compressed sensing parallel imaging MRI: Scalable parallel implementation and clinically feasible runtime // *IEEE Trans. Med. Imaging*. V. 31. P. 1250-1262.
30. Bauschke H.H. and Borwein J.M. On projection algorithms for solving convex feasibility problems // *SIAM Rev.* 1996. V. 38. P. 367-426.
31. Otazo R., Kim D., Axel L., Sodickson D.K. Combination of compressed sensing and parallel imaging for highly accelerated first-pass cardiac perfusion MRI // *Magn. Reson. Med.* 2010. V. 64. P. 767-776.
32. Otazo R., Candès E.J., Sodickson D.K. Low-rank plus sparse matrix decomposition for accelerated dynamic MRI with separation of background and dynamic components // *Magn. Reson. Med.* 2015. V. 73. P. 1125-1136.
33. Feng L., Grimm R., Block K.T., et al. Golden-angle radial sparse parallel MRI: combination of compressed sensing, parallel imaging, and golden-angle radial sampling for fast and flexible dynamic volumetric MRI // *Magn. Reson. Med.* 2014. V. 72. P. 707-717.
34. Yu H. and Wang G. Compressed sensing based interior tomography // *Phys. Med. Biol.* 2009. V. 54. P. 2791-2805.
35. Gordon R., Bender R., Herman G.T. Algebraic reconstruction techniques (ART) for three-dimensional electron microscopy and x-ray photography // *J. Theor. Biol.* 1970. V. 29. P. 471-482.
36. Chen G., Tang J., Leng S. Prior image constrained compressed sensing (PICCS): A method to accurately reconstruct dynamic CT images from highly undersampled projection data sets // *Med. Phys.* 2008. V. 35. P. 660-663.
37. Liu Y., Ma J., Fan Y., Liang Z. Adaptive-weighted total variation minimization for sparse data toward low-dose X-ray computed tomography image reconstruction // *Phys. Med. Biol.* 2012. V. 57. P. 7923-7956.
38. Zhang Y., Zhang W., Lei Y., Zhou J. Few-view image reconstruction with fractional-order total variation // *J. Opt. Soc. Am. A*. 2014. V. 31. P. 981-995.
39. Vlasov V.V., Konovalov A.B., Kolchugin S.V. Hybrid algorithm for few-views computed tomography of strongly absorbing media: algebraic reconstruction, TV-regularization, and adaptive segmentation // *J. Electron. Imaging*. 2018. V. 27. Article ID. 043006.
40. Yang X., Hofmann R., Dapp R., et al. TV-based conjugate gradient method and discrete L-curve for few-view CT reconstruction of X-ray in vivo data // *Opt. Express*. 2015. V. 23. P. 5368-5387.
41. Ouyang L., Solberg T., Wang J. Effect of penalty on the penalized weighted least-squares image reconstruction for low-dose CBCT // *Phys. Med. Biol.* 2011. V. 56. P. 5535-5552.
42. Park J.C., Song B., Kim J.S., et al. Fast compressed sensing-based CBCT reconstruction using Barzilai-Borwein formulation for application to on-line IGRT // *Med. Phys.* 2012. V. 39. P. 1207-1217.
43. Zhu Z., Wahid K., Babyn P., et al. Improved compressed sensing-based algorithm for sparse-view CT image reconstruction // *Comput. Math. Meth. Med.* 2013. V. 2013. Article ID. 185750.

44. Jia X., Lou Y., Lewis J., et al. GPU-based fast low-dose cone beam CT reconstruction via total variation // J. X-ray Sci. Technol. 2011. V. 19. P. 139-154.
45. Yu H. and Wang G. A soft-thresholding filtering approach for reconstruction from a limited number of projections // Phys. Med. Biol. 2010. V. 55. P. 3905-3916.
46. Yu W. and Zeng L. A novel weighted total difference based image reconstruction algorithm for few-view computed tomography // PLoS ONE. 2014. V. 9. Article ID. e109345.
47. Vandeghinste B., Goossens B., De Beenhouwer J., et al. Split-Bregman-based sparse-view CT reconstruction // In Proc. Int. Meet Fully 3D Image Reconstruction Radiol. Nucl. Med. 2011. P. 431-434.
48. Chang M., Li L., Chen Z., et al. A few-view reweighted sparsity hunting (FRESH) method for CT image reconstruction // J. X-Ray Sci. Technol. 2013. V. 21. P. 161-176.
49. Bustin A., Fuin N., Botnar R.M., Prieto C. From compressed-sensing to artificial intelligence-based cardiac MRI reconstruction // Front. Cardiovasc. Med. 2020. V. 7. Article ID 17.
50. Li X., Sun X., Li F. Sparse-view computed tomography reconstruction based on a novel improved prior image constrained compressed sensing algorithm // Appl. Sci. 2023. V. 13. Article ID. 10320.

Сведения об авторах

Александр Борисович Коновалов

к.ф-м.н., ведущий научный сотрудник
ФГУП “Российский федеральный ядерный центр –
ВНИИ технической физики им. академика Е.И.
Забабихина”
Снежинск, Россия
Эл. почта: a_konov@mail.vega-int.ru

Information about author

Alexander Borisovich Kononov

PhD (Phys), Leading Scientist
FSUE “Russian Federal Nuclear Center – Zaba-
bakhin All-Russia Research Institute of Technical
Physics”
Snezhinsk, Russian Federation
E-mail: a_konov@mail.vega-int.ru

ГРНТИ 27.39.19, 29.19.49, 29.15.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.189-192

Кушнир Н.С. Суворова А.С.
«НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»

НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ДЕФОРМИРУЕМОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ: ФИЛЬТРОМЕТР С ИЗМЕРЕНИЕМ КИНЕТИКИ ПОТОКА СУСПЕНЗИИ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАННЫЙ ФИЛЬТР

Разработан и протестирован модифицированный фильтрометр для исследования фильтруемости эритроцитов, основанный на регистрации зависимости скорости протекания суспензии эритроцитов через фильтр от времени. В отличие от предыдущей версии прибора - ИДА-01, измеряющего время прохождения фиксированного объема суспензии. Предлагаемая система позволяет анализировать кинетику фильтрации, обеспечивая более высокую информативность и возможность оценки популяционной гетерогенности эритроцитов. Предложенный метод открывает перспективы для ранней диагностики патологических изменений в системе микроциркуляции.

Ключевые слова: гемолитические анемии, деформируемость эритроцитов, фильтруемость эритроцитов, микроциркуляция.

Kushnir N.S. Suvorova A.S.
Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology

A NEW APPROACH TO ASSESSING THE DEFORMABILITY OF ERYTHROCYTES: A FILTEROMETER WITH MEASUREMENT OF THE KINETICS OF THE FLOW OF ERYTHROCYTE SUSPENSION THROUGH A MEMBRANE FILTER

A modified filterometer for studying the filterability of erythrocytes was developed and tested, based on recording the dependence of the flow rate of the erythrocyte suspension through the filter on time. Unlike the previous version of the device - ida-01, which measures the time of passage of a fixed volume of suspension. The proposed system allows analyzing the kinetics of filtration, providing higher information content and the ability to assess the population heterogeneity of erythrocytes. The proposed method opens up prospects for early diagnostics of pathological changes in the microcirculation system.

KEYWORDS: hemolytic anemia, erythrocyte deformability, erythrocyte filterability, microcirculation.

Введение

Деформируемость эритроцитов — ключевой фактор, определяющий проходимость клеток через капилляры микроциркуляторного русла. Способность эритроцитов изменять свою форму играет ключевую роль в обеспечении нормального кровообращения, поддержании адекватного снабжения тканей кислородом и удалении углекислого газа. Эти клетки крови должны беспрепятственно проходить через капилляры, диаметр которых может быть даже меньше их собственного, что требует высокой деформируемости мембраны и гибкости структуры. Любые изменения в механических свойствах эритроцитов, будь то снижение их эластичности, нарушение целостности мембраны или изменение формы, могут привести к серьезным последствиям, таким как ухудшение микроциркуляции, кислородное голодание тканей и развитие патологических состояний.

Изменения механических свойств эритроцитов сопровождают широкий спектр патологических процессов. Нарушения деформируемости эритроцитов наблюдаются при различных патологиях крови, включая наследственные и приобретенные анемии, гемолитические заболевания, серповидноклеточную анемию, сфероцитоз, талассемию, а также при таких состояниях, как сахарный диабет, воспалительные процессы, сердечно-сосудистые заболевания и нарушения свертываемости крови. Кроме того, изменения механических свойств эритроцитов могут быть связаны с воздействием внешних факторов, таких как инфекционные заболевания, токсическое поражение организма, дефицит микроэлементов и витаминов, применение некоторых лекарственных препаратов.

Разработка современных методов исследования деформируемости эритроцитов, включая фильтрацию через мембранные фильтры, эктацитометрию и оптические методы, позволяет выявлять даже незначительные отклонения от нормы, что способствует ранней диагностике и мониторингу заболеваний. В связи с этим углубленное изучение механических свойств эритроцитов имеет большое значение для профилактики, диагностики и лечения широкого спектра гематологических и системных заболеваний.

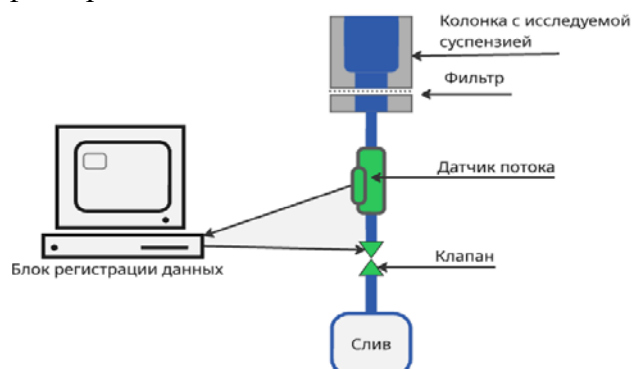
Среди существующих методов оценки деформируемости особое место занимают фильтрационные методы, позволяющие воспроизводить физиологически значимые условия прохождения клеток через узкие отверстия.

Классические фильтрометры, такие как ИДА-01, предоставляют информацию о фильтруемости в виде времени прохождения фиксированного объема суспензии через фильтр. Однако такой подход не позволяет детально анализировать кинетику фильтрационного процесса. Мы предлагаем новый прибор, регистрирующий скорость протекания суспензии от времени, что дает возможность более глубокого анализа фильтрационных свойств эритроцитов. Такой анализ позволит не только определить деформируемость эритроцитов в среднем, но и вычленить в общей популяции долю клеток, у которых значительно снижена скорость прохождения по микроциркулярному руслу. Что дает возможность для использования данной методики для диагностики гемолитических анемий.

Материалы и методы

Принцип работы прибора

В основе конструкции лежит вертикально ориентированный фильтр. В нашем исследовании – это поликарбонатная трековая мембрана толщиной 7 мкм и диаметром пор 3 мкм. Поры ориентированы перпендикулярно, пленка имеет гидрофильное покрытие. Под действием постоянного гидростатического давления суспензия эритроцитов проходит через фильтр. В отличие от фильтрометров традиционной конструкции, в новой системе осуществляется непрерывная регистрация объемной скорости потока с помощью теплового датчика потока. Данные записываются в реальном времени, формируя кинетическую кривую протекания суспензии. Отсчет ведется от момента открытия клапана, запускающего процесс фильтрации.



Подготовка образцов

Образцы суспензии эритроцитов готовились из цельной крови здоровых доноров. Подготовка крови заключала следующие ключевые этапы: Центрифугирование, ресуспендирование в физиологическом растворе и доведение до гематокрита 0.1%.

В ряде экспериментов готовилась суспензия эритроцитов с искусственно сниженной деформируемостью. Для этого при приготовлении суспензии использовался буферный раствор с добавлением глутарового альдегида (0,09% конечной концентрации)

Обработка данных

В результате измерения получается кривая зависимости потока суспензии эритроцитов от времени (рис.2а). Для каждого измерения используется новый, ранее не применявшийся фильтр. Поскольку количество пор в фильтре может варьироваться, результаты нормируются по потоку буфера. Для этого проводятся два последовательных измерения: сначала через фильтр пропускается буферный раствор, затем — суспензия эритроцитов. Поток суспензии делится на средний поток буфера, в результате чего получается зависимость относительной скорости фильтрации от времени. (Рис.2б)

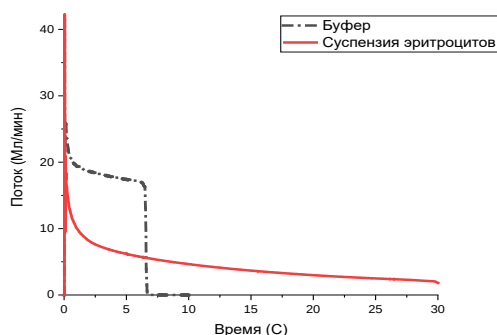


Рис. 2а. Кривые фильтрации буферного раствора и суспензии эритроцитов здорового донора.

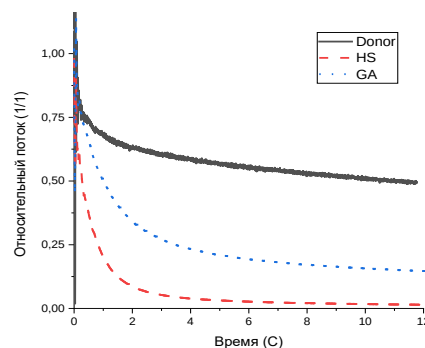


Рис. 2б. Перерасчётные кривые. На графике представлены кривые фильтруемости для здорового донора (Donor), Пациента страдающего наследственным сфероцитозом (HS) и эритроцитов обработанных глутаровым альдегидом (GA)

Результаты и обсуждение

Первичные эксперименты показали, что кинетические кривые обладают характерными особенностями, отражающими гетерогенность исследуемой популяции эритроцитов. На начальной части кривой видно быстрое падение относительного потока – эта часть графика говорит с какой скоростью популяция хорошо деформирующихся клеток проходит через поры фильтра. Второй участок кривой характерен медленным линейным падением – это снижение скорости вызванное перекрытием пор фильтра клетками не способными пройти через него. Так же на графике представлены кривая фильтруемости для больного наследственным сфероцитозом и кривая фильтрации эритроцитов с искусственно сниженной деформируемостью за счет добавления к суспензии глутарового альдегида.

Заключение

Разработан фильтрметр нового типа, обеспечивающий регистрацию кинетики фильтрации суспензий эритроцитов. Прибор обладает высокой чувствительностью к изменению реологических свойств клеток и предоставляет больше информации о гетерогенности популяции по сравнению с существующими методами. Метод может быть использован в фундаментальных исследованиях, а также в клинической практике для диагностики нарушений микроциркуляции. В дальнейшем авторы планируют разработать математическую модель фильтрации эритроцитов с целью извлечения из экспериментальных данных информации численно характеризующей состояние эритроцитов. А также проведение исследования по применению данной методики для диагностики наследственного сфероцитоза.

Список литературы

1. Лисовская И.Л. Фильтрационные методы оценки деформируемости эритроцитов. Дисс. канд. биол. наук. М., 2002.
2. Патент РФ №2052194. Устройство для измерения фильтруемости эритроцитов.
3. Reinhart W.H. et al. Influence of pore size and osmolarity on the filterability of red blood cells. *Clin Hemorheol Microcirc.*, 1998; 18(1): 27–34.
4. Jones J.G. et al. A mathematical model for the interpretation of filtration data of heterogeneous erythrocyte populations. *Biorheology*, 1995; 32(6): 631–645.
5. Mohandas N., Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1994; 23: 787–818.
6. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu. Rev. Physiol.*, 1987; 49: 177–192.
7. Baskurt O.K., Meiselman H.J. Blood Rheology and Hemodynamics. *Semin Thromb Hemost.*, 2003; 29(5): 435–450.
8. Lew V.L., Tiffert T. On the Mechanism of Human Red Blood Cell Longevity. *Front. Physiol.*, 2017; 8: 977.
9. Hardeman M.R., Dobbe J.G.G., Ince C. The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA). *Clin Hemorheol Microcirc.*, 2001; 25(1): 1–11.
10. Oonishi T. Filterability of red blood cells and its clinical application. *Clin Hemorheol*, 1990; 10(2–3): 235–249.

Сведения об авторах

Кушнир Никита Сергеевич

Научный сотрудник «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»,
Москва, Россия

Эл. почта: nikita.kushnir@fnkc.ru

Суворова Анна Сергеевна

Научный сотрудник «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»,
Москва, Россия

Эл. почта: makagonova.anna@mail.ru

Information about author

Kushnir Nikita Sergeevich

Researcher at Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology Moscow, Russian Federation

E-mail: nikita.kushnir@fnkc.ru

Suvorova Anna Sergeevna

Researcher at Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology Moscow, Russian Federation

E-mail: makagonova.anna@mail.ru

УДК 616-006.441
ГРНТИ 27.39.19, 29.19.49, 29.15.35
DOI
10.47501/978-5-6044060-5-2.193-197

**С.А. Алексеев, В.Н. Троян,
О.А. Рукавицын**
ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко»
Минобороны России

МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ЛИМФОМАМИ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ

В статье представлены данные собственного исследования по внедрению в диагностический процесс диффузионно-взвешенной магнитно-резонансной томографии у пациентов с лимфомами после проведенного лечения. Представлены оригинальные данные о диагностической точности метода, а также созданный диагностический алгоритм. Результаты показали, что ДВ МРТ может быть альтернативой для ПЭТ/КТ у пациентов с полным ответом на лечение.

Ключевые слова: позитронно-эмиссионная томография, фтордезоксиглюкоза, магнитно-резонансная томография, диффузионно-взвешенные изображения.

**S. A. Alekseev, V. N. Troyan,
O. A. Rukavitsyn**
Main military clinical hospital
N.N. Burdenko of the Russian Ministry of Defense

MAGNETIC RESONANCE IMAGING IN PATIENTS WITH LYMPHOMAS AFTER TREATMENT

The article presents data from our own research on the introduction of diffusion-weighted magnetic resonance imaging into the diagnostic process in patients with lymphomas after treatment. The original data on the diagnostic accuracy of the method, as well as the created diagnostic algorithm, are presented. The results showed that DWI MRI can be an alternative to PET/CT in patients with a complete response to treatment.

Keywords: positron emission tomography, fluorodeoxyglucose, magnetic resonance imaging, diffusion-weighted images.

Введение.

Лимфопролиферативные заболевания составляют приблизительно 5–6% от всех злокачественных опухолей [1,2]. При этом наибольшую часть (более двух третей) представляют неходжкинские лимфомы (НХЛ), а остальную часть занимает лимфома Ходжкина (ЛХЛ). Для стадирования болезни активно используются разные методы лучевой диагностики, такие как компьютерная томография (КТ) или позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией, при которой используется [18]F-фтор-2-дезоксиглюкоза (ПЭТ/КТ с ФДГ), при этом наибольшую популярность приобрела ПЭТ/КТ с ФДГ из-за своей эффективности [3,4,5]

Как любой из используемых методов, он также не лишен недостатков, таких как, например, лучевая нагрузка на пациентов, получаемая во время исследования и радиоактивная доза облучения от внутривенного введения радиофармацевтического лекарственного препарата (РФЛП), особенно это касается детей и подростков [6]. Так же хотелось отметить ограниченные доступность и распространенность метода, и его экономическую составляющую.

Именно по этим причинам актуальным является поиск и внедрение в рутинную практику альтернативного метода лучевой диагностики, лишенного недостатков и обладающего достоинствами ПЭТ/КТ с ФДГ. Таким методом может стать диффузионно-взвешенная магнитно-резонансная томография (ДВ МРТ). [7,8]

ДВ МРТ – метод магнитно-резонансной томографии, основанный на выявлении и

оценке движения молекул воды. Движение молекул воды в биологических тканях происходит во внутриклеточном, внеклеточном пространстве и трансмембранно [9,10,11]. В биологических тканях диффузия не является случайной, поскольку ткани структурированы и формируют так называемые отсеки. Клеточные мембраны, сосудистые структуры, аксональные цилиндры лимитируют (ограничивают) диффузию. Кроме того, химическое взаимодействие молекул воды и макромолекул влияет на процесс диффузии [12, 13].

Несмотря на имеющиеся известные данные об эффективности метода ДВ МРТ у пациентов с лимфомами при стадировании заболевания и оценке ответа на лечение, остается нерешенным вопрос о применении ДВ МРТ как альтернативного, так как данная методика не входит ни в международные, ни в отечественные клинические рекомендации по лимфопролиферативным заболеваниям, что представляет собой огромный интерес и потенциал для изучения данного вопроса.

Цель работы. Определить диагностическую точность метода ДВ МРТ у пациентов с лимфомами после проведенного лечения.

Материалы и методы.

В исследование вошли 83 пациента. Все исследования проведены на 1,5 Тс МР-томографе «Magnetom Aera» фирмы Siemens. Протокол исследования ДВ МРТ включает в себя 4 последовательности: T1, T2, T2stir, ДВИ. Каждая из последовательностей полностью захватывает всю область сканирования. Область сканирования – от теменных костей до верхней трети бедра.

Область сканирования поделена на 6 участков: 1) головной мозг, область лицевого скелета; 2) шея, верхние отделы грудной клетки; 3) средние и нижние отделы грудной клетки, верхние отделы брюшной полости; 4) средние и нижние отделы брюшной полости; 5) малый таз; 6) верхние отделы нижних конечностей.

Для оценки диагностической точности метода ДВ МРТ очаги поражения были разделены на 10 областей – лимфоузлы головы и шеи (ЛГШ), внутригрудные лимфоузлы (ВГЛУ), периферические лимфоузлы выше диафрагмы (ПЛВД), лимфоузлы брюшной полости (ЛБП), лимфоузлы малого таза (ЛМТ) периферические лимфоузлы ниже диафрагмы (ПЛНД), поражение селезенки (пС), экстранодальное поражение выше диафрагмы (ЭПВД), экстранодальное поражение ниже диафрагмы (ЭПНД), поражение костного мозга (пКМ). По типам лимфом больные были разделены следующим образом: диффузная В-клеточная лимфома – 34 человека, лимфома Ходжкина – 21 больной; фолликулярная лимфома – 17 пациентов, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома – 3 пациента, лимфома мантийной зоны – 9 больных, Т-клеточная лимфом – 4 пациента.

Все результаты ПЭТ/КТ с ФДГ пациентов второй части исследования были оценены по 5-бальной ПЭТ-шкале. Поскольку 1 и 2 балла соответствуют ремиссии заболевания, 4 и 5 баллов соответствуют прогрессированию заболеванию, а 3 балла требуют наблюдения и более детальной оценки, больные разделены в три группы соответственно

Полученные результаты.

При оценке у пациентов с 1 и 2 баллами по ПЭТ-шкале (n=49) по результатам ДВ МРТ резидуальная ткань выявлена у 31 пациента, среди них лимфоузлы области головы и шеи (ЛГШ) выявлено у 13 (41,9 %) больных, внутригрудных лимфоузлов (ВГЛУ) у 14 (45,1%) пациентов, периферические лимфоузлы выше диафрагмы (ПЛВД) у 4 (12,9 %) человек, лимфоузлы брюшной полости (ЛБП) у 19 (61,2 %) больных, лимфоузлы малого таза (ЛМТ) у 1 (3,2 %) человек, экстранодальное поражение выше диафрагмы (ЭПВД) у 2 (6,4 %) больных, вовлечения периферических лимфоузлов ниже диафрагмы, экстранодальных очагов ниже диафрагмы (ЭПНД), вовлечения селезенки (вС) и вовлечения костного мозга (вКМ) не выявлено.

Сравнивая результаты ДВ МРТ и ПЭТ/КТ с ФДГ отмечено, у пациентов с 1

баллом по ПЭТ-шкале ($n=31$) полученные результаты совпадают на 100 %, при этом в ходе анализа не было выявлено ложноположительных или ложноотрицательных результатов. У пациентов с 2 баллами по ПЭТ-шкале ($n=18$) выявлено 1 случай несоответствия, у пациента с ТКЛ, который является ложноположительным, обусловленным диффузным повышенным сигналом от тазовых костей, вероятно за счет реактивных изменений в костном мозге, при этом гиперметаболизма РФЛП и/или структурных изменений в костях не отмечено. Кроме того, хотелось отметить анизотропное (физиологическое) повышение сигнала на ДВИ в паховых, аксиллярных лимфоузлах, в селезенке у 26 больных, которое не является проявлением болезни или другого патологического процесса.

При оценке ответа на лечение у пациентов с 3 баллами по ПЭТ-шкале ($n=16$) по результатам ПЭТ/КТ с ФДГ поражение лимфоузлов области головы и шеи выявлено у 1 (54,5 %) больного, внутригрудных лимфоузлов у 9 (63,6 %) пациентов, периферические лимфоузлы выше диафрагмы у 3 (45,4 %) человек, лимфоузлы брюшной полости у 11 (81,8 %) больных, лимфоузлы малого таза у 5 (81,8 %) человек, периферические лимфоузлы ниже диафрагмы не выявлены, экстранодальное поражение выше диафрагмы у 1 (18,1 %) больного, экстранодальное поражение ниже диафрагмы не выявлено, поражение селезенки не выявлено, поражение костного мозга не выявлено. Анализируя результаты ДВ МРТ при оценке ответа на лечение у пациентов с 3 баллами по ПЭТ-шкале обнаружено, что поражение лимфоузлов области головы и шеи выявлено у 2 (54,5%) больных, внутригрудных лимфоузлов у 7 (63,6 %) пациентов, периферические лимфоузлы выше диафрагмы у 3 (45,4 %) человек, лимфоузлы брюшной полости у 11 (81,8 %) больных, лимфоузлы малого таза у 5 (81,8 %) человек, периферические лимфоузлы ниже диафрагмы не выявлены, экстранодальное поражение выше диафрагмы у 1 (18,1 %) больного, экстранодальное поражение ниже диафрагмы не выявлено, поражение селезенки не выявлено, поражение костного мозга не выявлено. Среди пациентов с 3 баллами зафиксированы так же 2 случая разногласия – два ложноположительных случая. Первым ложноположительным результатом является вовлечение в процесс по данным ДВ МРТ лимфоузлов области головы и шеи без наличия подтверждения по результатам ПЭТ/КТ с ФДГ. Вторым ложноотрицательным результатом является наличие сигнала по ДВИ от очага в 5м ребре справа, без гиперметаболизма РФП (рисунок 44).

При оценке ответа на лечение у пациентов с 4 и 5 баллами по ПЭТ-шкале ($n=18$) по результатам ПЭТ/КТ с ФДГ поражение лимфоузлов области головы и шеи выявлено у 8 (54,5 %) больного, внутригрудных лимфоузлов у 11 (63,6 %) пациентов, периферические лимфоузлы выше диафрагмы у 2 (45,4 %) человек, лимфоузлы брюшной полости у 14 (81,8 %) больных, лимфоузлы малого таза у 6 (81,8 %) человек, периферические лимфоузлы ниже диафрагмы не выявлены, экстранодальное поражение выше диафрагмы не выявлено (18,1 %) больного, экстранодальное поражение ниже диафрагмы у 6 человек, поражение селезенки не выявлено, поражение костного мозга не выявлено. Анализируя результаты ДВ МРТ при оценке ответа на лечение у пациентов с 4 и 5 баллами по ПЭТ-шкале обнаружено поражение лимфоузлов области головы и шеи выявлено у 8 (54,5 %) больного, внутригрудных лимфоузлов у 11 (63,6 %) пациентов, периферические лимфоузлы выше диафрагмы у 2 (45,4 %) человек, лимфоузлы брюшной полости у 14 (81,8 %) больных, лимфоузлы малого таза у 6 (81,8 %) человек, периферические лимфоузлы ниже диафрагмы не выявлены, экстранодальное поражение выше диафрагмы не выявлено у 1 (18,1 %) больного, экстранодальное поражение ниже диафрагмы у 6 человек, поражение селезенки не выявлено, поражение костного мозга выявлено 1 человека (рисунок 45). Среди пациентов с 4 и 5 баллами зафиксированы так же 4 случая разногласия – 3 ложноотрицательных и один ложноположительный. Ложноположительным результатом является повышение сигнала по данным ДВ МРТ в увеличенных лимфоузлов области головы и шеи без наличия подтверждения по результатам ПЭТ/КТ с ФДГ, обусловленных вероятно воспалительными изменениями. Все

ложноотрицательные результаты представляют собой отсутствие изменений сигнальных характеристик у пациентов с поражением лимфоузлов, которые имеют повышенный метаболизм РФП по данным ПЭТ/КТ с ФДГ

Выводы.

При последующей общей оценке диагностической точности метода ДВ МРТ при оценке ответа на лечение выявлено, что диагностическая точность составляет 91,6 %, чувствительность 92,7 %, специфичность 88,6 %, положительная прогностическая ценность 90,84 %, отрицательная прогностическая ценность 91,18 %, положительное отношение правдоподобия 8,2, отрицательное отношение правдоподобия 0,76. Площадь ROC-кривой составила 0,9481.

Полученные данные, несомненно, свидетельствуют о высокой диагностической точности метода ДВ МРТ и о возможности его использования у пациентов после проведенного лечения.

Но, несмотря на результаты у пациентов с 1, 2 или 3 баллами по ПЭТ-шкале, результаты пациентов с 4 баллами подтверждают ограничение диагностических возможностей метода при оценке потенциального отсутствия ответа на лечение, что в свою очередь может повлиять на течение заболевания за счет несвоевременно принятых решения касательно возможной эскалации необходимого лечения.

Заключение Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: учитывая имеющиеся данные по длительности периода безрецидивной выживаемости у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, имеющими после терапии полный ответ на лечение, метод ДВ МРТ, учитывая его безусловные преимущества, может быть безопасной альтернативой ПЭТ/КТ с ФДГ, но только в случае пациентов с 1, 2 баллами по ПЭТ-шкале с целью выявления изменений, которые могут соответствовать потенциальному прогрессированию заболевания.

Литература.

1. Атабаева, А. К. Эпидемиология Новообразований Системы Крови. Обзор Литературы
2. / А.К. Атабаева, З.А. Хисметова, Ж.Б. Нурахметова – Текст : непосредственный. // Наука И Здоровоохранение. 2021. Т. 23. № 6. – С. 188-197.
3. Баембаев, Ф. А. Недостатки ПЭТ/КТ исследования при диагностике лимфопролиферативных заболеваний: Обзор литературы // Онкология И Радиология Казахстана. 2023. Недостатки ПЭТ/КТ исследования при диагностике лимфопролиферативных заболеваний. № 1 (67). – С. 62-67.
4. Бессмельцев, С. С. Злокачественные Лимфомы: История, Распространенность, Этиология И Патогенез (лекция) / С.С. Бессмельцев – Текст : непосредственный. // Вестник Гематологии. 2023. Т. 19. Злокачественные Лимфомы. № 1. – С. 64-80.
5. Дунайкин, Е.Д. Киреева, Кайлаш Чаурасия, Ю.Н. Ликарь. ПЭТ/КТ в детской онкологии / Дунайкин, Е.Д. Киреева, Кайлаш Чаурасия, Ю.Н. Ликарь. – Текст : непосредственный. // Журнал Педиатрия имени Г.Н.Сперанского. 2023. Т. 102. № 3. – С. 115-123.
6. Литвин, А. А. Радиомика и анализ текстур цифровых изображений в онкологии (обзор) // Современные Технологии В Медицине. 2021. Т. 13. № 2. – С. 97-106.
7. Рукавицын, О. А. Гематология / О. А. Рукавицын, В. Ю. Удальева, Т. А. Агеева [и др.] Общество с ограниченной ответственностью Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2024. – 916 с. – ISBN 978-5-9704-8188-2. – Текст : непосредственный.
8. Aide, N. FDG PET/CT for assessing tumour response to immunotherapy: Report on the EANM symposium on immune modulation and recent review of the literature // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2019. Vol. 46. FDG PET/CT for assessing tumour response to immunotherapy. № 1. – P. 238-250.
9. Albano, D. Whole-body diffusion-weighted MR and FDG-PET/CT in Hodgkin Lymphoma: Predictive role before treatment and early assessment after two courses of ABVD // European Journal of Radiology. 2018. Т. 103. Whole-body diffusion-weighted MR and FDG-PET/CT in Hodgkin Lymphoma. – С. 90-98.
10. Albano, D. Whole-body MRI, FDG-PET/CT, and bone marrow biopsy, for the assessment of bone marrow involvement in patients with newly diagnosed lymphoma // Journal of magnetic resonance imaging: JMRI. 2017. Т. 45. № 4. – С. 1082-1089. Barrington, S. F. FDG PET for

- therapy monitoring in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas / S.F. Barrington, R. Kluge – Text : direct // *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2017. Vol. 44. № S1. – P. 97-110.
11. Chen, C. Contrast-Enhanced MRI Texture Parameters as Potential Prognostic Factors for Primary Central Nervous System Lymphoma Patients Receiving High-Dose Methotrexate-Based Chemotherapy // *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2019. T. 2019. – С. 5481491.
12. Cheson, B. D. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification // *Journal of Clinical Oncology*. 2014. Vol. 32. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma. № 27. – P. 3059-3067.
13. Galia, M. Whole-body MRI in patients with lymphoma: collateral findings // *La radiologia medica*. 2016. Vol. 121. Whole-body MRI in patients with lymphoma. № 10. – P. 793-800.

Сведения об авторах

Алексеев Сергей Анатольевич Канд. мед. наук, заведующий кабинетом КТ и МРТ рентгеновского отделения центра лучевой диагностики ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России Москва, Россия
Эл. почта: alxvsrge@gmail.com Вэб-адрес организации: <https://gvkg.ru/>

Троян Владимир Николаевич Д-р мед. наук, профессор, начальник центра лучевой диагностики ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России Москва, Россия
Эл. почта: vtroyan10@yahoo.com Вэб-адрес организации: <https://gvkg.ru/>

Рукавицын Олег Анатольевич Д-р мед. наук, профессор, начальник гематологического центра ФГБУ «ГВКГ им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России Москва, Россия
Эл. почта: ngc@list.ru Вэб-адрес организации: <https://gvkg.ru/>

Information about author

Sergei Anatolevich Alekseev PhD (medicine), Head of the CT and MRI Office of the X-ray Department of the Radiation Diagnostics Center of the Main military clinical hospital N.N. Burdenko of the Russian Ministry of Defense Moscow, Russia
E-mail: alxvsrge@gmail.com
The organization's web address: <https://gvkg.ru/>

Vladimir Nikolaevich Troyan Doctor of Science (medicine), Professor, Head of the Center for Radiation Diagnostics of Main military hospital N.N. Burdenko of the Russian Ministry of Defense Moscow, Russia
E-mail: vtroyan10@yahoo.com
The organization's web address: <https://gvkg.ru/>

Oleg Anatolevich Rukavitsyn Doctor of Science (medicine), Professor, Head of the Hematology Center of the Main military hospital N.N. Burdenko of the Russian Ministry of Defense Moscow, Russia
E-mail: ngc@list.ru
The organization's web address: <https://gvkg.ru/>

УДК 671.373
ГРНТИ 27.39.19, 29.19.49, 29.15.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.198-204

**А.К. Дмитриев, А.Н. Коновалов, В.Н. Кортунوف,
В.А. Ульянов**
НИЦ «Курчатовский институт»

ПОСЛОЙНОЕ 2D СКАНИРОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ БИОТКАНИ ИЗЛУЧЕНИЕМ CO₂ ЛАЗЕРА

Проведено сравнение особенностей испарения сердечной мышцы свиньи in vitro излучением одномодового CO₂ лазера в непрерывном и superpulse режимах в процессе послойного 2D сканирования поверхности биоткани. Исследованы динамика изменения глубины сканирования и зоны термоповреждения ткани в зависимости от количества сканов.

Ключевые слова: роботизированная хирургия, CO₂ лазер, двухкоординатный сканер, биомодель, глубина сканирования, зона термоповреждения.

**A.K. Dmitriev, A.N. Konovalov, V.N. Kortunov,
V.A. Ulyanov**
NRC "Kurchatov Institute"

LAYER-BY-LAYER 2D SCANNING OF THE BIOTISSUE SURFACE USING CO₂ LASER RADIATION

A comparison of the features of evaporation of the cardiac muscle of a pig in vitro by radiation of a single-mode CO₂ laser in continuous and superpulse modes was carried out during layer-by-layer 2D scanning of the surface of the biotissue. The dynamics of changes of the scanning depth and the zone of thermal damage to the underlying tissue layers were studied depending on the number of scans.

Key words: robot-assist surgery, CO₂ laser, two-dimensional scanner, biomodel, scanning depth, thermal damage zone

Введение

Применение автоматизированных и роботизированных систем для задач прецизионной и малотравматичной хирургии является современной тенденцией развития и совершенствования медицинских технологий [1, 2]. Одним из перспективных хирургических инструментов является автоматизированный CO₂ лазерный скальпель на основе сканатора [3]. Лазерное излучение позволяет обеспечить минимальную инвазивность и травматизацию здоровых тканей, высокую скорость и точность удаления патологической ткани, ускоряет послеоперационную реабилитацию пациентов. В настоящее время активно проводятся исследования по применению лазерных сканаторов для задач автоматизированного получения прецизионных разрезов сложной формы [4,5] и выпаривания заданной области произвольной формы на поверхности биоткани [6,7].

Одним из направлений развития лазерной роботизированной хирургии является разработка методик выбора оптимальных режимов лазерного воздействия и обеспечения высокой эффективности таких операций. Для этого проводятся экспериментальные исследования на биомоделях различного типа и разрабатываются численные модели, позволяющие прогнозировать и определять глубину реза или толщину испаряемой ткани [5,8]. Процесс лазерного испарения сопровождается тепловым повреждением здоровых тканей, окружающих область лазерного воздействия. Характер и степень такого термоповреждения зависят от параметров лазерного излучения. Это играет важную роль в процессе заживления лазерной раны. В частности, наличие обугленного (карбонизированного) слоя на поверхности ткани увеличивает время послеоперационной реабилитации [9], а оптимальная толщина слоя коагуляционного некроза обеспечивает эффективный гемостаз и получение «сухой» поверхности во время лазерного воздействия [10]. Наиболее изучены эти эффекты при перфорации и рассечении мягких тканей излучением CO₂ лазера в импульсном, непрерывном и superpulse (совокупность коротких импульсов

с высокой частотой повторения) режимах испарения. В [11, 12] показано, что рассечение в режиме *superpulse* позволяет уменьшить степень термopовреждения нативной ткани по сравнению с непрерывным режимом. В [13] такого различия не обнаружено. В [11] отмечается, что в режиме *superpulse* достигается меньшая глубина рассечения ткани по сравнению с непрерывным. Данные об особенностях испарения и термopовреждения биотканей при послойном сканировании поверхности излучением CO₂ лазера при различных режимах в известной литературе отсутствуют.

Цель работы

Цель данной работы – исследовать динамику лазерного выпаривания биоткани при послойном 2D сканировании поверхности излучением CO₂ лазера и дать оценку степени теплового повреждения ткани в непрерывном и *superpulse* режимах.

Методы и материалы

Для автоматизированного лазерного испарения поверхности биомоделей использовалась установка, состоящая из лазерного блока, шарнирно-зеркального манипулятора и состыкованного с ним 2-х координатным гальвано-сканатором JS1105 Galvo Scanner (Sino-Galvo Technology Co., Китай). Установка создана на основе одномодового CO₂ лазера C-20A (Coherent, США) мощностью до 20 Вт с высокочастотной накачкой активной среды. Подробное описание установки приведено в [14]. Блок управления сканатором и специально разработанная программа позволяли задавать любые формы областей выпаривания в пределах 20х20 мм² при скорости перемещения лазерного пучка в пределах 1 – 50 мм/с.

Выпаривание ткани осуществлялось при непрерывном (CW) и *superpulse* (SP) режимах работы лазера. Последний представляет собой генерацию коротких импульсов в диапазоне 10–1000 мкс с паузами между импульсами излучения 0.5–50 мс. В этом режиме CO₂ лазер выдает пиковую мощность до 30 Вт. Излучение фокусировалось на поверхность биомодели. Использовалась линза с фокусным расстоянием 50 мм. Размер фокального пятна и распределение интенсивности излучения определялись анализатором профиля лазерного луча NanoScan2s Pyro/9/5 (Ophir-Optronics, Израиль). Размер фокального пятна составлял 175 мкм по уровню 86 %.

Эксперименты проводились при мощности лазерного излучения 1,5 и 3,5 Вт, скорости перемещения лазерного пучка 16,3 мм/с. В режиме SP задавались следующие параметры излучения: длительность импульса – 140 мкс, паузы между импульсами – 1 мс. Производилось многократное (до 10 сканов) послойное выпаривание (далее «сканирование») прямоугольной области размером 8.5 мм x 1.6 мм. При этом область сканирования представляет собой совокупность параллельных лазерных каналов (разрезов), следующих друг за другом на заданном расстоянии. В экспериментах это расстояние составляло 75 мкм в фокальной плоскости сканирования на поверхности ткани, что обеспечивало перекрытие лазерного пучка при сканировании и получение ровной поверхности после сканирования.

В качестве биомодели использовались образцы тканей сердечной мышцы свиньи *in vitro*. Ткани использовались в течение 48 часов *post mortem*. Образцы хранились при температуре 0–4°C при постоянной влажности.

Поперечные срезы сердечной мышцы после сканирования изучались под микроскопом. Измерение глубины выпаривания образцов осуществлялось по фотографиям срезов зоны выпаривания. Глубина выпаривания определялась по 5-ти образцам.

Зоны термopовреждения (ЗТП) ткани измерялись с помощью калиброванной сетки окуляра микроскопа. В зависимости от параметров сканирования ЗТП могла включать зоны карбонизации и коагуляции, визуально наблюдаемые как области черно-коричневого и серо-белого цвета соответственно. Такие цвета являются результатом обугливания и коагуляции белков ткани в результате их нагрева до температуры 70°C [15] соответственно. Глубина ЗТП измерялась как расстояние от поверхности испаренной ткани до границы между зоной коагуляции и нативной тканью.

Полученные результаты

На рис. 1 а представлены зависимости глубины сканирования H от количества сканов n при CW и SP режимах сканирования. На рис 1б представлено изменение диаметра лазерного пучка в зависимости от удаления фокуса (фокальной плоскости) от поверхности ткани (ΔZ). Глубина каустики в этом случае составляет около 2 мм, на этом расстоянии площадь лазерного пятна увеличивается вдвое. Как видно из рис 1а, при послойном испарении биоткани на глубину в пределах каустики лазерного пучка (0-2 мм) зависимость $H(n)$ близка к линейной. С увеличением числа сканов ($n \geq 4$, в режиме $P=3,5$ Вт), количество испаряемой биоткани за один скан снижается в результате уменьшения интенсивности лазерного излучения.

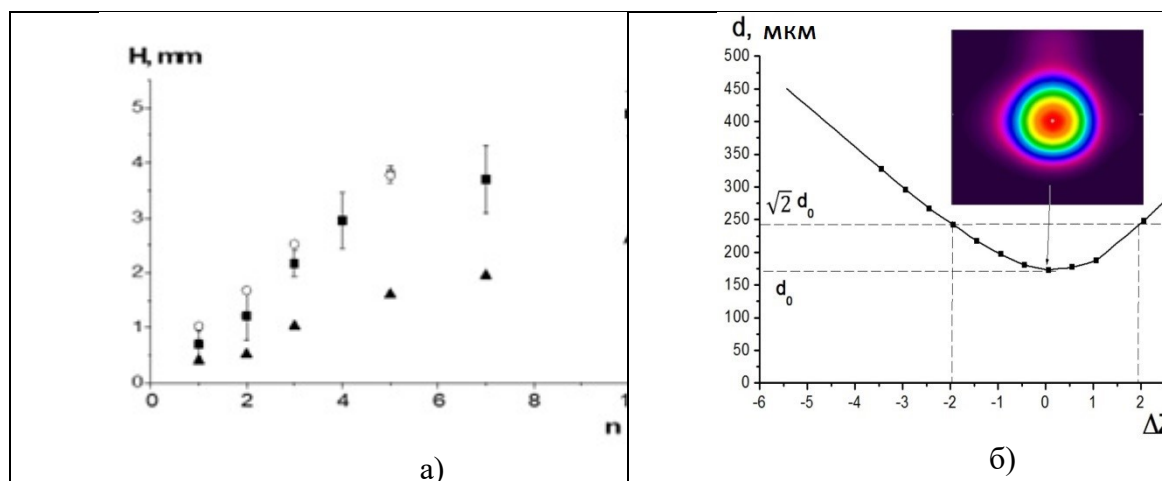


Рис. 1. Зависимости глубины сканирования H от количества сканов n (а) и диаметра лазерного пучка d от расстояния ΔZ от фокальной плоскости (б). Расстояние между штриховыми линиями 75 мкм.

а) – квадрат, круг – $P=3,5$ Вт, CW; треугольник – $P=1,5$ Вт, SP.

На рис 2 представлены зависимости глубины сканирования H от скорости перемещения лазерного пучка V (для $n=10$) при CW и SP режимах сканирования.

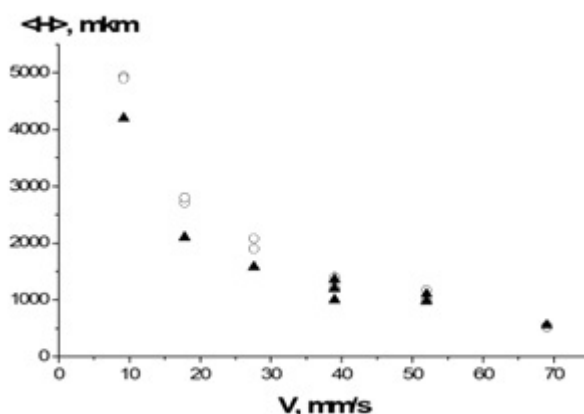


Рис. 2. Зависимость глубины сканирования H при $n=10$ от скорости сканирования V . Круг – CW, треугольник – SP. $P=1,5$ Вт.

В процессе лазерного сканирования происходит испарение биоткани на определенную глубину, задаваемую параметрами сканирования. При этом часть энергии лазерного излучения идет на нагрев нижерасположенного слоя биоткани, что приводит к термическому повреждению и изменению свойств этого слоя ткани. В общем случае ЗТП ткани включает зону карбонизации и зону коагуляции (рис.3).

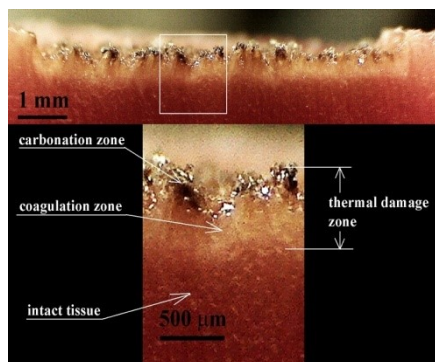


Рис. 3. Состав лазериндуцированной ЗТП поверхности сердечной мышцы свиньи *in vitro* после сканирования непрерывным излучением.

В зависимости от режимов лазерного сканирования состав и размеры ЗТП могут значительно меняться. При равных условиях одно – и многократного сканирования в режиме SP формирования зоны обугливания не наблюдалось. На рис. 4 представлена динамика изменения глубины сканирования в зависимости от количества сканов в режиме SP при средней мощности излучения 1,5 Вт. Как следует из рисунка, при сканировании в этом режиме карбонизация отсутствует. Аналогичная картина наблюдалась при мощности излучения 3,5 Вт.



n5



n7



n10

Рис. 4. Динамика изменения глубины сканирования в зависимости от количества сканов *n* в режиме SP. $P = 1.5$ Вт.

Проведено сравнение средних величин ЗТП при CW и SP режимах сканирования поверхности ($P=3,5$ Вт) в зависимости от количества сканов. Сканирование проводилось в пределах каустики лазерного пучка (см. рис. 1, б). Глубина сканирования и зона коагуляции исследовались после каждого сканирования. Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Глубина сканирования и средняя величина ЗТП в зависимости от режимов лазерного излучения ($P = 3.5$ Вт).

Кол-во сканов <i>n</i>	Общая глубина сканирования, мм SP	Глубина за один скан, мм SP	ЗТП, мм SP	Общая глубина сканирования, мм CW	Глубина за один скан, мм CW	ЗТП, мм. CW
1	$0,85 \pm 0,1$	$0,85 \pm 0,1$	$0,70 \pm 0,20$	$1,06 \pm 0,18$	$1,06 \pm 0,18$	$0,45 \pm 0,15$
2	$1,59 \pm 0,08$	$0,74 \pm 0,15$	$0,65 \pm 0,25$	$2,03 \pm 0,24$	$0,97 \pm 0,25$	$0,55 \pm 0,15$
3	$2,49 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,20$	$2,84 \pm 0,16$	$0,81 \pm 0,25$	$0,52 \pm 0,20$

Как следует из таблицы 1, с увеличением количества сканов глубина сканирования за один проход изменяется незначительно. Это говорит о том, что термическое повреждение нижерасположенного слоя ткани при повторном лазерном сканировании

существенно не влияет на толщину испаряемой ткани с такой «термически модифицированной» поверхностью. Зона термоповреждения в случае непрерывного режима облучения содержит карбонизированную ткань (рис.2), которая отсутствует при облучении в режиме SP (рис.3). Зона коагуляции в режиме SP в 1,2- 1,5 раза больше, чем ЗТП в CW режиме испарения ткани.

На рис. 5 представлена динамика изменения размера зоны коагуляции при многократном сканировании поверхности биоткани в режиме SP при различной мощности лазерного излучения. Видно, что при сканировании поверхности в пределах каустики (при $P = 1,5$ Вт) размер зоны коагуляции остается практически постоянным. То же самое мы наблюдаем при $P = 3,5$ Вт в случае малого количества сканирований ($n \leq 5$). Заметное уменьшение ЗТП наблюдается при большем ($n \geq 6$) числе сканирований, когда глубина зоны выпаривания достигает 3-4 мм и выше (см. рис 1а).

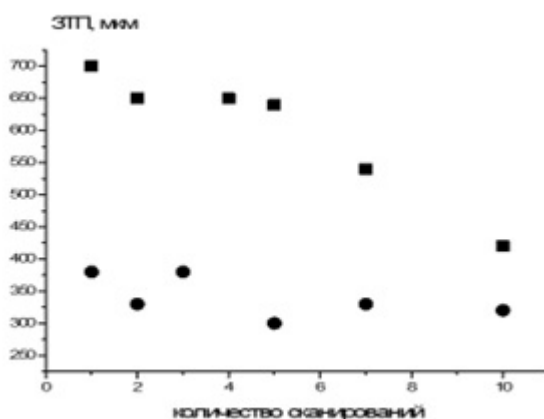


Рис. 5. Зависимости размера зоны коагуляции от количества сканов n при сканировании в режиме SP. Квадрат – $P = 3,5$ Вт; круг – $P = 1,5$ Вт

Как следует из представленных зависимостей (рис. 1а и 2 и табл.1) в непрерывном режиме при равной мощности излучения испаряется в среднем на 10-15% больше ткани за один проход, чем в режиме superpulse; при этом величина зоны термоповреждения ткани в непрерывном режиме меньше.

Выводы

Проведено сравнение особенностей испарения биомодели на основе сердечной мышцы свиньи *in vitro* излучением одномодового CO₂ лазера в непрерывном и superpulse режимах в процессе послойного 2D сканирования поверхности биоткани. Исследованы динамика изменения глубины сканирования и зоны термоповреждения нижерасположенных слоев ткани в зависимости от количества сканов в пределах и вне каустики лазерного пучка.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

При послойном испарении биоткани на глубину в пределах каустики лазерного пучка имеет место линейная зависимость глубины сканирования от количества сканов. При выходе испаряемой поверхности из каустики толщина испаренного за один скан слоя ткани уменьшается. При последующем лазерном сканировании ранее «термически модифицированная» поверхность ткани существенно не влияет на толщину испаряемого слоя.

В непрерывном режиме сканирования глубина испаренной за один проход ткани больше на 10-15% по сравнению с режимом superpulse.

Зона термоповреждения ткани в непрерывном режиме сканирования содержит карбонизированную ткань, которая отсутствует при сканировании в режиме superpulse. Зона

коагуляции ткани в режиме superpulse в 1,2- 1,5 раза больше, чем зона термоповреждения в непрерывном режиме испарения ткани.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература.

1. Guillermo Maza, Arun Sharma. Past, Present, and Future of Robotic Surgery. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 2020, v, p. 935-941.
2. Jinpei Han, Joseph Davids, Hutan Ashrafian, Ara Darzi, Daniel S. Elson, Mikael Sodergren. A systematic review of robotic surgery: From supervised paradigms to fully autonomous robotic approaches. *The International Journal of Medical Robotics and Computer Assisted Surgery*, 2022, v. 18, Issue 2, e2358.
3. Yen-YiJuo, Ahmad Abiri, Jake Pensa, Songping Sun, Anna Tao, James Bisley, Warren Grundfest, Erik Dutson. 17: Center for Advanced Surgical and Interventional Technology Multimodal Haptic Feedback for Robotic Surgery, *Handbook of Robotic and Image-Guided Surgery*, 2020, ELSEVIER, p. 285-301.
4. Alperen Acemoglu, Loris Fichera, Ibolya E. Kepiro, Darwin G. Caldwell and Leonardo S. Mattos. Laser Incision Depth Control in Robot-Assisted Soft Tissue Microsurgery. *Journal of Medical Robotics Research*, 2017, v. 2, № 3, p. 1740006-1 - 1740006-12.
5. Hun Chan Lee, Nicholas Pacheco, Loris Fichera, Sheila Russo. When the End Effector Is a Laser: A Review of Robotics in Laser Surgery. *Advanced Intelligent Systems*, 2022, v. 4, № 10, p. 1-23.
6. Paolo Bonan, Giustino Gallo, Irene Fusco, Francesca Madeddu, Tiziano Zingoni. Efficacy and Safety of Carbon Dioxide Laser System in the Treatment of Scalp Sebaceous Adenoma With the Use of a New Scanner Unit. *Journal of Medical Cases*, 2023, v. 14, № 7, p. 251-254.
7. Iacopo Giani et al. Scanner-Assisted CO2 Laser Fissurectomy: A Pilot Study. *Front. Surg.*, 2021, v. 8, p. 1-10.
8. Alexander K. Dmitriev, Alexey N. Konovalov, Vladimir N. Kortunov, and Valery A. Ulyanov. Evaporation peculiarities of soft biological tissues in the process of automated 2D-scanning of CO2 laser radiation // *J. of Biomed. Photonics & Eng.*, 2024, v. 10. № 4, p.040307-1 -8.
9. А.И. Неворотин. Введение в лазерную хирургию. СПб, Спецлит, 2000, 175 с.
10. Елисеенко В.И. Патологическая анатомия и патогенез лазерной раны. *Лазерная медицина*, 2017, т. 21, вып. 4, с. 5-10.
11. R.J.Lanzafame, J.O.Naim, D.W.Rogers and J.R.Hinshaw. Comparison of continuous-wave, chop-wave, and super-pulse laser wounds. *Lasers Surg. Med.*, 1988, v. 8, p.p. 119-124.
12. R. E. Fitzpatrick, J. Ruiz-Esparza, M.P. Goldman. The depth of thermal necrosis using the CO2 laser: A comparison of the superpulsed mode and conventional mode. *Derm. Surg.*, 1991, v. 4, p. 1524-1531.
13. Werkhaven J, Harris DM, Grossweiner LI. Tissue damage comparison of super-pulse vs. CW CO2 laser. *Lasers Surg. Med.*, 1987, v. 7, p.759.
14. A.K. Dmitriev, A.N. Konovalov, V.N. Kortunov, and V.A. Ulyanov. An Apparatus Based on a CO2 -Laser with Feedback for Automated Precision Evaporation of Biological Tissues. *Instruments and Experimental Techniques*, 2022, v. 65, № 2, pp. 332-335.
15. G. Muller, K. Dorschel, and H. Kar. "Biophysics of photoablation process," *Lasers in Medical Science* 6(3), 241-254 (1991).

Сведения об авторах

Александр Константинович Дмитриев, н.с.

НИЦ «Курчатовский институт»

Москва, Россия

Эл. почта: dmitriev_a62@mail.ru

Алексей Николаевич Коновалов, к.ф.м.н., с.н.с.

НИЦ «Курчатовский институт»

Москва, Россия

Эл. почта: alex_konov@mail.ru

Information about author

Alexander Konstantinovich Dmitriev,

researcher, NRC "Kurchatov Institute",

Moscow, Russian Federation

E-mail: dmitriev_a62@mail.ru

Aleksey Nikolaevich Konovalov, PhD,

senior researcher, NRC "Kurchatov Institute"

Moscow, Russian Federation

E-mail: alex_konov@mail.ru

Владимир Николаевич Кортунов, н.с.
НИИЦ «Курчатовский институт»
Москва, Россия
Эл. почта: vncor@yandex.ru
Валерий Андреевич Ульянов, к.т.н., в.н.с.
НИИЦ «Курчатовский институт»
Москва, Россия
Эл. почта: vaul595@mail.ru

Vladimir Nikolaevich Kortunov,
researcher, NRC “Kurchatov Institute”,
Moscow, Russian Federation
E-mail: vncor@yandex.ru
Valery Andreevich Ulyanov, PhD,
leading researcher, NRC “Kurchatov Institute”
Moscow, Russian Federation
E-mail: vaul595@mail.ru

УДК 62.93, 62-791.2
ГРНТИ 59.14, 59.31
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.204-208

Т.И. Мурашкина, В.А. Бадеев
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

ИЗМЕРЕНИЕ НИЗКОГО ДАВЛЕНИЯ В КОСМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

Обосновано применение волоконно-оптического микродатчика с компенсационным измерительным каналом для измерения низкого давления в системах жизнеобеспечения космического применения, принцип действия которого основан на аттенюаторно-отражательном принципе преобразования оптического сигнала.

Ключевые слова: *давление, волоконно-оптический аттенюаторно-отражательный измерительный преобразователь, система жизнеобеспечения, узкая полость, неровная поверхность, световой поток, апертурный угол*

T.I. Murashkina, V.A. Badeev
Penza State University

MEASUREMENT OF LOW PRESSURE IN SPACE LIFE SUPPORT SYSTEMS

The use of a fiber-optic microsensors with a compensating measuring channel for measuring low pressure in life support systems for space applications is substantiated, the principle of operation of which is based on the attenuator-reflective principle of optical signal conversion.

Keywords: *pressure, fiber-optic attenuator, reflective measuring transducer, life support system, narrow cavity, uneven surface, luminous flux, aperture angle*

Введение

Известно, что при отборе в группу космонавтов и при их подготовке к полетам осуществляется медицинский контроль у врачей – специалистов: терапевта, невролога, лора, офтальмолога, стоматолога. При этом проводится ряд инструментальных исследований состояния здоровья космонавтов: ЭКГ, УЗИ, эндоскопия, рентгеновское исследование и др.). Кроме того оценивается вестибулярный аппарат, устойчивость организма к перегрузкам и пр. Чтобы выяснить степень переносимости нагрузок, проводятся функциональные нагрузочные пробы: испытания в предельных для человека условиях в барокамере, на центрифуге и др. (рисунок 1).



*Рисунок 1 – Центрифуга ЦФ-18 для испытаний космонавтов на предельные нагрузки
[www.gctc.ru]*

Это позволяет выявить скрытые заболевания и отклонения, о которых человек мог даже и не подозревать. Кроме того, на основании полученных данных определяются резервные возможности человека, его запас прочности.

Раз в год состояние здоровья членов отряда космонавтов проверяет врачебно-экспертная комиссия. Среди обязательных обследований – определение переносимости умеренных степеней гипобарической гипоксии и перепадов барометрического давления (в барокамере), а также определение устойчивости к воздействию длительных перегрузок (вращение в центрифуге с нагрузкой 3g и 5g продолжительностью по 30 секунд). Во время таких перегрузок у человека учащается дыхание и сердцебиение, повышается сосудистый тонус и артериальное давление в плечевой артерии.

Внекорабельная деятельность (ВКД) космонавтов является важным элементом программы пилотируемого космического полета. Для защиты от пагубного воздействия на организм человека экстремальных факторов открытого космического пространства работа космонавта вне кабины космического объекта выполняется в специальном индивидуальном снаряжении — скафандре ВКД. Он изолирует космонавта от окружающего вакуума и обеспечивает поддержание необходимых для его жизнедеятельности параметров автономной среды обитания.

При работе в скафандре частота сердечных сокращений у космонавтов рассчитывается по кривой ЭКГ. Температура тела контролируется термистором, укрепляемом на коже в заушной ямке участника ВКД. Мониторинг микроклимата скафандра предусматривает контроль давления газовой атмосферы, концентрации CO_2 , разности CO_2 на входе/выходе поглотительного патрона, величины вентиляции скафандра, температуры жидкости на входе в КВО и на выходе) [1].

В космической медицинской практике фактически не используются возможности постановки объективного, точного диагноза, основанного на неинвазивном определении значений микросенсорных изменений параметрических характеристик (давления языка на нёбо, силы мышц языка), обусловленных неврологическим состоянием космонавта в процессе подготовки к полетам или во время полета из-за отсутствия соответствующих инструментальных средств диагностики [2].

Для измерения отдельных параметров, характеризующих неврологическое состояние космонавта, используют методы диагностики, реализуемые с помощью электрических средств измерений или рентгенологические методы. Такие средства измерений небезопасны для жизни космонавта, так как в первом случае возможен электрический пробой электрической части измерительной системы, а во втором - непредсказуемые последствия от облучения. Кроме того, не исключается электромагнитное воздействие со стороны средства измерений на тело человека, что снижает достоверность результатов измерений в процессе диагностирования.

Необходимо контроль неврологических состояний дополнить измерением давления в полости рта с помощью безопасных высокопрецизионных современных волоконно-оптических средств измерения.

На МКС в качестве среды обитания используется нормобарическая газовая среда, близкая по своим параметрам к обычной воздушной атмосфере, а уровень рабочего давления скафандра «Орлан» составляет 40 кПа, что эквивалентно окружающему давлению на высоте порядка 7300 м.

Для обеспечения жизнедеятельности космонавта на борту космического аппарата применяют системы жизнеобеспечения [3,4]. Среди основных функций СЖО является подача жидкости, потребляемой человеком и удаление жидкости, образуемой в процессе его жизнедеятельности [5,6]. Все системы СЖО тем или иным образом связаны с необходимостью измерения давления жидкостных и воздушных потоков.

Цель работы – исследование возможности измерения низкого давления в узких полостях с неровными поверхностями систем жизнеобеспечения космонавтов с помощью волоконно-оптических датчиков низкого давления (ВОДД) аттенуаторно-отражательного типа.

Материалы и методы

Проведен анализ известных способов и средств измерения низкого давления в СЖО [7-9]. Ни один из известных разработанных приборов или комплексов для диагностики мышц языка не нашел применения на практике. Это можно объяснить большой погрешностью измерения давления. Определено, что известные средства измерений имеют большие габаритные размеры не позволяющие разместить их в узких полостях, например, во рту космонавта или между слоями скафандра космонавта. Одновременно они создают электромагнитное поле, влияющее на здоровье космонавта [9]. Поэтому авторами (в соавторстве) в 2024 году была подана заявка на изобретение «Волоконно-оптический датчик давления», по которой в этом же году получен патент № 2829195 [10].

Для снижения большинства погрешностей ВОДД предложено:

- ввести компенсационный микро-оптический канал.

Полученные результаты

При измерении давления в узких полостях под воздействием давления P основание датчика упирается в точку на опорной поверхности (например, в нёбо), при этом воспринимающий элемент (ВЭ) поднимается вверх и тянет вверх за собой мембрану, которая при снятии давления возвращает ВЭ в исходное нейтральное положение [10]. Световой поток Φ_0 , сформированный источником излучения ИИ, по подводящему оптическому волокну ПОВ передается в зону измерений в направлении неподвижной зеркальной поверхности (рисунок 2).

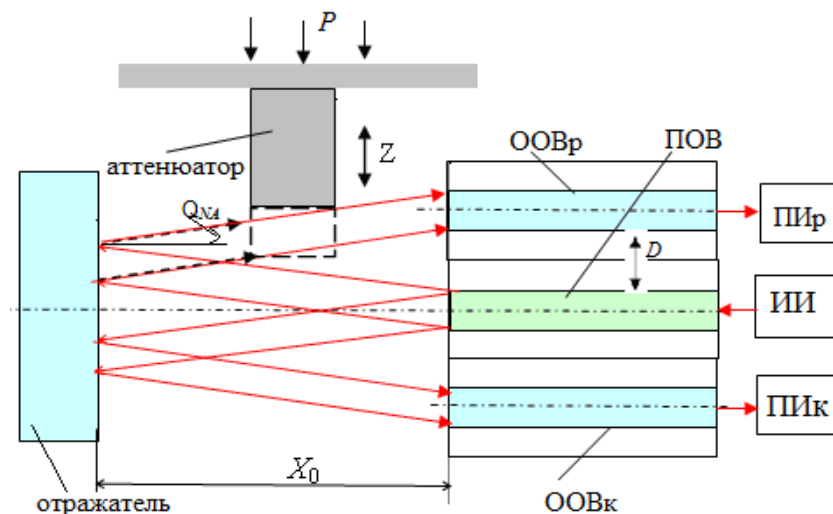


Рисунок 2 – Преобразование оптических сигналов в волоконно-оптическом преобразователе давления аттенюаторно-отражательного типа

При измерении давления аттенюатор, расположенный между отводящим оптическим волокном рабочего измерительного канала ООВ_р и зеркальной неподвижной поверхностью, смещается вверх в направлении Z на значение $Z=Z_i$ параллельно общему торцу оптических волокон, расположенных в одной плоскости.

При этом перекрывается только половина светового конуса напротив ООВ_р. Соответственно световой сигнал на входе и выходе ООВ_р и сигнал на выходе приемника измерения ПИ_р изменяются в зависимости от измеряемого давления P .

Световой сигнал на входе компенсационного отводящего оптического волокна ООВ_к и, соответственно, сигнал на выходе компенсационного приемника излучения ПИК остаются неизменными.

С помощью электронного блока преобразования информации формируется отношение разности сигналов на выходе рабочего $I_r(P)$ и компенсационного I_k каналов к их сумме: $[I_r(P)-I_k]/[I_r(P)+I_k]$. В этом случае наблюдается удвоение чувствительности преобразования, линейаризация выходной зависимости, снижается влияние на точность измерения изгибов волоконно-оптического кабеля, изменения мощности излучения источника излучения и чувствительности приемников излучения.

Выводы

Предлагаемый ВОДД позволит:

- повысить точность измерения низкого давления в системах жизнеобеспечения космонавтов;
- обеспечить снижение погрешности взаимодействия средства измерений с объектом измерений (в 5...6 раз);
- обеспечить высокую воспроизводимость (до 98 %) результатов измерений;
- исключить любые негативные последствия от электромагнитного воздействия на космонавта и результаты измерения.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются:

- разработанный волоконно-оптический аттенюаторно-отражательный способ преобразования оптических сигналов, обеспечивающий экспресс-измерение давления в скафандрах космонавтов, в полости рта космонавта (давление языка на нёбо в процессе предполетных тренировок), в полости движения воздушных и жидкостных потоков в системах жизнеобеспечения космонавтов (возможно в системах жизнеобеспечения медицинских учреждений);
- запатентованный волоконно-оптический датчик низкого давления, который можно располагать в узких пространствах на объектах с неровными поверхностями (отсутствует традиционный штуцер с резьбой для крепления на объекте).

БЛАГОДАРНОСТИ, СВЕДЕНИЯ О СПОНСОРАХ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда

№ 25-29-20107, <https://rscf.ru/project/25-29-20107/>

ЛИТЕРАТУРА

1. Барер А.С., Вакар М.И., Филипенков С.Н. и др. Медицинское обеспечение космонавтов в открытом космическом пространстве // Физиологические проблемы невесомости / Ред. О.Г. Газенко, И.И. Касьян. М., 1990. С. 179-197
2. Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Геращенко С.И., Бростилова Т.Ю. Проблемные вопросы применения волоконно-оптических датчиков давления в медицинской практике // В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2021. Весенняя сессия. Москва, 2021. С. 16-32.
3. Камалетдинова Г.Р., Курмазенко Э.А., Хабаровский Н.Н., Кочетков А.А., Гаврилов Л.И., Моруков Б.В., Демин Е.П. Влияние конструктивных особенностей регенерационных систем жизнеобеспечения на эффективность обслуживания экипажем:

- предварительный анализ 105-и суточного эксперимента. 8-ая Международная конференция «Авиация и Космонавтика - 2009», М: МАИ, 2009 С. 107-114 с использованием специализированного аппаратно-программного комплекса «АПКОЭС».*
4. Самсонов Н.М, Бобе Л.С., Гаврилов Л.И., Кочетков А.А., Курмазенко Э.А., Романов С.Ю, Железняков А.Г., Баранов В.М., Синяк Ю.Е. Регенерационные системы жизнеобеспечения экипажей космических станций // Известия РАН, Энергетика, 2009, №1, - С.61-68
 5. Серебряков В. Н. Основы проектирования систем жизнеобеспечения экипажа космических летательных аппаратов. М.: Машиностроение, 1983. 163 с.
 6. Уракова Е.В. Морфофункциональная оценка языка и ее клиническое значение. Диссертация на соискание уч. степени канд. мед. наук. Специальность 14.00.21 - Стоматология. Казань, 1998, с. 131;
 7. Ямашев И.Г., Матвеев Р.С. Язык: клинко-функциональные методы диагностики патологических состояний. - Чебоксары: АУ Чувашии ИУВ, 2012. - С. 48-51.
 8. Патент RU 2623309 Способ измерения силы давления мышц языка на сегменты смежных анатомических образований полости рта/ Оpubл. 23.06.2017 <http://www.findpatent.ru/patent/262/2623309.html>
 9. Патент на изобретение РФ 2829195 С1, Волоконно-оптический датчик давления/ Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А., Серебряков Д.И., Бадеев В.А., Хасанишина Н.А. //опубл. 25.10.2024.

Сведения об авторах

Татьяна Ивановна Мурашкина

доктор техн. наук, профессор, профессор каф.
«Приборостроение» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

Пенза, Россия

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Владислав Александрович Бадеев

Лаборант-исследователь научно-технического центра «Нанотехнологии волоконно-оптических систем» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

Пенза, Россия

Эл. почта: vladbadeev4464@gmail.com

Information about author

Tatiana Ivanovna Murashkina

Doctor of (Tech.) Sciences, Professor,
Professor of the Department of Instrument Engineering Penza State University

Penza, Russian Federation

E-mail: timurashkina@mail.ru

Vladislav Alexandrovich Badeev

Laboratory assistant researcher at the Scientific and Technical Center "Nanotechnology of fiber-optic systems" Penza State University

Penza, Russian Federation

E-mail: vladbadeev4464@gmail.com

УДК 615.814.1; 504.75.05; 613.16;

ГРНТИ 39.25.15; 87.24.35; 87.24.37;

87.25.00

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.209-213

Н.И. Воробьев

ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии

Санкт-Петербург, Россия

Н.А. Загустина, С.В. Гурин

Научно-производственный центр «Потенциал»,

Санкт-Петербург, Россия

ЭЛЕКТРОПУНКТУРНАЯ ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА

Для диагностики здоровья человека предлагается использовать новую информационную технологию, которая опирается на регистрацию КСИ-потенциалов в зонах проекций акупунктурных точек на коже человека, и позволяет индивидуально подбирать программу лечения человека и поддерживать его здоровье. Новый метод направлен на оценку состояния всех внутренних органов человека с учетом влияния факторов внешней среды.

Ключевые слова: биологически активные точки, медицинская диагностическая система, КСИ-потенциалометрия

N.I. Vorobyov

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology,

Saint-Petersburg, Russia

N.A. Zagustina, S.V. Gurrin

Scientific and Production Centr «Potential», Saint-Petersburg, Russia

THE ELECTROPUNCTURE DIAGNOSIS OF HUMAN HEALTH

For human health diagnostics is supposed to use a new information technology that relies on the registration of CSI potentials in the projection areas of acupuncture points on human skin, and allows you to individually select a treatment program for a person and maintain his health. The new method is aimed at assessing the condition of all internal organs of a person, taking into account the influence of environmental factors.

Keywords: biologically active points, medical diagnostic system, CSI-potentialometry.

Введение

В условиях возрастания антропогенных и техногенных факторов, влияющих на состояние здоровья человека, становится актуальной разработка новых видов аппаратуры для оценки здоровья на уровне сверхслабых полей. Все живые организмы – от одноклеточных форм до человека – не изолированные, а открытые биосистемы, постоянно реагирующие на изменения окружающей среды и стремящиеся поддерживать свой гомеостаз, обмениваясь с окружающей средой веществом, энергией и информацией. Поэтому особенно важно, чтобы аппаратура, оценивающая состояние здоровья человека, обладала высокой чувствительностью и позволяла оценивать биохимические процессы в организме человека на уровне сверхслабых полей [1, 2].

Живые организмы генерируют сверхслабые сигналы для регуляции биохимических процессов во внутренних средах организма и перераспределения потоков энергетических и материальных ресурсов между ними. Регистрацию этих сигналов особенно важно выполнять посредством высокочувствительной измерительной аппаратуры, позволяющей корректно и с хорошей повторяемостью измерять сверхслабые сигналы, генерируемые жидкими средами под воздействием внешних физических полей. Электропунктурные методы оценки функционального состояния организма человека, известные в настоящее время, не позволяют получать достоверные и повторяющиеся результаты измерений.

Электрофизиологические методы, основанные на измерении электропроводности или электрического сопротивления биологически активных точек (БАТ) [3, 4] на постоянном токе, имеют уровень энергетического воздействия, на несколько порядков превышающий собственную электрическую мощность накожных проекций биологически

активных точек и составляют величины: Nakatani - $(2.4-3.6) \cdot 10^{-3}$ ВА, Нечушкин - $(4-6) \cdot 10^{-5}$ ВА, Foll - $(2-3) \cdot 10^{-6}$ ВА, Портнов - $1.8 \cdot 10^{-6}$ ВА).

В условиях антропогенных, техногенных и других факторов внешнего воздействия на здоровье человека становится актуальной развитие инструментальной базы и расширение сфер применения новой высокочувствительной диагностической аппаратуры.

Цель исследования – показать информативную значимость для оценки и поддержания здоровья населения технологии, реализованной в диагностической экспертной системе (ДЭС) «КСИ-Мед»

Материалы и методы.

Диагностическая экспертная система «КСИ-Мед» и метод измерения КСИ-потенциалов, (регистрационное удостоверение № ФСР 2011/ и приказ от 09.10.2013 года.) [5-7] (ДЭС) применяется для полиорганной экспресс - диагностики функционального состояния организма и его адапционных резервов по показателям, отражающим сдвиг кислотно-щелочного равновесия в БАТ – КСИ-потенциалам. Полученные показатели подвергаются системному анализу с позиций важнейших концепций древневосточной медицины и современных теорий гомеостаза, адаптации и функциональных систем организма [8, 9]. При оценке состояния здоровья человека объективно учитывается ритмологическая активность акупунктурных функциональных систем (АФС), обусловленная экзогенными факторами, временем суток, датой, географической широтой места проведения исследования и фазами Луны.

Измеряя КСИ-потенциалы, мы опосредованно определяем активность биологических процессов в органах, связанных с БАТ. В результате формируется комплексная и дифференциальная оценки функционирования всего организма, его органов и соответствующих им АФС.

На основании результатов исследования идет построение энергопунктурограммы (ЭнПГ). График ЭнПГ характеризует психосоматическое состояние человека через его кислотно-щелочной гомеостаз – основной регулятор всех биохимических процессов организма. Время исследования 15 минут.

Метод КСИ-потенциалометрии, реализованный в ДЭС, не искажает состояния организма, не вызывает электрического пробоя в БАТ (уровень энергетического воздействия примерно 10^{-9} ВА) и позволяет оценивать состояние организма в режиме реального времени.

В рамках гранта РФФИ № 19-29-01126 «Разработка методов автоматизации результатов оценки здоровья человека с помощью КСИ-потенциалометрии», была показана возможность разработки с помощью методов искусственного интеллекта на основе нейронной сети, алгоритма классификации информационных объектов по результатам КСИ-потенциалометрии с целью диагностики наличия определенных заболеваний у пациентов [10-12].

В результате выполнения настоящей НИР была показана возможность осуществления диагностики на основании нормированных КСИ-потенциалов пациента. Корреляция разработанной нейросетевой модели с данными клинических исследований составила 78.13%, и эта точность не является предельной.

Полученные результаты.

Метод КСИ-потенциалометрии реализованный в ДЭС «КСИ-Мед» позволяет проводить регистрацию КСИ-потенциалов в реальном масштабе времени.

Кислотно-щелочное равновесие неразрывно связано с работой буферных систем крови, обеспечивающих постоянство внутренней среды организма. В этой связи, комплекс измерений раскрывает картину концентрационно-энергетического гомеостаза.

Измерения не сказываются негативно на состоянии здоровья человека, не сопровождаются электрическим пробоем кожных тканей (энергия воздействия датчиков на кожу не более 10^{-9} ВА). Метод КСИ-потенциалометрии обеспечивает повторяемость и

надежность результатов измерений, позволяет проводить измерения как *in vivo*, так и *in vitro*.

График ЭнПГ (рис.1) позволяет визуализировать динамику изменений функционального состояния всех органов человеческого организма по 96 дифференциальным показателям. Была обнаружена корреляция (коэффициент корреляции 0.7) интегрального критерия ЭнПГ диаграммы с PWC170, рН крови, количество тромбоцитов и лимфоцитов.

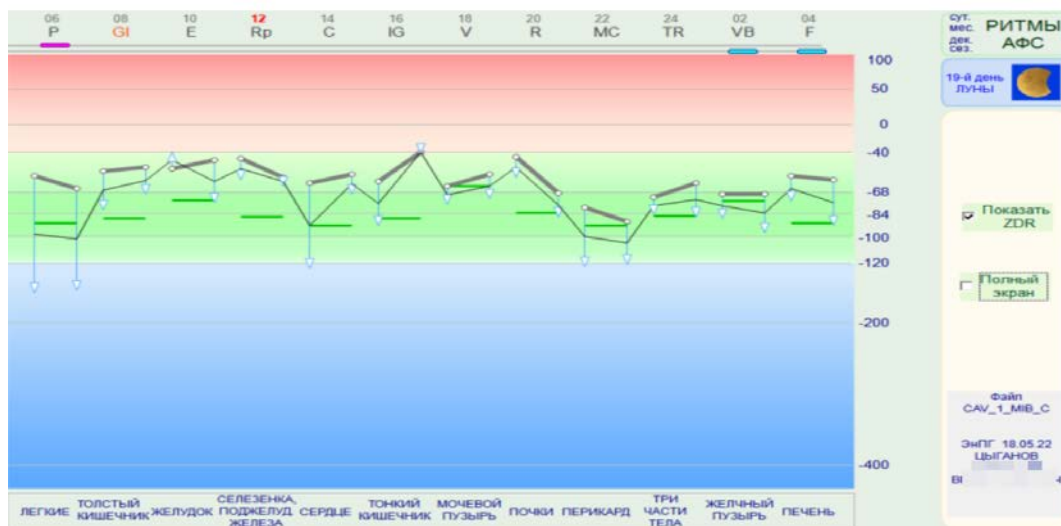


Рис. 1. Энергопунктурограмма функционального состояния пациента

На основании анализа нормированных интегральных и дифференциальных характеристик ЭнПГ, определяются системы приоритетной коррекции, адаптационный потенциал (АП) по стандартным системам гомеостаза и организма в целом.

Выводы.

Метод КСИ-потенциалометрии и ДЭС «КСИ-Мед» является перспективной информационной технологией, позволяющей проводить экспресс-диагностику функционального состояния организма человека и его адаптационных резервов. Предлагаемая информационная технология лежит на стыке медицины, биологии, биофизики.

Разработанная на базе ДЭС «КСИ-Мед» технология, обеспечивает неинвазивность диагностических воздействий, оперативность процедуры диагностики и возможность прогностической оценки здоровья с целью предупреждения обострений. В результате специальной математической обработки могут быть установлены причинно-следственные взаимосвязи измеряемых параметрами с функциональным состоянием органов и систем человека.

Технологии, разрабатываемые с применением КСИ-потенциалометрии, дают возможность индивидуального подбора оптимальных средств поддержания здоровья биосистем в статистическом коридоре нормы. Новый метод направлен на оценку состояния внутренних органов и систем в их взаимодействии друг с другом и с окружающей средой на тонком энергоинформационном уровне. Этот уровень отражает процессы адаптации к малейшим изменениям внутренней и внешней среды. Индивидуально подобранные методики оздоровления организма позволяют притормозить процессы старения и вовремя остановить развитие болезни и полностью вылечить пациента.

Получаемая информация помогает человеку оптимально расходовать свои внутренние резервы для поддержания на оптимальном уровне здоровья, выявлять слабые звенья организма еще до появления первых признаков заболевания, осуществлять индивидуальный подбор средств коррекции и поддержания здоровья.

Заключение.

По нашему мнению, разработанный метод КСИ-потенциалометрии и ДЭС «КСИ-Мед», созданная на его основе, позволяет своевременно и быстро проводить:

- раннюю (донозологическую) оценку состояния здоровья человека;

- постоянный контроль здоровья человека;
- целенаправленную профилактику предупреждения эпидемических заболеваний;
- объективную оценку действия на организм факторов внешней среды, включая климатические и космические факторы;
- оценку профессиональной пригодности лиц (физические и психоэмоциональные нагрузки, работа в экстремальных условиях).

Литература.

1. Козлов В.Г., Марков Ю.В. Методика корпоральной электропунктурной диагностики «ЦНИИ ГРАНИТ – ВМедА им. С.М.Кирова» // Авт. свидетельство СССР №1277965 от 17.12.1981.
2. Гембицкий Е.Н., Козлов В.Г., Марков Ю.А., Павлов В.В., Червяков С.И. Способ измерения электрического сопротивления точек акупунктуры // Авт.свидетельство СССР №1277965 от 17.12.1981 г.
3. В.В. Закурдаев, В.Г. Козлов, Н.А. Загустина, и др. Способ диагностики состояния организма человека // Патент РФ №2214153 от 23.01.2001.
4. Закурдаев В.В. Методология оценки здоровья людей на основе электропунктурной диагностики // Авт. дис. доктора мед. наук: 14.00.07, 14.00.05 / СПб., 1998. 41 с.
5. Козлов В. Г., Быстров В.Н., Загустина Н. А. и др. Измерительный комплекс для оценки энергетического взаимодействия проводящих сред с внешней средой на квантовом уровне на базе комплекса «ЗОДИАК» // Технический отчет. Шифр «ЗОДИАК ТР». МСП СССР, ЦНИИ «ГРАНИТ» МАЭ СССР, ТРИНИТИ, Троицк МО / Л. 1992. 233 с.
6. Козлов В. Г., Быстров В.Н., Загустина Н. А. и др. Комплекс «ЗОДИАК-94» полиоргано-ной оценки функционального состояния организма человека по динамике изменения потенциалов биологически активных точек // Научно-технический отчет / М., СПб: МЗ РФ, НПО "ЭКРАН", ЦНИИ "ГРАНИТ", 1993. 160 с.
7. Диагностическая экспертная система «КСИ-Мед» / Регистрационное удостоверение на медицинское изделие №ФСР 2011/10933 от 21.06.2011.
8. Загустина Н.А., Гурин С.В. Способ анализа состояния объекта / Патент РФ №2402757 от 27.10.2010.
9. Загустина Н.А., Гурин С.В. Устройство для получения информации об исследуемом объекте путем регистрации изменений потенциала жидких сред / Патент РФ № 111670U1 от 20.05.2011.
10. Загустина Н.А., Гурин С.В. Программа «ksineiroeffekt» / Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2019618644 от 03.07.2019.
11. Загустина Н.А., Алёхин А.И., Гурин С.В., Ковтюх И.В., Корвяков С.А., Латышев А.В. Результаты сравнительного анализа информационных объектов, полученных на диагностической экспертной системе «КСИ-Мед», с результатами традиционных клинических методов обследования пациентов // Сб. статей III Международной междисциплинарной конференции «Практика и теория в современной науке» / М.: Научно-издательский центр «Толмачево». 2022, С. 104-118.
12. Загустина Н.А., Алехин А.И., Гурин С.В., Ковтюх И.В., Корвяков С.А., Латышев А. В. Оценка здоровья с позиций доказательной медицины // Актуальные исследования. 2023. №5 (135). С. 47-52. Загустина Н.А., Алехин А.И., Гурин С.В., Ковтюх И.В., Корвяков С.А., Латышев А. В. Оценка здоровья с позиций доказательной медицины // «Актуальные исследования» 2023. №5 (135). С. 47-52. ISSN 2713-1513. DOI10.51635/27131513_2023_5_47.

Сведения об авторах

Николай Иванович Воробьев

Канд. техн. наук,
ведущий научный сотрудник
ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии
Санкт-Петербург, Россия
Эл. почта: Nik.IvanVorobyov@yandex.ru
ORCID 0000-0001-8300-2287

Information about author

Nikolai Ivanovich Vorobyov

PhD (Tech.), Leading Researcher
All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology
Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: Nik.IvanVorobyov@yandex.ru
ORCID 0000-0001-8300-2287

Наталья Александровна Загустина
Генеральный директор
Научно-производственный центр «Потенциал»
Санкт-Петербург, Россия
Эл. почта: s_zna@mail.ru
ORCID 0000-0002-4131-2209
Сергей Владимирович Гурин
Технический директор
Научно-производственный центр «Потенциал»
Санкт-Петербург, Россия
Эл. почта: s_gurin@mail.ru

Nataliya Alexandrovna Zagustina
General Director,
Scientific and Production Center «Potential»,
Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: s_zna@mail.ru
ORCID 0000-0002-4131-2209
Sergey Vladimirovich Gurin
Technical Director,
Scientific and Production Center «Potential»,
Saint-Petersburg, Russian Federation
E-mail: s_gurin@mail.ru

УДК 53.043:577.34
ГРНТИ 29.15.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.213-218

Я.В. Кизилова, А.Н. Соловьев, С.Н. Корякин
Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф.
Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И МОДЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАДИОБИОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА УСКОРЕННЫХ ИОНОВ УГЛЕРОДА

В работе рассмотрен комплексный подход к осуществлению экспериментальной деятельности по облучению лабораторных животных ускоренными ионами углерода, выполняемый в рамках создания будущего клинического центра ионной лучевой терапии. Рассмотрены особенности реализации воксельной расчётной модели и наблюдаемые показатели развития опухолевого процесса.

Ключевые слова: *in vivo, in silico, радиобиология, ионная терапия, углерод, биологическая эффективность, время удвоения опухоли, ЛПЭ, воксельная модель.*

Ya.V. Kizilova, A.N. Solovnev, S.N. Koryakin
The A. Tsyb Medical Radiological Research Centre (MRRC) –
the branch of the FSBI “National Medical Research Radiological
Centre” (NMRR) of the Ministry
of Health of the Russian Federation

EXPERIMENTAL AND SIMULATED ESTIMATION OF RADIOBIOLOGICAL RESPONSE OF ACCELERATED CARBON IONS

The current paper presents a comprehensive approach to the implementation of the experimental techniques used for laboratory animals irradiation with accelerated carbon ions. The work is done under the prospective trial of the next-generation clinical ion therapy center building. The issues of a voxel-based modelling together with the observed tumor dynamics are considered.

Keywords: *in vivo, in silico, radiobiology, ion therapy, carbon, biological efficacy, tumor doubling time, LET, voxel-based model.*

Введение

Повышение точности планирования и прогнозирования исходов лучевой терапии остаётся одной из ключевых задач современной радиобиологии. Особенно актуальным это становится в контексте ионной терапии тяжёлыми заряженными частицами, которая демонстрирует высокую эффективность при лечении резистентных опухолей. Одним из перспективных направлений развития является моделирование взаимодействия ионизирующего излучения с биологическими объектами не только на физическом, но и

на радиобиологическом уровне. Это требует комплексного подхода, включающего не только параметры пучка, но и биологические характеристики ткани, геометрию объекта, пространственное распределение плотности клеток и временные параметры роста опухоли.

Актуальность исследований, направленных на повышение эффективности методов ионной терапии, обусловлена необходимостью точного учёта не только физических, но и радиобиологических факторов воздействия на опухолевую и нормальную ткань. На фоне планов создания первого в России клинического центра ионной терапии [1], особое значение приобретают доклинические модели, обеспечивающие получение первичных данных о характере радиационного повреждения при воздействии ионов тяжёлых элементов, в частности, углерода.

В настоящей работе рассматриваются подходы к первичной оценке радиобиологического эффекта на основе *in silico* моделирования и результатов *in vivo* экспериментов на животных-опухоленосителях. В качестве одного из направлений интеграции физических и биологических параметров рассмотрена возможность построения анатомически точной воксельной модели лабораторного животного для использования в рамках расчётов методом Монте-Карло.

Цель работы.

Целью настоящего исследования является оценка радиобиологического эффекта ионов углерода на опухолевые клетки на основе комплексного подхода, включающего моделирование *in silico* в интересах верификации экспериментальных данных, а также натурные эксперименты *in vivo*, проведённые с использованием лабораторных животных с перевиваемыми опухолями. Отдельное внимание уделено определению линейной плотности ионизации и построению зависимости биологической эффективности от характеристик пучка. В рамках дальнейшего направления работ также предусмотрена возможность использования анатомически-точной воксельной модели лабораторного животного для многократного повышения качественных и количественных показателей наблюдаемых результатов Монте-Карло моделирования.

Материалы и методы.

В качестве биологической модели исследования были использованы беспородные самцы крыс весом 140–160 г с перевиваемой опухолью Саркома М-1. Опухоль имплантировали подкожно в область бедра; к моменту облучения (12-14 день после перевивки) объём опухолевого узла составлял в среднем 1 см³.

Облучение проводили на Временном Радиобиологическом стенде комплекса У-70 (позднее – Центр коллективного пользования «РБС на У-70» [2]) с использованием пучка ионов углерода энергии 450 МэВ/нуклон. Вывод пучка осуществлялся через четыре дипольных магнита и семь квадрупольных линз, обеспечивавших фокусировку и стабильность профиля. Модифицированный пик Брэгга для данных экспериментов рассчитывали с использованием специализированных подходов [3, 4], средства формирования расширенного пика изготавливались из ABS-пластика методами трёхмерной печати. Для коллимации широкого пучка перед контейнером с животным применялся лёгкий алюминиевый коллиматор, минимизирующий вклад вторичных частиц вне целевой зоны.

Дозиметрическое сопровождение каждого сеанса облучения обеспечивалось набором ионизационных камер РТW (ТМ30010-1, ТМ30013 и РРС40), радиометров Unidos Weblin и IBA Dose 1, а также контрольной плоскопараллельной камеры и нейтронного монитора. Камеры перемещали в водном фантоме с помощью высокоточной системы позиционирования; измеренные значения нормировали на данные мониторинга детекторов с учётом поправок на температуру и давление. Глубинное распределение дозы в фантоме перед пересадкой животных в кессон контролировали радиохромной плёночной дозиметрией.

Динамику роста опухоли оценивали каждые 2–3 сутки в течение 25 дней после

облучения. Линейные размеры опухолевого узла измеряли штангенциркулем, объём рассчитывали по классической формуле объёма эллипсоида вращения. Для расчёта индекса торможения роста опухоли (ТРО) использовали исторические данные необлучённого контроля.

Для оценки достоверности величин поглощённых доз и оценок линейной передачи энергии (ЛПЭ) использовали средство Монте-Карло моделирования общего назначения Geant4 версии, актуальной к моменту проведения экспериментальных исследований (начиная с 10.3.0 по 10.5.1). Геометрия модели представляла собой водный фантом толщиной 30 см (плотность 1 г/см³) без учёта животного; «мишенью» служил тонкий (100 мкм) водный слой, расположенный в центре формируемого пика Брэгга. В качестве списка библиотек физических взаимодействий использовали несколько различных подходов, из которых наилучшее соответствие измеренным экспериментальным данным показали готовые списки QGSP_BIC_EMY, а также QGSP_INCLXX, объединённая с моделью отдалённого каскада PreCompound и электромагнитной моделью G4EmStandardPhysics_option3. Источником излучения в модели служил пучок C¹² с энергией, подбираемой согласно остаточному пробегу на основании экспериментальных данных. Для накопления статистики генерировали от 10⁷ до 10⁹ историй. Величина ЛПЭ в задаче оценивалась как среднедозное ЛПЭ, получаемое путём деления суммы квадратов накопленных доз в слое, отнесённых к длине шага частицы в слое на сумму накопленных доз.

Анатомические данные для создания воксельной модели крысы проспективного назначения получали на базе сканов компьютерной томографии, выполненной с разрешением 0,2×0,2×0,2 мм на томографе MiLabs VECTOR 6 (Нидерланды). DICOM-файлы предварительно обрабатывались с помощью собственного программного кода для языка Python с использованием библиотеки pydicom, numpy и scikit-image. В состав проводимых операций входит коррекция геометрии и рескейлинг изображения до заданного размера вокселя (от 0,5 до 2 мм для полного тела крысы в зависимости от назначения модели).

Автоматизированная вокселизация для дальнейшего чтения средством Монте-Карло моделирования выполнялась с использованием собственного разработанного модуля, использующего сообщения в формате Protobuf (Google), и скриптов, организующих перебор байтовых массивов и присвоение каждому вокселю материала и плотности на основании преобразования шкалы Хаунсфилда исходного DICOM-изображения.

Полученные результаты.

Верификация физико-дозиметрической части эксперимента показала хорошее согласование расчётных и экспериментальных данных. Радиохромная плёночная дозиметрия продемонстрировала точное положение модифицированного пика Брэгга в водном фантоме, с отклонением не более долей миллиметра. Внедрение автоматизированного средства записи показаний дозиметров позволило сократить время обработки данных и нивелировать субъективные ошибки ручных замеров. Трёхмерная реконструкция поглощённой дозы на основе сканированных плёнок подтвердила однородность распределения дозы в пределах целевой зоны и выявила минимальные градиенты у краёв поля облучения.

После однократного облучения наблюдалась типовая [5] бифазная кривая: незначительный рост объёма опухоли до 3-х суток, выравнивание на 6–7-й день и последующее сокращение объёма к 12-му дню. Сравнение кривых торможения роста опухоли показало высокую воспроизводимость радиобиологического эффекта между сеансами облучения в модифицированном и немодифицированном пиках Брэгга, что свидетельствует о стабильности параметров пучка и воспроизводимости экспериментальных условий.

На основании пересчитанных значений поглощённой дозы и наблюдаемой динамики опухоли выполнена оценка относительной биологической эффективности (ОБЭ)

как функции ЛПЭ. Полученная зависимость оказалась монотонно возрастающей, что соответствует классической картине повышения эффективности тяжёлых ионов при росте ЛПЭ, однако широкие интервалы неопределённости не позволяют окончательно судить о форме кривой нелинейного отклика.

Применённый алгоритм автоматической обработки КТ-срезов позволил получить трёхмерную воксельную модель лабораторной крысы с разрешением от 0,5 до 2 мм по всем осям, обеспечив высокую точность воспроизведения анатомии при приемлемой производительности расчёта. В модели сегментированы основные ткани (критические органы и опухолевая масса) и костные структуры, материал и плотность каждого вокселя назначались на основе преобразования чисел Хаунсфилда. После экспорта в *protobuf*-структуры для последующего импорта в *Geant4* модель была верифицирована на целостность и соответствие исходным данным КТ.

Выводы.

В данной работе продемонстрирована эффективность комплексного подхода, объединяющего физико-дозиметрическое экспериментальное исследование на животной модели и высокоточное *in silico* моделирование в среде *Geant4*. Верификация модифицированного пика Брэгга при помощи радиохромной плёночной дозиметрии показала хорошее согласование расчётных и экспериментальных данных с погрешностью менее долей миллиметра. Автоматизированный инструмент сбора и обработки показаний дозиметров позволил не только существенно снизить трудоёмкость эксперимента, но и свести к минимуму субъективные ошибки ручных измерений.

Биологическая часть эксперимента, включающая наблюдение динамики роста саркомы М-1 у лабораторных крыс, подтвердила классическую бифазную реакцию опухоли на однократное облучение: этап первоначального незначительного увеличения объёма до 3-х суток, стабилизация к 6–7-му дню и последующее сокращение объёма к 12-му дню. Сравнение кривых торможения роста опухоли при облучении в модифицированном и немодифицированном пиках Брэгга выявило высокую воспроизводимость радиобиологического эффекта между сеансами, что свидетельствует о стабильности параметров пучка и надёжности экспериментальных условий.

Расчётно-экспериментальная оценка зависимости относительной биологической эффективности (ОБЭ) от линейной передачи энергии (ЛПЭ) продемонстрировала монотонно возрастающий тренд, соответствующий классическим представлениям о повышении эффективности тяжёлых ионов при увеличении ЛПЭ. Широкие интервалы неопределённости, однако, не позволяют окончательно уточнить форму нелинейного отклика, что указывает на необходимость дальнейших исследований с более плотным набором точек и снижением статистических погрешностей. Подобная проблема остро ощущается и в смежных задачах [6], поэтому очень важно проводить комплексные натурные и модельные эксперименты.

Существенным вкладом работы стала разработка и апробация полностью автоматизированного конвейера преобразования КТ-изображений в трёхмерную воксельную модель лабораторной крысы с разрешением 2 мм по всем осям. Модель обеспечила точное воспроизведение анатомических структур и автоматическое назначение материалов и плотностей по числам Хаунсфилда. Экспорт в *protobuf*-формат позволил бесшовно интегрировать модель в среду *Geant4*, а её проверка на целостность и соответствие исходным данным КТ подтвердила пригодность для высокопроизводительных расчётов дозовых полей.

Полученные результаты подтверждают работоспособность предложенного программно-вычислительного комплекса и закладывают основу для дальнейшего применения воксельной модели лабораторной крысы при планировании доклинических экспериментов [7, 8, 9] и оптимизации протоколов ионной терапии. В перспективе расширение разрешения модели и внедрение радиобиологических алгоритмов (ЛК-модель, учёт клеточной пролиферации и гибели) позволят всесторонне оценивать не только

физическое, но и биологическое действие облучения, приближая результаты расчётов к клиническим реалиям.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: разработан полностью автоматизированный конвейер преобразования КТ-изображений в трёхмерную воксельную модель лабораторной крысы с динамическим разрешением, включающий сегментацию тканей и автоматическое назначение материалов и плотностей по числам Хаунсфилда для непосредственного использования в Geant4; предложена методика бесшовной интеграции этой модели в расчётную среду Geant4, позволяющая существенно сократить время подготовки многопоточных симуляций и гарантировать корректность геометрии и состава тканей; выполнена комплексная физико-дозиметрическая верификация модифицированного пика Брэгга ионов углерода на установке ВРБС У-70 с применением радиохромной плёночной дозиметрии и автоматизированного сбора показаний, подтвердившая согласование расчётных и экспериментальных данных с долями миллиметра; впервые проведена совместная оценка *in silico* и *in vivo* на единой платформе, включающая получение трёхмерных распределений поглощённой дозы и спектральных характеристик ЛПЭ в геометрии облучения и их сопоставление с наблюдаемой динамикой роста опухолевой линии саркомы М-1, что дало возможность апостериорно оценить зависимость относительной биологической эффективности от ЛПЭ; а также внедрён алгоритм автоматизированной обработки экспериментальных данных — от распознавания показаний дозиметров до построения кривых роста опухоли — позволивший сократить субъективные погрешности и ускорить аналитический цикл. Полученные результаты создают надёжную методическую основу для дальнейшего совершенствования доклинического планирования ионной терапии, в том числе за счёт интеграции радиобиологических моделей клеточной гибели и пролиферации непосредственно в расчётную схему.

Литература.

1. Соловьев А.Н., Гулидов И.А., Солдатов А.П., Шегай П.В., Иванов С.А., Сергунова К.А., Каприн А.Д. Сравнительный анализ методов пассивного и активного формирования поля в лучевой терапии ионами углерода // *Российские нанотехнологии*. 2023. Т. 18. № 4. С. 528-532
2. Antipov Yu.M., Vasilyeva A.G., Vasiliev D.A., Kalinin V.A., Koshelev A.V., Makonin S.V., Maximov A.V., Parmenova E.V., Pikalov V.A., Polkovnikov M.K., Soldatov A.P., Koryakina E.V., Koryakin S.N., Saburov V.O., Solovev A.N., Troshina M.V., Perevezentsev A.A., Shtemberg A.S., Sirota N.P., Smirnova E.N., Rozanova O.M., Belyakova T.A. Status of the experimental setup Radiobiological Stand (RBS) on a beam of carbon nuclei extracted from the U-70 accelerator complex // *Instruments and Experimental Techniques*. 2024. V. 67. S2. P. S300-S304
3. Соловьев А.Н., Чернуха А.Е., Трошина М.В., Лычагин А.А., Пикалов В.А., Харлов В.И., Ульяненко С.Е. Разработка средств пассивной модификации пучка ионов углерода ускорительного комплекса У-70 для радиобиологических исследований // *Медицинская физика*. 2016. Т. 72. № 4. С. 47-54
4. Solovev A.N., Troshina M.V., Pikalov V.A., Saburov V.O., Chernukha A.E., Moiseev A.A., Koryakina E.V., Potetnya V.I., Koryakin S.N., Soldatov A.P., Kaprin A.D. In vitro modified microdosimetric kinetic model-based predictions for B14-150 cell survival in a 450 MeV/u carbon-ion beam with an aluminum ridge filter for a biologically optimized spread-out Bragg peak // *Biomedical Physics & Engineering Express*. 2022. V. 8. No. 3. P. 035030.
5. Южаков В.В., Корчагина К.С., Фомина Н.К., Корякин С.Н., Соловьев А.Н., Ингель И.Э., Корецкая А.Е., Севаньяева Л.Е., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г. Действие G-излучения и сканирующего пучка протонов на морфофункциональные характеристики саркомы М-1 у крыс // *Радиация и Риск (Бюллетень Национального Радиационно-Эпидемиологического Регистра)*. 2020. Т. 29. №. 2. С. 101-114

6. Бутенко А.В., Сыресин Е.М., Тютюнников С.И., Батяев В.Ф., Кулевой Т.В., Павлов К.В., Рогов В.И., Титаренко А.Ю., Титаренко Ю.Е., Берлянд А.В., Берлянд В.А., Соболевский Н.М., Бобровский Д.В., Чумаков А.И., Сабуров В.О., Соловьев А.Н., Пешич М.П. Анализ проблем метрологического обеспечения испытательного стенда для проведения испытаний радиоэлектронных изделий на стойкость к воздействию тяжёлых ионов высокой энергии // Письма в журнал Физика элементарных частиц и атомного ядра. 2019. Т. 16. № 6 (225). С. 522-534
7. Бекетов Е.Е., Исаева Е.В., Трошина М.В., Лычагин А.А., Соловьев А.Н., Корякин С.Н., Ульяненко С.Е., Малахов Е.П., Ульяненко Л.Н., Костин М.Ю., Пикалов В.А., Антипов Ю.М., Солдатов А.П. Результаты предварительных исследований биологической эффективности пучка ионов углерода ускорителя У-70 // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 5. С. 462-470
8. Troshina M.V., Koryakina E.V., Potetnya V.I., Solovov A.N., Saburov V.O., Ly-chagin A.A., Ivanov S.A., Kaprin A.D., Koryakin S.N. Biological response of Chinese hamster B14-150 cells to sequential combined exposure to protons and ¹²C ions // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2023. V. 176. P. 38–41.
9. Matchuk O.N., Selivanova E.I., Yakimova A.O., Saburov V.O., Solovov A.N., Troshina M.V., Litun E.V., Koryakin S.N., Pikalov V.A., Abramova M.R., Ivanov S.A., Zamulaeva I.A. Effects of combined exposure to carbon ions and protons on the pool of MCF-7 breast-cancer stem cells in vitro // Oncology. 2023. V. 176. P. 82–86.

Сведения об авторах

Яна Владимировна Кизилова

научный сотрудник лаборатории медицинской радиационной физики
МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал
ФГБУ «НМИЦ радиологии» Мин-
здрава России

Обнинск, Россия

Эл. почта: cobaltcorsair@yandex.ru

Алексей Николаевич Соловьев

к.ф.-м.н., заведующий лабораторией
медицинской радиационной физики
МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал
ФГБУ «НМИЦ радиологии» Мин-
здрава России

Обнинск, Россия

Эл. почта: salonf@mrrc.obninsk.ru

Сергей Николаевич Корякин

к.б.н., заведующий отделом радиационной биофизики
МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал
ФГБУ «НМИЦ радиологии» Мин-
здрава России

Обнинск, Россия

Эл. почта: korsernic@mail.ru

Information about author

Yana Vladimirovna Kizilova

Researcher,

The A. Tsyb Medical Radiological Research Centre (MRRC) – the
branch of the FSBI “National Medical Research Radiological
Centre” (NMRRC) of the Ministry of Health of the Russian Fed-
eration

Obninsk, Russian Federation

E-mail: cobaltcorsair@yandex.ru

Aleksei Nikolaevich Solovov

PhD (PhD (Math), Head of the Laboratory of Medical Radiation
Physics,

The A. Tsyb Medical Radiological Research Centre (MRRC) – the
branch of the FSBI “National Medical Research Radiological
Centre” (NMRRC) of the Ministry of Health of the Russian Fed-
eration

Obninsk, Russian Federation

E-mail: salonf@mrrc.obninsk.ru

Sergey Nikolaevich Koryakin

Ph.D. (Biological), Head of the Department of Radiation Bio-
physics,

The A. Tsyb Medical Radiological Research Centre (MRRC) – the
branch of the FSBI “National Medical Research Radiological
Centre” (NMRRC) of the Ministry of Health of the Russian Fed-
eration

Obninsk, Russian Federation

E-mail: korsernic@mail.ru

УДК 612.118.221.2:616.071

ГРНТИ 760 000

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.219-221

**И.А. Куликова¹, Т.И. Мурашкина², Е.Ю. Плотникова³,
Ю.Ю. Васильев³**

¹Кубанский государственный медицинский университет,
г. Краснодар

²Пензенский государственный университет, г. Пенза

³ГБУЗ Родильный дом г.Краснодар МЗ КК

НОВАТОРСКАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ

Предлагается новый метод определения группы крови, отличающийся от традиционных методик. Статья описывает этапы получения стандартных реагентов (изогемагглютинирующие сыворотки, эритроциты, моноклональные антитела) и представляет инновационный подход, основанный на измерении коэффициента преломления с использованием волоконно-оптического рефрактометрического преобразователя.

Ключевые слова: группа крови, коэффициент преломления, волоконно-оптический рефрактометр

UDC 612.118.221.2:616.071

GRNTI 760 000

**I.A. Kulikova¹, T.I. Murashkina², E.Y. Plotnikova³,
Yu. Vasiliev³**

¹Kuban State Medical University, Krasnodar

²Penza State University, Penza

³GBUZ Maternity hospital Krasnodar MH KK

AN INNOVATIVE METHOD FOR DETERMINING BLOOD GROUP AFFILIATION

A new method for determining blood type is proposed, which differs from traditional methods. The article describes the stages of obtaining standard reagents (isohemagglutinating sera, erythrocytes, monoclonal antibodies) and presents an innovative approach based on measuring the refractive index using a fiber-optic refractometric transducer.

Keywords: blood type, refractive index, fiber optic refractometer

Введение.

Несовместимость групп крови обусловлена гемолизом эритроцитов, вызванным их агглютинацией. Этот процесс, основанный на взаимодействии агглютиногенов (А, В) на поверхности эритроцитов и агглютининов (α , β) в плазме, лежит в основе существующих методов определения групп крови системы АВ0 [1]. Однако, данный подход не является, по-нашему мнению, совершенным.

Цель работы.

Предлагается разработка портативного волоконно-оптического рефрактометра для определения групп крови, как альтернатива традиционным методам. Авторы считают, что внедрение такого устройства значительно улучшит практику диагностики группы крови.

Материалы и методы.

Данное исследование основано на анализе нормативных документов Министерства здравоохранения РФ [2], регламентирующих определение групп крови системы АВ0, и на оригинальных экспериментальных данных по измерению показателя преломления различных сред с помощью волоконно-оптического метода [3].

Полученные результаты.

Определение группы крови в настоящее время осуществляется тремя основными методами: прямым (с использованием стандартных изогемагглютинирующих сывороток), перекрестным (с использованием сывороток и стандартных эритроцитов) и методом моноклональных антител (доликлоны анти-А и анти-В) [2].

Прямой метод определения группы крови, использующий стандартные изогемагглютинирующие сыворотки, основан на выявлении агглютиногенов в образце крови.

Однако, производство этих сывороток — сложный и длительный процесс, требующий значительных ресурсов и специального оборудования. Сыворотки получают из плазмы крови (или других биологических жидкостей, например, плеврального транссудата или асцитической жидкости), очищенной от фибриногена, но содержащей агглютинины. Качество исходного материала (донорская кровь, плазма и т.д.) критично для получения сывороток с достаточным титром групповых антител. Производство стандартных изогемагглютинирующих сывороток — многоэтапный процесс, включающий плазмаферез, серологический контроль качества плазмы, консервацию (борная кислота или азид натрия), два этапа контроля качества, фильтрацию, окрашивание (специально утвержденными красителями) и, наконец, паспортизацию готового продукта. Срок годности сыворотки составляет 6 месяцев при хранении при температуре 4-8°C. К сывороткам предъявляются жесткие требования, касающиеся как физико-химических свойств, так и условий хранения и применения. Пригодность изогемагглютинирующих сывороток определяется соответствием группового и титровального состава маркировки, быстрым началом агглютинации (в течение 30 секунд), отсутствием гемолиза эритроцитов, прозрачностью и специфическим цветом (светло-голубой, красный или желтый в зависимости от группы). Процедура определения группы крови проводится при температуре 15-25°C, с ожиданием результатов в течение 5 минут.

Перекрестный метод определения группы крови использует одновременно стандартные сыворотки и эритроциты, позволяя определить как агглютиногены, так и агглютинины. Однако, этот метод сложнее прямого, требует больше ресурсов и характеризуется коротким сроком годности стандартных эритроцитов (2-3 дня при хранении при 4-8°C). Кроме того, необходимость центрифугирования или длительного ожидания разделения крови на сыворотку и эритроциты может быть затруднена в условиях ограниченного времени или неблагоприятной внешней среды.

Третий метод определения группы крови использует моноклональные антитела (цоликлоны анти-А и анти-В), полученные с помощью гибридомной технологии. Эти реагенты, как и другие используемые в классических методах, имеют ограниченный срок годности (два года при 2-8°C).

Выводы.

В настоящем исследовании показано, что существующие методы определения группы крови сложны, трудоемки, ресурсозатратны и требуют специального оборудования. Таким образом, определение группы крови может быть подвержено ошибкам, связанным с температурным режимом (ложная агглютинация при низких температурах, замедленная или слабо выраженная реакция при высоких температурах), неправильным соотношением реагентов (недостаток агглютининов при недостаточном количестве сыворотки или цоликлонов), использованием просроченных или неправильно хранившихся реагентов. Следует учитывать, что агглютиногены А и В у плода формируются в течение 2-3 месяцев, а агглютинины α и β — после рождения. Погрешности в определении группы крови могут быть вызваны неправильным расположением реагентов, использованием загрязненного оборудования (пипетки, пластинки), а также некачественными реагентами (например, высохшей или загрязненной сывороткой). Все эти факторы могут привести к ложноположительным результатам.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: предлагаемый портативный волоконно-оптический рефрактометр преодолевает эти ограничения, обеспечивая высокую точность измерений в широком диапазоне условий окружающей среды и не требуя специальных условий хранения. Это особенно актуально для регионов с ограниченным доступом к современным технологиям. Этот прибор, не использующий биологические материалы, обеспечит значительно больший срок службы по сравнению с существующими реагентами, ограниченный лишь износом его компонентов. Разрабатываемый портативный рефрактометр характеризуется

высокой точностью измерений, простой конструкцией и компактными размерами [3].

Литература.

1. Идентификация групповых антигенов эритроцитов по системам ABO, RH и KEL серологическими тестами и методами генотипирования / А. А. Чумак, В. В. Белякова, О. А. Майорова [и др.]. // Гематология и трансфузиология. – 2021. – Т. 66, № 1. – С. 37-53. – DOI 10.35754/0234-5730-2021-66-1-37-53. – Текст : непосредственный.
2. Министерство здравоохранения Российской Федерации : официальный сайт. – Москва. – Обновляется в течение суток. – URL: <https://minzdrav.gov.ru/> (дата обращения: 02.02.2025). – Текст : электронный.
3. Патент № 2796797 С2 Российская Федерация, МПК G01N 21/43, G01B 11/00. Волоконно-оптический способ определения коэффициента преломления прозрачного вещества и реализующий его волоконно-оптический рефрактометрический измерительный преобразователь : № 2021130405 : заявл. 18.10.2021 : опубл. 29.05.2023 / Е. А. Бадеева, В. А. Бадеев, Т. И. Мурашкина [и др.]. – Текст : непосредственный.

Сведения об авторах

Куликова Ирина Александровна
студентка лечебного факультета
Кубанский государственный медицинский университет
Краснодар, Россия
Эл. почта: dockulikowa@yandex.ru

Мурашкина Татьяна Ивановна
д.т.н., профессор, профессор кафедры
«Приборостроение»
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия
Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Васильев Юрий Юрьевич
Врач анестезиолог-реаниматолог
ГБУЗ Родильный дом г.Краснодар МЗ КК,
Россия
Эл. почта: vasilyevyura@mail.ru

Плотникова Екатерина Юрьевна
Врач-неонатолог
ГБУЗ Родильный дом г.Краснодар МЗ КК,
Россия
Эл. почта: cat.roll@yandex.ru

Information about author

Kulikova Irina Aleksandrovna
student of the Faculty of Medicine Kuban State Medical University
Krasnodar, Russia
E-mail: dockulikowa@yandex.ru

Murashkina Tatiana Ivanovna
Doctor of Technical Sciences, Professor, Professor of the Department of "Instrument Engineering"
Penza State University
Penza, Russia
E-mail: timurashkina@mail.ru

Vasiliev, Yuri Yurievich
The anesthesiologist-resuscitator
GBUZ Maternity hospital Krasnodar, МОИ КК, Russia
E-mail: vasilyevyura@mail.ru
E-mail: vasilyevyura@mail.ru

Plotnikova Ekaterina Yurievna
Neonatologist
GBUZ Maternity hospital Krasnodar, МОИ КК, Russia
E-mail: cat.roll@yandex.ru

УДК 636.5.034
ГРНТИ 62.99
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.222-226

**Е.П. Исакова, Н.Н. Гесслер, О.И. Кляйн,
А.В. Розумий, Ю.И. Дерябина**
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
Е.А. Овсейчик, В.С. Лукашенко
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» (ФНЦ «ВНИТИП»)

ВЛИЯНИЕ КОРМОВЫХ ДОБАВОК С СОДЕРЖАНИЕМ ФИТАЗ ГРИБНОГО И БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ КРОССА «СМЕНА 9»

*Применение в качестве кормовой добавки инкапсулированной бактериальной фитазы на базе рекомбинантного продуцента дрожжей *Yarrowia lipolytica* pUV3 – Phy-OPP приводило к уменьшению уровня холестерина, глюкозы, фосфора и возрастанию уровня общего белка и соотношения Ca/P в сыворотке крови цыплят-бройлеров. В совокупности полученные нами данные свидетельствуют о положительном влиянии инкапсулированной фитазы на биохимическую картину крови цыплят-бройлеров и более эффективном усвоении в организме птиц кальция и фосфора из фитат-содержащих продуктов при внесении в корм инкапсулированной формы фитазы.*

Ключевые слова: слова: цыплята-бройлеры, фитаза, продуктивность, биохимические параметры крови.

E.P. Isakova, N.N. Gessler, O.I. Klein, A.V. Rozumiy, Yu.I. Deryabina
Federal State Institution "Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences" - FRC "Biotechnology RAS"
E.A. Ovseychik, V.S. Lukashenko
Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry Farming" – FNC "VNITIP"

INFLUENCE OF FEED SUPPLEMENTS CONTAINING PHYTASE OF FUNGAL AND BACTERIAL ORIGIN ON BIOCHEMICAL BLOOD FEATURES OF BROILER CHICKENS OF THE CROSS "SMENA 9"

*The application of encapsulated bacterial phytase based on the recombinant yeast producer of *Yarrowia lipolytica* pUV3 – Phy-OPP as a feed additive decreased cholesterol, glucose, phosphorus levels and raises the total protein and Ca/P ratio in the blood serum of broiler chickens. The data all together indicate a positive effect of microencapsulated phytase on the biochemical features of the broiler chickens' blood and a higher absorption of calcium and phosphorus from phytate-containing products in the body of birds upon applying the encapsulated phytase to the feed.*

Key words: broiler chickens, phytase, productivity, meat features, chemical composition of meat

Введение

В мясном птицеводстве ключевое значение имеет производство мяса цыплят-бройлеров, так как в общем мировом производстве оно занимает более 80 %. Мясо цыплят-бройлеров обладает высокими биологическими и вкусовыми качествами, имеет относительно невысокую цену, что обеспечивает повышенный спрос на эту продукцию у покупателей [1]. По объемам производства мяса птицы наша страна занимает четвертое место в мире, при этом основной объем производства приходится на долю цыплят-бройлеров [2]. Учитывая, что в последние годы все большее значение имеют вопросы повышения

продуктивности цыплят-бройлеров, необходимо, наряду с использованием новых перспективных кроссов птицы, уделять должное внимание и новым способам их содержания и кормления, которые позволяют обеспечить высокое качество продукции [3]. Одним из таких способов в области питания птицы является поиск новых кормовых добавок на основе фитазы, способствующих повышению эффективности использования корма птицей. В последние годы в птицеводстве все чаще стали применять в питании птицы рационы без наличия животных кормов [4, 5]. Однако, в этом случае снижается количество доступного фосфора и возрастает содержание фитинового фосфора, который усваивается взрослой птицей на 50 %, молодняком – только на 30 % [6, 7]. Ввод в рационы микробных фитаз улучшает усвоение фосфата, образующегося из фитатного фосфора, а также снижает экскрецию фосфора в окружающую среду, предотвращая ее загрязнение фосфатами [8]. Добавки экзогенной фитазы также дают возможность снизить ввод в рационы неорганического фосфора без ухудшения продуктивности птицы [9, 10].

Цель работы.

В связи с вышеизложенным целью данной работы являлось проведение экспериментальных работ на цыплятах-бройлерах кросса «Смена 9» по использованию полученных кормовых добавок микроинкапсулированной фитазы на базе рекомбинантного продуцента – дрожжей *Yarrowia lipolytica* – в рационах птицы и исследование влияния этих добавок на биохимические параметры крови цыплят-бройлеров.

Материалы и методы.

Объектом исследования служили цыплята-бройлеры нового отечественного кросса «Смена 9». В качестве экспериментальной кормовой добавки использовали микроинкапсулированную фитазу из бактерий *Obesumbacterium proteus*, получаемую культивированием рекомбинантного продуцента *Y. lipolytica* pUV3 – Phy-OPP. В качестве контрольного препарата использовали препарат коммерческой фитазы из *Aspergillus ficuum* (Ладозим Прокси, Биопрепарат, Россия). В эксперименте использовали следующие группы животных:

- 1) Корм с содержанием общего фосфора 0,8% (0,45% доступного фосфора) без добавок;
- 2) Корм, дефицитный по фосфору, с содержанием общего фосфора 0,6% (0,35% доступного фосфора);
- 3) Корм с содержанием общего фосфора 0,6% (0,35% доступного фосфора) с добавкой микроинкапсулированной фитазы *O. proteus* в дозе 500 FYT/кг корма;
- 4) Корм с содержанием общего фосфора 0,8% (0,45% доступного фосфора) с добавкой микроинкапсулированной фитазы *O. proteus* в дозе 500 FYT/кг корма;
- 5) Корм с содержанием общего фосфора 0,8% (0,45% доступного фосфора) с добавкой деинкапсулированной фитазы *O. proteus* в дозе 4 500 FYT/кг корма;
- 6) Корм с содержанием общего фосфора 0,6% (0,35% доступного фосфора) с добавкой, содержащей искусственно внесенную коммерческую фитазу Ладозим прокси из *A. ficuum* (ООО Энзим, Украина) в дозе 4500 FYT/кг корма.

При выведении животных их эксперимента на 35 день были отобраны образцы крови и определены гематологические показатели. Параметры биохимии крови были определены на автоматическом гематологическом анализаторе URIT-3020 No 3020E01663 (URIT Medical Electronic Co., Ltd, КНР).

Полученные результаты.

Анализ результатов показал, что в группах, получающих полноценное количество фосфора, уровень аспартатаминотрансферазы снижался по отношению к контролю на 3% для фитазы *O. proteus* и увеличивался на 4% для фитазы Ладозим Прокси (Табл. 1). При этом общий белок возрастал на 4% при использовании фитазы *O. proteus*, в то время как для коммерческой фитазы – всего на 1,6% (Табл. 1). Содержание холестерина уменьшалось на 34% и 13%, соответственно, для фитаз бактериального и грибного происхождения. В случае использования дефицитного

уровня фосфора в качестве кормовой добавки Ладозим Прокси, соотношение Са/Р возрастало только на 10%. При введении в рацион полноценного количества фосфора и инкапсулированной фитазы *O. proteus* уровень глюкозы снижался на 10%, а соотношение Са/Р возрастало на 5% (Табл. 1). В то же время, в группе, получающей в составе корма инкапсулированную фитазу *O. proteus* и дефицитное количество фосфора, общий белок и соотношение Са/Р возрастали на 6% и 25%, соответственно, а уровень глюкозы снижался на 10% (Табл. 2). Уровень фосфора в крови при этом уменьшался на 23%, в то время как при применении коммерческой фитазы этот показатель снижался только на 16% (Табл. 2).

Таблица 1 Биохимические показатели крови цыплят-бройлеров, получающих корм с содержанием общего фосфора 0,8% (0,45% доступного фосфора), на 35 день эксперимента

Биохимические показатели	ед. измерения	1 группа	4 группа	5 группа
Билирубин общий	мкмоль/л	2,17 ± 0,22	1,97 ± 0,11	2,03 ± 0,04
Аспаратаминотрансфераза	Ед/л	349 ± 68	340 ± 44	364 ± 49
Аланинаминотрансфераза	Ед/л	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,4	1,7 ± 0,4
Коэффициент де Ритис	расчетный показатель	230,2 ± 43,0	160,0 ± 25,0	245,6 ± 46,6
Креатинин	мкмоль/л	24,7 ± 3,1	26,7 ± 1,8	25,7 ± 2,4
Общий белок	г/л	35,90 ± 3,87	37,20 ± 3,27	36,47 ± 1,91
Щелочная фосфатаза	Ед/л	2486 ± 485	2184 ± 783	1140 ± 56
Глюкоза	ммоль/л	16,5 ± 0,9	14,8 ± 0,8	15,9 ± 1,5
Холестерин	ммоль/л	4,10 ± 0,95	2,72 ± 0,30	3,56 ± 0,37
Фосфор	ммоль/л	2,18 ± 0,26	2,01 ± 0,07	1,98 ± 0,11
Кальций общий	ммоль/л	2,86 ± 0,11	2,80 ± 0,12	2,77 ± 0,12
Кислотность (pH)	ед. pH	7,44 ± 0,00	7,44 ± 0,00	7,45 ± 0,02
Соотношение Са/Р	ммоль/л	1,32 ± 0,10	1,39 ± 0,10	1,40 ± 0,04
Соотношение Na/K	ммоль/л	35,2 ± 8,7	37,6 ± 3,0	35,4 ± 1,8
Ионизированный кальций	ммоль/л	1,30 ± 0,11	1,34 ± 0,02	1,28 ± 0,06

Таблица 2 Биохимические показатели крови цыплят-бройлеров, получающих корм с содержанием общего фосфора 0,6% (0,35% доступного фосфора), на 35 день эксперимента

Биохимические показатели	ед. измерения	2 группа	3 группа	6 группа
Билирубин общий	мкмоль/л	2,00 ± 0,13	2,10 ± 0,13	1,90 ± 0,20
Аспарат аминотрансфераза	Ед/л	278 ± 8	350 ± 55	444 ± 6
Аланинаминотрансфераза	Ед/л	1,7 ± 0,4	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
Коэффициент де Ритис	расчетный показатель	190,6 ± 28,2	209,4 ± 20,9	207,7 ± 17,3
Креатинин	мкмоль/л	24,0 ± 2,0	23,3 ± 1,1	24,7 ± 1,8
Общий белок	г/л	32,80 ± 1,13	34,93 ± 4,58	36,30 ± 0,53
Щелочная фосфатаза	Ед/л	3877 ± 189	3768 ± 289	2959 ± 19
Глюкоза	ммоль/л	15,6 ± 1,6	14,0 ± 0,5	14,9 ± 0,4
Холестерин	ммоль/л	3,70 ± 0,23	3,72 ± 0,07	3,56 ± 0,15
Фосфор	ммоль/л	2,47 ± 0,29	1,89 ± 0,06	2,07 ± 0,16
Кальций общий	ммоль/л	2,85 ± 0,04	2,77 ± 0,07	2,65 ± 0,10
Кислотность (pH)	ед. pH	7,44 ± 0,00	7,43 ± 0,01	7,43 ± 0,00
Соотношение Са/Р	ммоль/л	1,17 ± 0,12	1,46 ± 0,04	1,30 ± 0,14
Соотношение Na/K	ммоль/л	34,3 ± 1,4	32,0 ± 0,8	37,4 ± 1,1
Ионизированный кальций	ммоль/л	1,20 ± 0,13	1,28 ± 0,11	1,21 ± 0,08

Выводы.

В совокупности полученные нами данные свидетельствуют о положительном влиянии инкапсулированной фитазы на биохимическую картину крови цыплят-бройлеров.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

- 1) Применение в качестве кормовой добавки инкапсулированной фитазы *O. proteus* на базе рекомбинантного продуцента *Y. lipolytica* pUV3 – Phy-OPP обеспечивает уменьшение уровня холестерина и глюкозы и возрастание уровня общего белка в сыворотке крови цыплят-бройлеров;
- 2) Использование в кормовых целях инкапсулированного фитазного препарата *O. proteus* приводит к уменьшению уровня фосфора в крови и увеличению соотношения Ca/P, что может отражать лучшее усвоение в организме птиц этих элементов из фитат-содержащих продуктов при внесении в корм фитазы.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 22-16-00093-П.

Литература.

1. Коцаев А.Г. Улучшение потребительской ценности продукции птицеводства // *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2013. № 4. С. 17-20.
2. Фисинин В.И. Уровень динамики развития мясного и яичного птицеводства России. *Результаты работы отрасли в 2022 году*. // *Птицеводство*. 2023. № 4. С. 4-8.
3. Лукашенко В.С., Овсейчик Е.А. Оценка продуктивности цыплят-бройлеров разных кроссов // *Птица и птицепродукты*. 2024. № 4. С. 14-17.
4. Егоров И.А., Шевяков А.Н., Егорова Т.В., Кожаринова Ю.С., Клейнерман Ю.Е. Применение рыбной муки в комбикормах для птицы // *Птицеводство*. 2020. № 1. С. 17 – 21.
5. Егоров И., Егорова Т., Шевяков А., Клейнерман Ю. Высококачественная рыбная мука в рационах цыплят-бройлеров // *Комбикорма*. 2021. № 1. С. 58 – 60.
6. Ленкова Т.Н., Егоров И.А., Егорова Т.А., Манукян В.А., Вертипрахов В.Г., Грозина А.А., Никонов И.Н. Как повысить усвояемость фосфора из комбикормов для цыплят-бройлеров // *Птица и птицепродукты*. 2019. № 1. С. 30 – 32.
7. Truong H.N., Moss A.F., Liu S.Y., Selle P.H. Pre-and post-pellet whole grain inclusions enhance feed conversion efficiency, energy utilisation and gut integrity in broiler chickens offered wheat-based diets // *Anim. Feed Sci. Technol.* 2017. V. 224. P. 115-123.
8. Jondreville C., Lescoat P., Magnin M., Feuerstein D., Gruenberg B., Nys Y. Sparing effect of microbial phytase on zinc supplementation in maize-soya-bean meal diets for chickens // *Animal*. 2007. V. 1. P. 804-811.
9. Frempong N. S., Nortey T. N. N., Paulk C., Stark C. R. Evaluating the Effect of replacing fish meal in broiler diets with either Soybean meal or poultry by-product Meal on Broiler Performance and total feed cost per kilogram of gain // *J. Appl. Poult. Res.* 2019 V. 28. P. 912–918.
10. Толоконцева Е.О., Половецкая О.С., Мельникова М.В. Определение массовой доли фосфора в комбикормах для кур несушек // *Modern Science*. 2020. №4-3. С.24-27.

Сведения об авторах

Елена Павловна Исакова,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» - ФИЦ «Биотехнологии РАН», Москва, Россия
Эл. почта: elen_iss@mail.ru

Information about author

Elena Pavlovna Isakova,

PhD in Biology, Senior Researcher, Federal State Institution "Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences" - FRC "Biotechnology RAS", Moscow, Russia
e-mail: elen_iss@mail.ru

Екатерина Александровна Овсейчик, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» - ФНЦ «ВНИТИП», Московская область, Сергиев Посад, Россия
Эл. почта: ovseychik@vnitip.ru

Наталья Николаевна Гесслер, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» - ФИЦ «Биотехнологии РАН», Москва, Россия
Эл. почта: gessler51@mail.ru;

Ольга Ивановна Кляйн, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» - ФИЦ «Биотехнологии РАН», Москва, Россия
Эл. почта: klein_olga@list.ru

Алена Владимировна Розумий, студент, младший научный сотрудник, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» - ФИЦ «Биотехнологии РАН», Москва, Россия
Эл. почта: rozumiy01@mail.ru

Юлия Ивановна Дерябина, кандидат биологических наук, зав. лабораторией, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» - ФИЦ «Биотехнологии РАН», Москва, Россия
Эл. почта: yul_der@mail.ru

Валерий Семенович Лукашенко, главный научный сотрудник, заведующий отделом, доктор сельскохозяйственных наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» - ФНЦ «ВНИТИП», Московская область, Сергиев Посад, Россия
Эл. почта: lukashenko@vnitip.ru

Ekaterina Aleksandrovna Ovseychik, PhD in Agricultural Sciences, Senior Researcher Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry Farming" - FNC "VNITIP", Moscow Region, Sergiev Posad, Russia
e-mail: ovseychik@vnitip.ru

Natalia Nikolaevna Gessler, PhD in Biology, Senior Researcher, Federal State Institution "Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences" - FRC "Biotechnology RAS", Moscow, Russia
e-mail: gessler51@mail.ru

Olga Ivanovna Klein, PhD in Biology, Senior Researcher, Federal State Institution "Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences" - FRC "Biotechnology RAS", Moscow, Russia
e-mail: klein_olga@list.ru

Alena Vladimirovna Rozumiy, student, junior research fellow, Federal State Institution "Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences" - FRC "Biotechnology RAS", Moscow, Russia
e-mail: rozumiy01@mail.ru

Yulia Ivanovna Deryabina, PhD in Biology, Head of Laboratory, Federal State Institution "Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences" - FRC "Biotechnology RAS", Moscow, Russia
e-mail: yul_der@mail.ru

Valery Semenovich Lukashenko, Chief Researcher, Head of Department, Doctor of Agricultural Sciences, Federal State Budgetary Scientific Institution Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry Farming" - FNC "VNITIP", Moscow Region, Sergiev Posad, Russia
e-mail: lukashenko@vnitip.ru

УДК 597.28:577.245.2

ГРНТИ 62.99

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.227-233

А.В. Кузнецов^{1,2,3}, С.А. Царин^{1,3}, Ю.В. Самотой¹,

С.А. Кирпиченко², Д.В. Метелева³, С.Н. Пасин³

¹Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
РАН

²Севастопольский государственный университет

³Центр дополнительного образования
"Малая академия наук", Севастополь

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА ЛОСОСЕВЫХ РЫБ ИЗ КОНСЕРВОВ

Проведена генетическая экспертиза консервов горбуши, кеты и нерки методом ПЦР-РВ. Сравнивали два метода выделения ДНК: с протеиназой K и щелочным лизисом. Выделенная митохондриальная ДНК была проанализирована методом ПЦР-РВ. Эффективность анализа ДНК зависит от размера пробы и её репрезентативности. В образце нерки обнаружена ДНК горбуши, указывая на возможную замену.

Ключевые слова: лососевые рыбы, митохондриальная ДНК, ПЦР-РВ, биотехнология.

**A.V. Kuznetsov^{1,2,3}, S.A. Tsarin^{1,3}, Yu.V. Samotoy¹, S.A. Kirpichenko²,
D.V. Metelyova³, S.N. Pasein³**

¹A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, RAS

²Sevastopol State University

³Center for Additional Education, Small Academy of Sciences, Sevastopol

GENETIC EXPERTISE OF CANNED SALMON FISH

*A genetic examination of canned pink (*Oncorhynchus gorbuscha*), chum (*Oncorhynchus keta*), and sockeye (*Oncorhynchus nerka*) salmon was conducted using real-time PCR. Two DNA extraction methods were compared: proteinase K digestion and alkaline lysis. The extracted mitochondrial DNA was analyzed using real-time PCR. The effectiveness of DNA analysis depends on the sample size and its representativeness. DNA of chum salmon was detected in a sample labeled as sockeye salmon, indicating a possible substitution.*

Keywords: salmonid fishes, mitochondrial DNA, real-time PCR, biotechnology.

Введение.

Представители семейства лососевых рыб (Salmonidae) служат важным пищевым продуктом человека, а красная икра является деликатесным продуктом. В мясе этих рыб содержится большое количество полиненасыщенных жирных кислот. Употребление лососевых в пищу помогает снизить риск возникновения депрессий и способствует улучшению зрения [1]. Лососевые рыбы являются важным объектом промысла и рыбоводства, а в Норвегии рыбы этого семейства составляют основу аквакультуры [1-3]. Самый массовый вид лососевых – это горбуша (*Oncorhynchus gorbuscha*), при этом две трети улова данной рыбы приходится на Россию. Кета (*Oncorhynchus keta*) занимает второе место по запасам среди представителей семейства. Также велики запасы нерки (*Oncorhynchus nerka*), а в отдельные годы её добыча в России может превосходить вылов кеты [5]. Для рационального использования водных биологических ресурсов, где важное место занимают лососевые рыбы, возрастающую роль приобретают молекулярно-генетические исследования. Молекулярно-генетическая экспертиза может быть полезна и при анализе рыбных пищевых продуктов. Лучший материал для этого – замороженная рыба, или при спиртовой фиксации.

При работе с ДНК критическим остаётся её выделение из сложных образцов, к которым относятся клетки с плотной инертной оболочкой [6], плохо сохранившиеся и частично разрушенные ткани [7], фиксированные формальдегидом образцы из музейных коллекций [8], микроскопически малые образцы в криминалистике [9, 10], археологическая ДНК [11] и ДНК из консервированных продуктов [12], в частности морепродуктов [13]. Выделение ДНК из консервированных продуктов может быть сложной задачей.

Процесс консервирования продуктов обычно включает в себя высокотемпературную стерилизацию, которая способна разрушить ДНК. Качество выделенной ДНК может оказаться неподходящим для анализа из-за сильной деградации. В большинстве анализов суммарной ДНК из эукариот, лучше сохраняется митохондриальная, чем геномная ДНК [14]. Этим обстоятельством объясняется наш выбор метода идентификации видов семейства лососевых рыб по маркерам митохондриальной ДНК.

Цель работы.

Целью нашего исследования было сравнить два стандартных метода выделения ДНК из животных тканей и адаптировать их к консервированным рыбным продуктам, а именно а) лизис в присутствии протеиназы К с очисткой на микроколонках и б) щелочной лизис с последующим центрифугированием. В работе определяли видовую принадлежность рыб: горбуша (*O.gorbuscha*), кета (*O.keta*) и нерка (*O.nerka*).

Материалы и методы.

В тесте использовали 5 баночек рыбных консервов, купленных в сети розничной торговли или через интернет на портале OZON: образец №1 – горбуша натуральная (производитель ИП Дунин Г.Е. РЫБОКОНСЕРВНЫЙ ЗАВОД № Е-90, 240 г., цена 200 Р), образец №2 – горбуша золотая (GoldFish, ИП Дунин Г.Е. РЫБОКОНСЕРВНЫЙ ЗАВОД № Е-90, 245 г., цена 230 Р), образец №3 – нерка (ООО «УСТЬКАМЧАТРЫБА», 227 г., цена 306 Р), образец №4 – рагу из рыбы сёмги, горбуши, кеты и нерки (ООО «УСТЬКАМЧАТРЫБА», 227 г., цена 851 Р) и образец №5 – лососевая икра Сахалинка имитированная (ООО «ТД Вкусное море», 140 г., цена 99 Р). Внешний вид баночек консервированных рыбопродуктов и внутренне содержимое представлены на Рис. 1.

Консервированную рыбу и икру просматривали в проходящем и отражённом свете под световым микроскопом Микромед МС4 Zoom LED с видеоокуляром Микромед Эврика 1.3 МР при увеличении до 50 раз и фотографировали.



Рис. 1. Внешний вид (вверху) и содержимое (внизу) баночек с рыбопродуктами, образец №1 – горбуша натуральная, образец №2 – горбуша золотая, образец №3 – нерка, образец №4 – рагу из лососевых видов рыб (сёмга, горбуша, кета, нерка) и образец №5 – красная икра

Для выделения общей ДНК методом лизиса в присутствии протеиназы К с дальнейшей очисткой на спинколонках использовали набор К-СОРБ-100 (Синтол, Россия), а для выделения ДНК методом щелочного лизиса с последующим центрифугированием применяли набор ПРОБА-ОПТИМА МАКС (ДНК-Технология, Россия). В первом случае для анализа брали 10 мг, во втором – 100 мг пробы. Старались захватить образцы из разных областей содержимого баночки, что было трудно сделать в первом случае и достаточно легко во втором. В обоих случаях консервированные образцы тщательно

механически перетирали в течение 10 мин в лизирующих буферах на льду.

Далее, первую часть образцов инкубировали с перемешиванием в присутствии протеинкиназы К в течение ночи при 56 °С. Последующее выделение ДНК на спинколонках осуществляли строго по протоколу, используя центрифугу СМ-50 (Elmi, Латвия). ДНК смывали с фильтров 40 мкл элюирующего буфера. Для ПЦР использовали 5 мкл элюата.

Во втором случае щелочной гидролиз проводили в 200 мкл лизирующего буфера при 90 °С в течение 40 мин. Осаждение осуществляли на центрифуге Microspin 12 (Biosan, Латвия) в режиме 16000 об/мин, 10 мин. Отбирали по 100 мкл супернатанта и нейтрализовали pH. Для ПЦР-анализа использовали по 5 мкл каждой пробы.

Для обнаружения ДНК рыб семейства лососевых и дифференцировки видов: горбуши (*O. gorbuscha*), кеты (*O. keta*) и нерки (*O. nerka*) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦП-РВ) пользовались набором реактивов Ident RT multiplex ID-209 компании Синтол (Россия). Этот набор реагентов предназначен для анализа многокомпонентных смесей. В основе метода лежит технология TaqMan [15] и изменение сигналов флуоресценции в ходе реакции по 4 каналам: FAM для специфического участка ДНК горбуши *O.gorbuscha*, HEX – для кеты *O. keta*, ROX – для нерки *O. nerka* и Cy5 – для всех рыб (Pisces). Реакцию амплификации проводили в объёме 25 мкл в термоциклере реального времени DTLite 4S1 (ДНК-Технология, Россия) по следующей программе: предварительный прогрев – 95 °С в течение 5 мин, а затем 40 циклов денатурации при 95 °С, 15 сек и отжига с элонгацией при 60 °С, 40 сек. Работа выполнена в рамках тем Госзадания ФИЦ ИнБЮМ «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (Регистрационный номер: 124022400152-1) и «Биоразнообразие как основа устойчивого функционирования морских экосистем, критерии и научные принципы его сохранения» (Регистрационный номер: 124022400148-4).

Полученные результаты.

Результат проведения цветной реакции амплификации по 4 каналам FAM – ДНК горбуши *O. gorbuscha*, HEX – кета *O. keta*, ROX – нерка *O. nerka* и Cy5 – всех рыб (Pisces) представлен на Рис. 2.

Результаты в отрицательном контроле (К-) корректны – флуоресценция для каналов FAM (ДНК горбуши), HEX (ДНК кеты) и ROX (ДНК нерки) отсутствует, а в канале Cy5 для всех рыб (Pisces) значение показателя Ср равно 36,7 (Рис. 2). Положительный контроль (К+) также корректен, где для горбуши Ср=26,6, для кеты Ср=25,5, для нерки Ср=26,0, а для общей рыбы Ср=21,3. В целом, первый метод выделения ДНК показал надёжные результаты – во всех пробах обнаружена общая ДНК рыб. К нашему удивлению, в образце №3 вместо нерки оказалась горбуша, о чём свидетельствуют оба метода выделения ДНК. Визуально (Рис. 3а) и на вкус это также была не нерка, а возможно, горбуша. Кроме того, бумажная этикетка тоже вызвала подозрения.

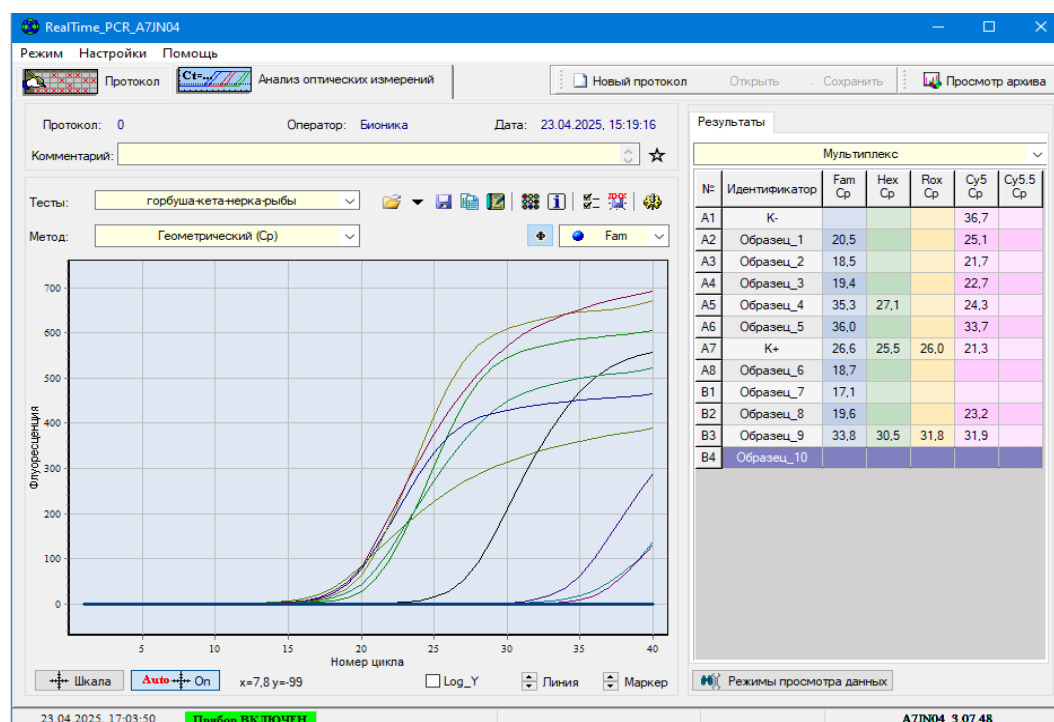


Рис. 2. Результат ПЦР-РВ для ДНК из консервированных рыбопродуктов, где проба A1 – отрицательный контроль (K-), проба A2 – образец №1 горбуша натуральная, проба A3 – образец №2 горбуша золотая, проба A4 – образец №3 нерка, проба A5 – образец №4 рагу из рыбы сёмги, горбуши, кеты и нерки, проба A6 – образец №5 красная икра, A7 – положительный контроль (K+), пробы A8, B1-4 – аналогичные образцы, но выделенные не с помощью протеиназы K, как в первом случае, а щелочным лизисом

С помощью второго метода выделения ДНК в образце №4 (рыбное рагу) идентифицированы все 3 вида заявленных производителем рыб, а именно горбуша, кета и нерка. В отличие от него, первый метод выделения и последующий анализ не обнаружили в пробе нерку, что вероятно объясняется малым размером исследуемого образца. При использовании первого метода выделения с применением протеиназы K в красной икре (образец №5) найдена ДНК горбуши. В отличие от этого, щелочной метод выделения ДНК из икры показал отрицательные результаты (Рис. 2, 36).

Следует заострить внимание на количественных показателях ПЦР-РВ. Начало амплификации ДНК-матрицы в позитивном контроле соответствует 20 циклу. Пробы №1-3, образующие пучок кривых, начали амплифицироваться с 15 цикла, что свидетельствует о большем количестве матрицы в этих пробах по сравнению с позитивным контролем. Однако пробы №4-5 стали амплифицироваться лишь с 30-35 цикла, свидетельствуя о следовых количествах искомой матрицы в них (Рис. 2). Суммарный выход ДНК по всем пробам был незначительно выше для щелочного метода по сравнению с колоночным. Примерное равенство значений Cp-показателей для горбуши и рыбы в пробах №1-3 указывает на отсутствие примесей других видов рыб.

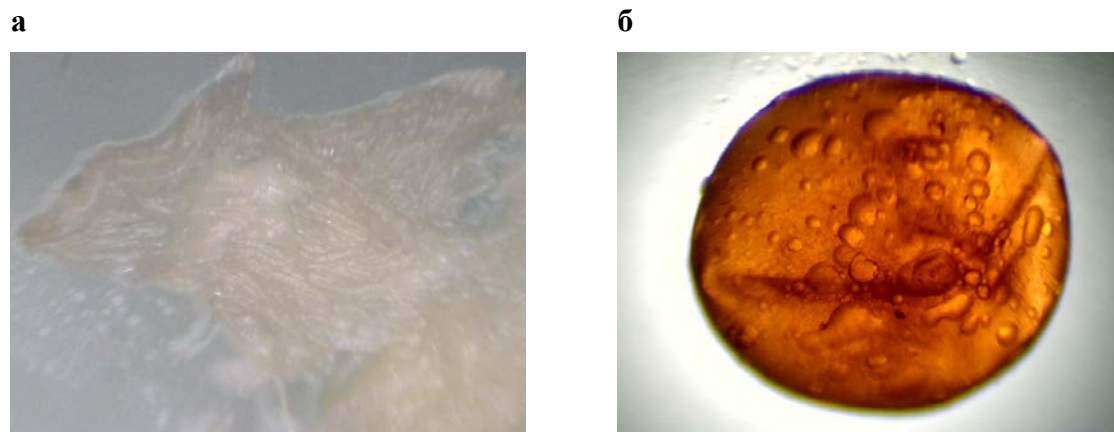


Рис. 3. Мышечные волокна из образца №3 (а) и желейные гранулы из образца №5 (б) под микроскопом

Выводы.

1. Митохондриальная ДНК рыб сохраняется в консервированных продуктах.
2. Оптимизированный нами протокол, включающий длительную инкубацию в лизирующем буфере в присутствии протеиназы К и элюцию с колонок при 80 °С в течение 3 мин, позволяет выделить и идентифицировать ДНК в консервированных рыбных продуктах.
3. Конечный результат может зависеть не от качества выделения ДНК, а от величины пробы, т.е. от репрезентативности выборки/образца.
4. Выделение ДНК из имитированной икры менее эффективно в сравнении с выделением из консервированных тканей рыб.
5. В образце №3 «нерка» обнаружена ДНК горбуши, что фактически соответствует замене нерки горбушей производителем или продавцом.
6. Визуальные и вкусовые характеристики образца №3 также не соответствуют нерке, а напоминают горбушу.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе в результате проведённой генетической экспертизы случайной выборки рыбных консервов методом ПЦР-РВ были получены новые интересные выводы, которые могут быть полезны для контроля качества продукции в пищевой промышленности. Митохондриальная ДНК рыб сохраняется в консервированных продуктах, что позволяет использовать её для идентификации видов. Однако эффективность выделения ДНК может зависеть от размера пробы и её репрезентативности. В случае образца №3, заявленного как нерка, была обнаружена видовая подмена на менее ценную горбушу. Это подчёркивает важность генетического контроля рыбных продуктов для обеспечения правильной маркировки и защиты прав потребителей. Дальнейшие исследования могут быть направлены на оптимизацию методов выделения ДНК из консервированных продуктов и разработку более эффективных протоколов для идентификации видов рыб.

Литература.

1. *Мировое производство рыбной продукции в 2018-2022 гг. М.: ВНИРО, 2024, 261 с.*
2. *Мировые уловы рыбы и нерыбных объектов промысла за 2018-2022 гг. М.: ВНИРО, 2024, 159 с.*
3. *Мировое производство аквакультуры в 2018-2022 гг. М.: ВНИРО, 285 с.*
4. *FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024. Blue Transformation in action. Rome, 2024. 232 pp. doi: 10.4060/cd0683en.*

5. *Статистические сведения по рыбной промышленности России*. М.: ВНИРО, 2024. 84 с.
6. Nakano M. Spore-DNA localization and extraction efficiencies of *Bacillus subtilis* for accurate results in quantitative real-time polymerase chain reaction // *J Microorg Control*. 2024. No. 29 (1). P. 9-15. doi: 10.4265/jmc.29.1_9.
7. Powell J.R., Blyton M., Oberle B., Powell G.L., Rigg J., Young D., Zanne A.E. Extraction and Purification of DNA from Wood at Various Stages of Decay for Metabarcoding of Wood-Associated Fungi // *Methods Mol Biol*. 2021. No. 2232. P. 113-122. doi: 10.1007/978-1-0716-1040-4_10.
8. Campos P.F., Gilbert T.M. DNA extraction from formalin-fixed material // *Methods Mol Biol*. 2012. No. 840. P. 81-5. doi: 10.1007/978-1-61779-516-9_11.
9. Sweet D., Lorente M., Valenzuela A., Lorente J.A., Alvarez J.C. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method // *Forensic Sci Int*. 1996. No. 83 (3). P. 167-77. doi: 10.1016/s0379-0738(96)02034-8.
10. van Oorschot RAH, Szkuta B., Meakin G.E., Kokshoorn B., Goray M. DNA transfer in forensic science: A review // *Forensic Sci Int Genet*. 2019. No. 38. P. 140-166. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.10.014. Epub 2018 Oct 26. PMID: 30399535.
11. Rohland N., Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth // *Nat Protoc*. 2007. No. 2 (7). P. 1756-62. doi: 10.1038/nprot.2007.247.
12. Takabatake R., Noritake H., Noguchi A., Nakamura K., Kondo K., Akiyama H., Teshima R., Mano J., Kitta K. Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns // *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2013. No. 54 (4). P. 309-15. doi: 10.3358/shokueishi.54.309. PMID: 24025210.
13. Pecoraro C., Crobe V., Ferrari A., Piattoni F., Sandionigi A., Andrews A.J., Cariani A., Tinti F. Canning Processes Reduce the DNA-Based Traceability of Commercial Tropical Tunas // *Foods*. 2020. No. 9 (10). P. 1372. doi: 10.3390/foods9101372.
14. Brooks P.J., Malkin E.Z., De Michino S., Bratman S.V. Isolation of salivary cell-free DNA for cancer detection // *PLoS One*. 2023. No. 18 (5). P. e0285214. doi: 10.1371/journal.pone.0285214.
15. Navarro E., Serrano-Heras G., Castaño M.J., Solera J. Real-time PCR detection chemistry // *Clin Chim Acta*. 2015. No. 439. P. 231-50. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017.

Сведения об авторах**Андрей Вадимович Кузнецов**

доктор биол. наук, в.н.с.

Институт биологии южных морей им. А.О.

Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

Эл. почта: kuznet@ibss-ras.ru

Сергей Анатольевич Царин

к.б.н., с.н.с., ведущий научный сотрудник

Институт биологии южных морей имени

А.О. Ковалевского РАН (ФИЦ ИнБЮМ)

Севастополь, Россия

Эл. почта: 55tsarin11@ibss-ras.ru

Юлия Владимировна Самотой

ведущий инженер

Институт биологии южных морей имени

А.О. Ковалевского РАН (ФИЦ ИнБЮМ)

Севастополь, Россия

Эл. почта: samotoi@ibss.ru

Семён Алексеевич Кирпиченко

Студент первого курса бакалавриата

Институт перспективных исследований

СевГУ, Севастополь, Россия

Эл. почта: kirpichenkosemen@gmail.com

Дарья Вадимовна Метелева

Ученица 9 класса школы №45 имени В.И. Со-

колова, Севастополь, Россия

Information about author**Andrey Vadimovich Kuznetsov**

Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern

Seas, RAS, Sevastopol, Russia

E-mail: kuznet@ibss-ras.ru

Sergey Anatolievich Tsarin

PhD in Biology, Senior Scientist, Leading Re-

searcher, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of

the Southern Seas of RAS (IBSS)

Sevastopol, Russian Federation

E-mail: 55tsarin11@ibss-ras.ru

Yuliya Vladimirovna Samotoy

Senior Engineer

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern

Seas of RAS (IBSS)

Sevastopol, Russian Federation

E-mail: samotoi@ibss.ru

Semyon Alekseevich Kirpichenko

First year Bachelor's degree student

SevSU, Institute for Advanced Studies,

Sevastopol, Russia

E-mail: kirpichenkosemen@gmail.com

Darya Vadimovna Meteleva

Pupil of the 9th grade of V.I. Sokolov school No.

45, Sevastopol, Russia

Сергей Николаевич Пасеин

директор Малой Академии Наук, Алтай,
Севастополь, Россия
Эл. почта: sev_ctt@rambler.ru

Sergey Nikolaevich Pasein

Director of the Small Academy of Sciences, Altair,
Sevastopol, Russia
Эл. почта: sev_ctt@rambler.ru

УДК 574.5 + 669

ГРНТИ 34.35.33 + 53.31

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.233-239

Я.В. Саванина,

МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет.

ОРГАНИЗМЫ-ОБРАСТАТЕЛИ В ПЕРЕРАБОТКЕ ЛОМА КОРАБЕЛЬНОЙ СТАЛИ

В статье рассматривается возможность использования органического материала обрастателей, селящихся на корпусах затонувших кораблей, при переработке лома корабельной стали в качестве флюса для удаления примесей.

Ключевые слова: микроорганизмы, биопленки, Hydroidea, Polychaeta, Bryozoa, Mollusca, Crustacea, корабельная сталь, удаление примесей.

Y. V. Savanina

School of Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University

FOULING ORGANISMS IN THE PROCESSING OF SHIP STEEL SCRAP

The article discusses the possibility of using organic material from fouling organisms that settle on the hulls of sunken ships in the processing of scrap ship steel as a flux to remove impurities.

Keywords: microorganisms, biofilms, Hydroidea, Polychaeta, Bryozoa, Mollusca, Crustacea, ship steel, impurity removal.

Введение

Одним из проблемных вопросов морских и речных акваторий являются сотни судов и кораблей, покоящихся на дне морском. Суда могут перевозить загрязняющие вещества в виде топлива или груза, существует риск выброса этих загрязняющих веществ. Уровень риска зависит от того, насколько сильно загрязнено судно и насколько повреждён затонувший корабль. Кроме того, существует и риск загрязнения воды металлами, особенно железом. Корпуса кораблей, как и другие поверхности на дне очень быстро заселяются организмами, которые называют обрастателями.

Цель работы.

Проанализировать сообщества обрастателей с точки зрения влияния на токсикологическую обстановку, а также изучить возможность использования их органического материала для переработки корабельного металла.

Количество кораблей и судов различного назначения (от военных, торговых, рыболовецких до браконьерских) точно не известно - для Дальневосточного региона называют цифры от 1 до 1,5 тыс.. В заливе Петра Великого в Приморье затоплено более 130 судов — это около 1 млн тонн металла. Одним из способов решения этой проблемы является утилизация, включающая подъём, разделение на металлический лом и его переработку на металлургических предприятиях. Концентрации железа в морской воде обычно очень высоки, даже там, где нет затонувших судов. Так, вдоль побережья Приморского края широко распространены месторождения железа, кроме того, много ионов железа выносятся с речным стоком. Таким образом,

затонувшие суда являются лишь добавочным источником этого металла, к высоким концентрациям которого многие гидробионты адаптированы [1, 2].

Когда корабль тонет, на морском дне появляется инородная искусственная структура- убежище и место обитания для всевозможных морских организмов. Если судно весит 300 т, то ила и обрастателей там может находиться до 500–600 т. Под обрастанием обычно понимают население предметов (в первую очередь антропогенного происхождения), находящихся в воде. В морях и океанах можно встретить множество разнообразных твердых поверхностей - подводные скалы, рифы, камни, стволы деревьев. Люди сами помещают в моря корабли, трубопроводы, кабели и гидротехнические сооружения. Все эти разнообразные поверхности очень быстро заселяются микроорганизмами, растениями и животными, которых называют обрастателями. Общее число известных видов обрастателей в настоящее время значительно превосходит 2000. Анализ особенностей видового состава и экологии обрастателей показал, что четкой границы между ними и сообществом морского дна не существует.

Обрастания усиливают коррозию гидротехнических сооружений, снижают скорость судов и увеличивают потребление ими топлива, уменьшают ток воды в водоводах, увеличивают подвергающуюся действию волн поверхность свай, причалов и пр. Общий мировой ущерб от морских обрастаний составляет около 50 млрд. долларов в год. С другой стороны, многие организмы прибрежного обрастания являются сырьем для промышленности, пищей для животных и человека, биоиндикаторами среды обитания. С обрастаниями также связан вопрос инвазий (переноса чужеродных видов водных организмов судами).

Отличительные черты сообществ обрастания:

- 1) более бедный по сравнению с окружающим бентосом видовой состав,
- 2) преобладание эврибионтных форм – как следствие приспособленности к изменчивым внешним условиям,
- 3) наличие у большинства видов-обрастателей плавающей личинки,
- 4) высокая численность и продуктивность сообщества и т.д.[2, 3]

Наиболее часто в обрастании встречаются следующие группы организмов.

Бактерии первыми появляются на чистой поверхности, помещенной в воду. Слизистая первичная пленка, состоящая из бактерий и водорослей, может накапливать токсикианты (до 10^3 относительно морской воды). Микроорганизмы могут использовать в пищу масляную основу лакокрасочных покрытий, разрушать покрытия своими метаболитами, способствовать выделению токсинов из основы благодаря изменению активности воды пристеночного слоя, экранировать токсины покрытий от макрообрастателей.

Грибы(Mycota), обитающие в водной среде. Среди них имеются как виды, участвующие в обрастании, так и виды, препятствующие развитию обрастания,- комменсалы и паразиты таких обрастателей, как усоногие раки, устрицы, мидии, губки и другие организмы. В опытах на Черном море грибы обрастали металлические конструкции и способствовали коррозии металла. На металле было выделено много видов, относящихся к классам *Denteromycetes*, *Ascomycetes* и низшим грибам *Zygomycetes*. Известны случаи, когда грибы портили лакокрасочные покрытия и смазочные масла. Они также способны расщеплять нефть и нефтепродукты, делая их доступными для бактерий. Тем самым они уменьшают загрязнение воды.

Водоросли- присутствие и обилие разных групп зависит от степени освещенности. Так, диатомовые, зеленые и синезеленые (цианобактерии) водоросли преобладают на небольшой глубине, а красные и, особенно, бурые встречаются глубже, доходя до глубины десятков метров. Глубина погружения их зависит от возможности проникновения солнечных лучей, на что косвенным образом влияет загрязнение воды. Обычно водоросли распределяются довольно четко очерченными поясами на любых твердых предметах. Обилие их негативно сказывается на обрастании животными, которые в тех же

районах и на той же глубине преобладают в затененных местах.

Губки(Spongia) редко встречаются в обрастании антропогенных субстратов в морях и океанах, в пресных же водах они являются одними из основных обрастателей.

Кишечнополостные(Hydroidea) растут быстро и могут появляться через несколько дней или недель после начала заселения субстрата. В это время биомасса гидроидов может превышать биомассу других организмов. Такие организмы, как кораллы очень чувствительны к загрязнению и на портовых сооружениях и на судах они практически не встречаются.

Полихеты(Polychaeta), особенно сидячие (Sedentaria). Их известковые домики плотно прирастают к субстрату, иногда друг к другу и они могут удерживаться даже при быстром токе воды.

Мшанки(Bryozoa) часто встречаются в обрастании как в пресных, так и в морских водах. В морях это в основном известковые мшанки (Membraniporidae и др.), инкрустирующие тонкой известковой коркой или веточками чистые поверхности и нарастая на других обрастателях.

Моллюски(Mollusca), прежде всего, двустворчатые (Bivalvia). Из них обрастателями являются только те, которые могут плотно прикрепляться к субстрату биссусом, такие, например, как мидии (Mytilidae), или прирастать к нему, как устрицы (Ostrea).

Ракообразные(Crustacea), одной из основных групп являются усоногие раки (Cirripedia). Они появляются в обрастании через одну-две недели и уступают, но не всегда, первенствующее положение моллюскам. Особенно большое значение усоногие раки имеют в обрастании судов, так как не смываются током воды, и те виды, которые встречаются в обрастаниях, как правило, эврибионты. Они длительное время переносят загрязнение, опреснение и другие неблагоприятные факторы. Некоторые виды (*Balanus amphitrite*, *B. improvisus*) первыми садятся на поверхности, защищенные ядовитыми покрытиями. Из усоногих раков в наших морях особенно важное значение имеют *Balanus improvisus*, *B. eburneus*, *B. balanus*, *B. crenatus*, *Semibalanus cariosus*, *S. balanoides*, *Lepas anatifera*, *L. beringiana*.

Насекомые(Insecta) встречаются в обрастании только в пресных водах и в очень ограниченном количестве в солоноватых (чехлы личинок ручейников и пр.).

Иглокожие(Echinodermata) встречаются только в морях и океанах на стационарных установках в густом обрастании. В основном это морские звезды (Asteroidea). Иглокожие регулируют численность основных обрастателей и в этом качестве даже могут быть полезны. Так, морские звезды выедают двустворчатых моллюсков, морские ежи - водоросли.

Оболочники(Tunicata) часто встречаются в соленых водах в обрастании стационарных объектов. Одиночные асцидии играют небольшую роль в обрастании, но колониальные нередко (например, *Botrillus*) могут покрывать значительные площади на судах, буях, сваях и различных подводных сооружениях.

Несмотря на то, что состав обрастания варьирует в зависимости от условий среды, развитие его подчиняется определенным законам. I фаза - первичная пленка, длительность от нескольких дней до 2 - 3 недель. Сначала поселяются бактерии при малом количестве диатомовых водорослей, затем формируется пленка из диатомовых водорослей. Количество бактерий зависит от количества живых и мертвых диатомовых планктона, продуктами разложения и метаболитами которых они питаются, а также от величины растворенного органического вещества (РОВ).

II фаза - быстро растущие, чаще колониальные обрастатели (усоногие гидроиды, мшанки, актинии, полихеты) – представители видов-фильтраторов с коротким жизненным циклом, личинки которых подвижны, иначе они не смогли бы колонизировать отдаленный от дна субстрат. Большинство обрастателей (баланусы, спирорбисы и др.) предпочитают оседать на поверхность, покрытую пленкой. Что касается защиты пленкой обрастания от ядов, то оказалось, что тонкая слизистая пленка накапливает яд и

препятствует поселению макрообрастателей, тогда как толстая пленка мешает проникновению ядов и уменьшает их противообрастающее действие.

III фаза - медленно растущие беспозвоночные (мидии, устрицы, асцидии), существование сообщества может исчисляться годами. С течением времени в обрастаниях накапливается детрит (осадок), который делает поверхность не столь жесткой и привлекает типичных донных обитателей: многощетинковых червей и улиток. Чем дольше существует сообщество обрастания, тем ближе становится его видовой состав к биоценозу бентоса, причем именно того, рядом с которым данное обрастание развивается.

Отношения организмов внутри сообществ обрастания чрезвычайно сложные. Даже в бедном сообществе в Азовском море между 6 видами обрастателей было установлено около 40 топических и трофических связей. В Черном море для белянусов были выявлены прямые зависимости от мидий, мшанок, полидоры, гетеротрофных бактерий перифитона, мертвых диатомовых и Ph взвеси, растворенного органического вещества, трансформированного перифитоном, карбонатов в перифитоне, живых диатомовых в планктоне, аллохтонных углеводов, HCO_3 и CO_2 и обратные зависимости от гетеротрофных бактерий и карбонатов взвеси.

Преобладание разных видов обрастателей в биоценозе зависит от следующих основных причин: 1) экологических условий; 2) продолжительности нахождения субстрата в воде; 3) свойств субстрата; 4) эксплуатационного фактора. Экологические условия для основных обрастателей значат несколько меньше, так как большинство обрастателей - эврибионты. Это позволило им не только широко расселиться в Мировом океане, но и дало возможность противостоять многим способам борьбы с обрастанием, таким, как большинство ядовитых красок, нагреванию воды и др. Они переносят их лучше, чем многие другие обрастатели, за исключением микроорганизмов.

Большая протяженность в широтном и долготном направлении России обуславливает большое разнообразие климатических условий; кроме того, большее или меньшее изолирование внутренних морей от океана и их пониженная соленость воды также сказываются на качественном и количественном составе обрастаний различных морей. По составу обрастания моря можно разделить на четыре группы:

1. Арктические моря - море Лаптевых, Восточно-Сибирское и Чукотское. Все характеризуются полным или почти полным отсутствием литоральной фауны. Из сублиторальной фауны основные компоненты обрастания - усоногие раки *Balanus crenatus*, *B. balanus*, виды семейства *Scalpellidae*, моллюск *Hiatella arctica*, гидроиды, мшанки, губки и асцидии. Для них характерны медленный рост обрастателей и короткий сезон оседания личинок. Практического значения обрастание в настоящее время не имеет.

2. Бореально-арктические моря - Баренцево, Белое, Берингово, Охотское и северная часть Японского. Руководящие формы обрастания одинаковы - *Balanus crenatus*, *Semibalanus batanoides*, *Mytilus edulis*. Обрастание довольно значительное, но его развитие происходит сравнительно медленно, сезон оседания личинок длится от половины до трех четвертей года.

3. Бореальные, солоноватоводные моря - Балтийское, Черное, Азовское и Каспийское. Руководящие формы обрастания - *Balanus improvisus* и *B. eburneus*, мидии, *Cordylophora caspia* и *Perigonomus megas*. Биомасса обрастания значительна везде, кроме сильно опресненных районов. Высокий темп роста обрастателей, оседание личинок происходят в течение большей части года, иногда почти весь год.

4. Субтропические участки морей, в которые можно выделить южную часть Японского моря и район Батуми в советской части Черного моря. Для них характерно преобладание в обрастаниях сидячих полихет и мшанок, меньшее значение усоногих раков. Биомасса обрастания сравнительно невелика. Темп роста обрастателей очень высокий, оседание организмов происходит почти весь год, в некоторых местах круглый год [3].

Коррозии наиболее подвержены те объекты, что регулярно контактируют с водой, например, корпуса судов. Ущерб, который наносит коррозия металлов, составляет в

развитых странах от 2 до 4% ВВП. При этом каждый год общая масса вышедших из строя по причине коррозии конструкций, деталей и оборудования составляет от 10 до 20 % мирового производства стали [4]

Для сталей, используемых в судостроении, необходимы:

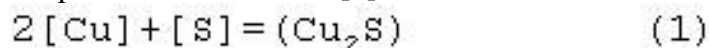
1) Устойчивость к коррозии. Речь идет именно о ржавчине, которая образуется от соленой воды. Тем более что помимо хлоридов, содержащихся в соленой воде, образованию язв ржавчины на металле способствуют сероводород и остатки нефтепродуктов. К примеру, обычные нержавеющие стали (сплавы, содержащие до 11% хрома) достаточно дороги как по себестоимости, так и в обработке. Любое избыточное трение или отсутствие давления при сверлении приведет к затвердению стали до такой степени, что станет местами тверже, чем стандартное сверло из быстрорежущей стали. Другая проблема связана с коррозионной стойкостью сварных швов из-за пористости. Независимо от сплава, нержавеющая сталь при определенных условиях будет ржаветь. Изначально на поверхности металла образуется тонкая оксидная пленка (преимущественно окись хрома), которая защищает его от дальнейшей коррозии. Очень важно, чтобы защитная пленка сохраняла свою целостность, не имела пор или трещин, иначе поврежденные участки начнут ржаветь. Для образования или восстановления оксидной пленки необходим кислород, его очень много в воздухе и недостаточно много в воде. Зато в морской воде содержится соль, которая служит катализатором коррозии. Таким образом малейшее повреждение поверхности, которое неизбежно возникнет как результат естественного износа, даст старт коррозионным процессам. В частности, в подводной части наружной обшивки кораблей часто возникают трещины — это следствие усталости металла, который долгое время находится под воздействием вибраций. В связи с этим часто применяются защитные покрытия. Свариваемость, устойчивость к деформации (пластичность), упругость и прочность обеспечиваются добавлением молибдена (2,0–3,0%), уменьшением углерода (до 0,03%) и увеличением количества никеля (до 10,0–14,0%). Ранее в корабельных сталях использовалась такая присадка, как медь [4]

Как и в случае с макулатурой, пластиковыми бутылками и прочими отходами, металлолом занимает приличное место на свалках, хотя его очень выгодно утилизировать. Добыча металлических руд является сложным делом, поэтому вторичная переработка лома намного выгоднее для отрасли. Она позволяет добиться: экономии энергетических ресурсов; уменьшения негативного воздействия на окружающую среду. Добыча сырья из руды наносит в 10 раз больше вреда; сохранения природных запасов (железной руды); ускорения добычи сырья. Переработка лома — процесс более быстрый, чем добыча и использование железной руды.

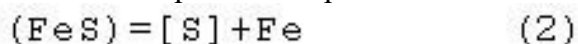
Для подготовки к переплавке сначала из металлолома убирают примеси, удаляют мусор. При сортировке разделение может проходить по факту содержания в металлоломе легирующих и углеродных компонентов. Крупногабаритный лом черных металлов сталь, чугун, железо разрезают, придавая требуемый размер. Если куски металла небольшого размера и веса, то их прессуют в брикеты при помощи прессов. При переплавке в стальной ковш, на поверхность которого нанесено специальное покрытие, насыпают металлолом. Затем в ковш заливают чугун в расплавленном виде и продувают кислородом [5, 6].

Качество стали ухудшают входящие в ее состав сера, кремний, фосфор. Сера и фосфор способствуют тому, что сталь будет ломаться при низких и высоких температурах. По этой причине поэтому важно избавиться от ненужных примесей еще на стадии переплавки лома. Для их выжигания используют специальные присадки. Среди примесей цветных металлов в стали наиболее неблагоприятной по условиям удаления является медь. Накопление меди приводит к снижению пластических свойств стали, повышает ее склонность к растрескиванию. Одним из способов удаления меди является выдержка расплава под сульфидным шлаком, При этом используется повышенное

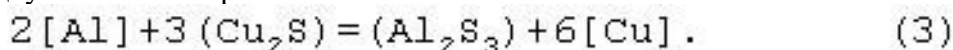
сродство меди к сере в сравнении с железом [7].



Сульфидный шлак, который находится в контакте с железоуглеродистым расплавом, обеспечивает поступление серы к расплаву и одновременно поглощает (растворяет) сульфид меди, который образуется по реакции (1). В процессе выдержки расплава под сульфидным шлаком медь переходит в шлак. Необходимый уровень концентрации серы в металлическом расплаве поддерживается реакцией:



После разделения расплава и первичного сульфидного шлака необходимо выполнять присадку алюминия в расплав.



Смесь материалов в определённой пропорции, предназначенная для переработки в металлургических агрегатах с целью получения конечных продуктов с заданными физическими и химическими свойствами называется шихта. Сталеплавильная шихта используется для производства стали и включает в себя железо, стальной лом и другие компоненты: угольное топливо (необходимо для обеспечения высоких температур в металлургической печи и реакции с рудой; флюс- материал, который добавляется к шихте для облегчения процесса плавления и удаления примесей. Обычно это известь или доломит (т.е. кальций и магний), а также дополнительные материалы (различные добавки для регулирования состава и свойств металла, такие как кремний, марганец и т.д.). Требования к качеству шихты определяются обеспечением стабильности и воспроизводимости результатов процесса, в котором она используется: постоянство химического состава; однородность по химическому, минералогическому и гранулометрическому составу; оптимальная крупность компонентов шихты; оптимальная влажность[6]

В нашей работе [8] в качестве брикета для шихты использовались отходы полиэтилена – как дополнительный источник углерода при переплавке и связующее вещество (при прессовании металла температура может достигать 300°, что способствует плавлению полиэтилена с последующим застыванием.

Удаляемый вместе с другим мусором при переработке металлолома детрит, включающий органический материал и известковые скелеты большинства перечисленных групп обрастателей, также может рассматриваться как источник углерода, кальция и магния (известковые скелеты организмов) и соединений серы – флюса для удаления примесей (Cu, Ni, Mo, Mn) из перерабатываемого металла в виде сульфидов. Ранее было показано, что в присутствии тяжелых металлов в клетках бактерий и водорослей возрастает количество сернистых соединений и полисахаридных слизей, связывающих металлы вне и внутри клеток [9].

Выводы.

Проанализированы сообщества обрастателей, селящихся на поверхности затонувших кораблей, способны перерабатывать основные загрязнители связанные с этими кораблями (топливо, лакокрасочные покрытия и пр.) , что способствует снижению токсикологической нагрузки в водной среде. Мортмасса (детрит, экзоскелеты) обрастателей может использоваться при переработке корабельного металла как источник углерода, кальция и магния (известковые скелеты организмов) и соединений серы – флюса для удаления примесей (Cu, Ni, Mo, Mn).

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения:

Сообщества организмов-обрастателей, селящихся на поверхности затонувших кораблей, способствуют снижению токсикологической нагрузки в водной среде, благодаря способности их метаболических систем к связыванию и переработке основных

групп загрязнителей, связанных с этими кораблями (топливо, лакокрасочные покрытия и пр.). Мортмасса (детрит, экзоскелеты) обрастателей может использоваться при переработке корабельного металла для удаления примесей.

Литература

1. Утилизация затонувших судов. Деловой экологический журнал подходы к отходам. 14.03.2023 источник: government.ru <https://ecomagazine.ru/> 29.04.2025
2. Иванова П.В., Нифонтов Ю.А. Влияние затонувших и заброшенных судов на морскую экосистему <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-zatonuvshih-i-zabroshennyh-sudov-na-morskuyu-ekosistemu> 29/04 2025
3. В. В. Халаман. Журнал общей биологии обрастания: терминология и определения. Т. 70, 2009. № 6, ноябрь-декабрь, стр. 495–503
4. Торубарова С.М. Судостроительные материалы конспект лекций для студентов по специальности 26.02.02 судостроение стр. 321-336 <https://lib.kgmtu.ru/wp-content/uploads/no-category/конспект-лекций-оп.12-судостроительные-материалы.pdf>
5. <https://rcycle.net/metally/chernye/kak-proishodit-pereplavka-na-zavode>
6. Патент: способ удаления меди из железоуглеродистого расплава : пат.рос. федерация. № 2 268 309 Костецкий Ю.В., Лифенко Н.Т., Троянский А.А., Карнов В.П., Омельченко В. И., Миронов Д. Ю.; заявл. 2004.06.04; опубл. 2006.01.20.
7. Коротич В. И., Фролов Ю. А., Каплун Л. И. Теоретические основы технологий окускования металлургического сырья. агломерация: учебное пособие. — 2-е, исправл. и дополн.— Екатеринбург: ГОУ ВПО УГТУ-УПИ, 2009. 417с.ISBN 978-5-321-01579-7.
8. Авторское свидетельство № 1398416 «Брикет для шихты» приоритет изобретения 24.10.1986. зарегистрирован в Гос. реестре изобретений СССР 22 .01.1988. Саванина Я.В., Преснов А.П., Саванин В.П.
9. Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. Дуализное культивирование цианобактерий. Вестн. Моск. ун-та. сер. Биология, 2008. № 2, с. 16-25.

Сведения об авторах

Янина Вячеславовна Саванина,
кандидат биол. наук., инж.
Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова,
биологический факультет
Эл. почта: v.savarin@gmail.com

Information about author

Yanina Viatcheslavovna Savanina
PhD, School of Biology, M.V.Lomonosov
Moscow State University
E-mail: v.savarin@gmail.com

УДК 575.83
ГРНТИ 34.23.01
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.240-245

С.В.Шестаков^{1,2}, Е.А.Карбышева¹
¹Кафедра генетики МГУ имени М.В.Ломоносова
²Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ МЕЖДУ АРХЕЯМИ И БАКТЕРИЯМИ

В миниобзоре систематизирована и проанализирована информация о закономерностях событий горизонтального переноса генов между археями и бактериями. Рассмотрены клеточные и молекулярные механизмы междоменных генетических обменов, факторы способствующие и препятствующие реализации горизонтальных переносов. Представленные сведения демонстрируют ключевую роль междоменных горизонтальных генетических переносов в процессах структуризации микробных сообществ, экологической адаптации и эволюции в мире прокариот.

Ключевые слова: эволюция, адаптация, археи, бактерии, горизонтальный перенос генов

S.V.^{1,2}Shestakov, E.A.¹Karbysheva

¹M.Lomonosov Moscow state university, genetic department

² N.Vavilov Institute of general genetics Russian Academy of Sciences

HORIZONTAL GENE TRANSFER BETWEEN ARCHAEA AND BACTERIA

Minireview summarizes and analyses information on general regularities of horizontal gene transfer between archaea and bacteria. Cellular and molecular mechanisms of inter-domain gene transfer and factors facilitating or preventing realization of gene transfer are considered. Knowledge presented convincingly demonstrates a key role of inter-domain genetic exchanges in processes of reorganizations of microbial communities, ecological adaptation and evolution in prokaryotic world.

Key words: evolution, adaptation, archaea, bacteria, horizontal gene transfer

Археи и бактерии являются первичными доменами [1], составляющими две исходные ветви филогенетического дерева. Деление на домены основано на определении нуклеотидных последовательностей генов 16S-субъединицы рибосомной РНК и других консервативных молекулярно-генетических маркеров. Геномы доменов различаются по ГЦ-составу, частоте использования кодонов и многим функционально сходным, но негомологичным генам и белкам. Постулировано, что оба домена произошли из одного гипотетического предка (LUCA), но каким образом домены разошлись в процессе эволюции, остается предметом дискуссии [2,3]. Предполагается, что разделение на домены могло произойти на доклеточном уровне в прототе — сообществе протоклеток, которое эволюционировало как единое целое [4]. В таком «коммунальном хозяйстве» с общим фондом генетических элементов в результате кооперативных взаимодействий протоклеток и горизонтальных переносов между ними происходило усложнение метаболических систем, формирование генетического кода и аппарата трансляции. Интенсивные горизонтальные переносы (ГПГ) играли ключевую роль в изменчивости, приобретении инноваций на ранних этапах эволюции. Высокий уровень внутридоменных ГПГ обеспечивается системой гомологичной рекомбинации, активность которой минимальна в случае междоменных ГПГ. Генетический обмен между археями и бактериями (М-ГПГ) возможен потому, что оба домена используют универсальный генетический код и одинаковые механизмы синтеза белков.

Начальным этапом ГПГ является проникновение донорной ДНК в клетку реципиента. Способы горизонтального переноса разнообразны [5,6,7]. В системе генетической трансформации экзогенная ДНК, попадающая в окружающую среду из отмирающих клеток, поглощается клетками реципиента. Донорная ДНК может быть любого генетического происхождения, но способностью активно поглощать ДНК (компетентностью) обладают не все виды архей и бактерий. Тем не менее именно система генетической трансформации служит главным инструментом М-ГПГ. Перенос генов в системах общей и сайт-специфической трансдукции с

помощью вирусов эффективен для внутридоменных ГПГ, но возможности М-ГПГ ограничены потому, что лишь немногие вирусы способны перекрестно инфицировать клетки и архей и бактерий. Функции переносчиков генов выполняют также GTA-агенты — дефектные профаги, неспособные размножаться в клетке реципиента, но доставляющие в нее донорную ДНК. Эта система широко распространена в морских экосистемах. Другим каналом переноса генетической информации является система конъюгации, осуществляемая через физический контакт партнеров. Хромосомная ДНК из донора передается по цитоплазматическому мостику в клетку реципиента с помощью плазмиды. Система конъюгации детерминирована большим числом генов и донора и реципиента и имеет видовую штаммовую специфичность. Конъюгативные плазмиды и другие мобильные генетические элементы (профаги, транспозоны, интегроны и др.) служат эффективными источниками и переносчиками кластеров генов, обеспечивающих быструю адаптацию к изменениям в окружающей среде. О вкладе в М-ГПГ более редких способов переноса генов на основе физических контактов партнеров (микротрубочки, ДНК-содержащие везикулы, слияние клеток с образованием гетеродуплексов) известно мало.

Успешный перенос донорной ДНК в клетку реципиента не гарантирует «приживания» чужого гена в геноме нового хозяина. Интеграция такого гена в хромосому реципиента путем гомологичной рекомбинации не происходит из-за отсутствия гомологии. Однако в составе автономно реплицируемой плазмиды или мобильных элементов, интегрируемых через системы сайт-специфической рекомбинации или транспозиции перенесенные гены могут встраиваться в генно-метаболические сети реципиента. Основным же механизмом реализации М-ГПГ является NHEJ-система нехомологичной рекомбинации, осуществляющая соединение молекул ДНК через «липкие концы» в участке с двунитевым разрывом в ДНК клетки реципиента [8]. Об участии этой системы в М-ГПГ свидетельствует корреляция между способностью к М-ГПГ и наличием в геномах архей и бактерий генов, ответственных за синтез белков, осуществляющих нехомологичную рекомбинацию [9]. Недавно был открыт новый вариант механизма сайт-специфической рекомбинации, обеспечивающей включение интегров бактерий в геном архей [10].

Клетки любых организмов не любят чужих генов. «Своим» для реципиента привнесенный ген становится только в том случае, если приносит новому резиденту ощутимую выгоду, закрепленную в популяции отбором в конкретных экологических условиях [11]. Для полноценного закрепления привнесенной через М-ГПГ новой генетической информации требуется длительное время, нужное для амелиорации (унификации с ГЦ-составом резидентного генома) и славивания с регуляторными системами клетки реципиента [12]. Нежелание интегрировать чужие гены объясняется многими причинами. Увеличение размера генома (особенно за счет мобильных элементов, использующих ресурсы клетки-хозяина для собственного сохранения) требует увеличения энергетических и прочих затрат в ущерб своим интересам. Встраивание чужого гена может инактивировать функционально значимый участок генома и вызвать гибель клетки, заблокировать экспрессию генов резидента, нарушить сборку белковых комплексов, вызвать дисбаланс в регуляторных системах [13]. Для защиты от вредного действия чужеродных генов клетки архей и бактерий располагают системами противодействия, снижающими вероятность осуществления М-ГПГ. Это процессы рестрикции-модификации, опознающие и разрушающие чужую ДНК, система CRISPR-Cas, защищающая клетки от вирусной инфекции, механизмы, подавляющие экспрессию чужеродных генов [6,11]. Геномы прокариот подвергаются динамичным изменениям, в ходе которых ненужные гены элиминируются, а полезные гены собираются в эффективно регулируемые кластеры/опероны. В клетке постоянно действуют противоборствующие тенденции — защиты от чужеродных генов и стремления приобрести новые гены, которые увеличат адаптивный потенциал и выживаемость клеток. В конечном счете «желание» получить полезный ген доминирует, что и выражается в реализации междоменных генетических обменов, влияющих на темпы и траектории эволюционных преобразований.

У разных видов архей и бактерий от 3-х до >20% генома приходится на долю генов, приобретенных через М-ГПГ. На основе анализа большого числа М-ГПГ выявлены общие

закономерности процессов генетического обмена между археями и бактериями.

1. Частота передачи генов из бактерий в археи значительно выше числа установленных М-ГПГ от архей в бактерии. Возможно, это обусловлено различиями в структуре клеточных стенок, в активности защитных механизмов, в системах переноса и интеграции чужеродных генов.

2. Гены информационных систем (трансляции, транскрипции, репликации) редко вовлекаются в М-ГПГ [14,15]. Это связано со сложностью организации систем: в частности, включение чужеродного белка в сборку многокомпонентной структуры сопряжено с риском инактивации аппарата трансляции. В перечне частых событий М-ГПГ первые места занимают гены метаболизма углеводов, аминокислот, систем переноса электронов. Высоким уровнем М-ГПГ характеризуются гены, ответственные за транспорт ионов, аминокислот, нуклеотидов, синтез структур клеточных стенок и мембран, а также за сигнальные системы адаптивного ответа (шапероны и др.), обеспечивающие адаптацию к меняющимся условиям среды [16, 17].

3. Природу первичного донора генов, как и первичного реципиента определить нелегко даже в случае переноса единичных генов. Гены, приобретенные каким-то определенным видом бактерии или археи в ходе эволюции распространились через внутримолекулярные переносы в другие виды филума. Как правило, выявленные факты М-ГПГ были результатом цепочки переносов с участием промежуточных хозяев, иногда филогенетически далеких (как в случае приобретения археями цианобактериального гена шаперона через предка зеленой водоросли в качестве промежуточного донора). Выявлены случаи ступенчатых событий М-ГПГ; первые переносы генов увеличивали готовность реципиента к последующим М-ГПГ, формирующим функциональную оптимизацию систем, ответственных, например, за ассимиляцию новых субстратов «питания» или деградацию вредных агентов.

Масштабные эволюционные события, ведущие к возникновению крупных таксономических групп, осуществлялись путем массовых (множественных) переносов большого числа генов. Так из термофильных метаногенов произошли мезофильные галофильные археи, получившие через М-ГПГ большое число бактериальных генов, обеспечивших переход к другому образу жизни [18]. Траектория событий М-ГПГ зависит от выбора методических подходов. По итогам детального анализа более 1980 геномов архей и бактерий с помощью нетривиального варианта филогенетического метода был сделан вывод о том, что происхождение многих таксонов архей обусловлено массовыми кластерными переносами бактериальных генов [19]. Однако в результате анализа тех же исходных материалов с применением другого метода число М-ГПГ резко (и обосновано) сократилось: было показано, что импорт генов бактерий происходил дискретно с участием многих донорных и реципиентных видов, в течение всей длительной эволюционной истории архей [20].

4. Частота М-ГПГ зависит от многих факторов, включая а) экологическую значимость адаптивного приобретения нового гена; б) комплекс условий необходимых для реализации М-ГПГ, которые не являются случайными, а детерминируются адаптивными механизмами. Множественные события М-ГПГ стимулируют видообразование, влияют на скорость и траектории эволюционного процесса [21].

Повышенный уровень М-ГПГ характерен для архей и бактерий, обитающих совместно или в сходных экологических нишах [17]. Особенно заметно это проявляется в анаэробных донных экосистемах с высокой плотностью клеток и вирусов, большой концентрацией экзогенной ДНК в виде комплексов, защищенных от разрушения. М-ГПГ играют важную роль в структуризации и функционировании микробиома кишечника животных, где межмолекулярные переносы генов (в частности адгезинов, ответственных за прикрепление к стенкам кишечника), помогают археям и бактериям совместно осуществлять процессы расщепления сложных субстратов, поступающих с пищей [22]. Подобная ситуация наблюдается в компактных участках нефтяных загрязнений, в которых идут активные М-ГПГ между археями и бактериями, осуществляющими совместно деградацию углеводородов [17].

Следует подчеркнуть, что большое значение имеет не столько сама среда обитания, сколько сходство и взаимодополняемость биохимических и физиологических характеристик,

способствующих успешному встраиванию чужого гена в генно-метаболические сети реципиента. Рассмотренные выше закономерности М-ГПГ выявлены при анализе большого числа множественных и единичных событий генетического обмена между археями и бактериями. В таблице 1 приведены некоторые примеры М-ГПГ

донор бактерия	реципиент архея	ген, признак	А
Firmicutes Proteobacteria	Methanosarcina	гены путей метаболизма	[26]
Actinobacteria Proteobacteria	Thaumarchaeota Euryarchaeota	транспорт аминокислот	[16]
Actinobacteria Cyanobacteria	Thermoplasma Nanoarchaeota	sod N; супероксид-дисмутаза	[27]
Methylobacterium	Methanoperedens	NiFe-гидрогеназа	[29]
Proteobacteria	Nanoarchaeota	merA; устойчивость к ртути	[28]
донор архея	реципиент бактерия	ген, признак	Б
Pyrococcus Archaeoglobus	Thermotoga maritima	glt B; глутамат синтаза ino1 -синтаза	[23]
Halobacterium (галофильная)	Salinibacter ruber	trkAB; транспорт катионов	[24]
Methanococcus Sulfolobus	Chloroflexota	arl AB; подвижность клеток	[25]

Табл. 1. Горизонтальный перенос генов из бактерий в археи (А); из архей в бактерии (Б).
А, Б — источники информации.

В геноме гипертермофильной бактерии *Thermotoga*, выделенной из морской экониши, более 20% генов имеют высокое сходство с архейными генами. Четкие доказательства М-ГПГ от архей в бактерию получены в отношении генов, кодирующих субъединицу глутамат-синтазы (*gltB*) и миоинозитол-1Р-синтазы (*ino1*), участвующей в защите клеток от температурной инактивации и осмотического шока [23]. Бактерия *Salinibacter ruber*, обитающая в гиперсолевой эконише, заимствовала у аэробных галофильных архей группу (собранных в единый кластер) генов, обеспечивающих высокую солеустойчивость. Через М-ГПГ приобретен ген архейного сенсорного родопсина, связанного функцией протонной помпы [24]. Имеются сообщения о междоменных переносах генов протеородопсина между морскими планктонными видами архей и бактерий. Впечатляющим является случай М-ГПГ целой функциональной системы, контролирующей подвижность клеток. У бактерий действуют жгутики, а многие археи используют специфическую филаментозную структуру (археллум), ответственную за подвижность «плавающего» типа. Экспрессия полученного от архей кластера *arl*-генов в клетках морских донных бактерий рода *Chloroflexota* обеспечила синтез белков архейной структуры, встроенной в клеточную стенку: бактериальная клетка получила новый механизм подвижности при хемотаксисе [25].

Как правило М-ГПГ имеют однонаправленный характер. Частота реципрокных обменов между археями и бактериями в одной эконише определяется различиями в способности видов быть реципиентами. По совокупности свойств анаэробные археи семейства метаносарцин обладают высоким реципиентным потенциалом. У них выявлены переносы различных генов от различных бактериальных доноров. В геноме *Methanosarcina mazei*, способной сбраживать многие органические соединения, обнаружено большое количество генов, имеющих высокую степень гомологии с бактериальными генами, участвующими в процессах глюконеогенеза, синтеза и транспорта аминокислот, репарации ДНК, транспозиции, сенсорных систем

адаптивного ответа [26].

Интенсивные М-ГПГ выявлены у некультивируемых планктонных видов *Thaumarchaeota* и групп II-III *Euryarchaeota* [16]. Импорт археями генов (преимущественно из актинобактерий и протеобактерий) происходил как на ранних этапах эволюции (древние переносы), так и в ходе адаптивной экологической дивергенции в меняющихся условиях среды (недавние переносы). Во многих случаях переносом единичного гена (или группы функционально связанных генов) приобретался важный для выживаемости адаптивный признак, играющий существенную роль в защите клеток от вредных воздействий [27, 28] или оптимизирующий процессы регуляции генно-метаболических сетей [29].

В этом кратком обзоре систематизированы и обобщены сведения о закономерностях междоменных генетических переносов. Подчеркнутое внимание уделено данным о роли М-ГПГ в процессах экологической адаптации и эволюции прокариот. Понимание механизмов реализации М-ГПГ открывает новые возможности в обсуждении проблем происхождения и эволюционных взаимоотношений между первичными доменами.

Литература.

1. Raymann K., Brochier-Armanet C., Gribaldo S. The two-domain tree of life is linked to a new root for the archaea // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 6670–6675.
2. Шестаков С.В., Карбышева Е.А. О дискретном происхождении архей и бактерий // В кн. *Эволюция биосферы с древнейших времен до наших дней*. М. ПИН РАН. 2019. С.25-35.
3. Di Giulio M. The late appearance of DNA, the nature of the LUCA and ancestors of the domains of life // *Bio Systems*. 2021. V.202. N104330.
4. Woese C. A new biology for a new century // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. V.68: 173-186.
5. Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // *Эколог. генетика*. 2007. Т.5. С.12-24.
6. Koonin E.V. Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions // *F1000 Research*. 2016. V.5: 1805.
7. Gophna U., Altman-Price N. Horizontal gene transfer in Archaea — from mechanisms to genome evolution // *Annu. Rev. Microbiol.* 2022. V.76. P. 481-502.
8. Шестаков С.В., Карбышева Е.А. Вклад систем негомологичной рекомбинации в процессы эволюции прокариот // *Материалы международной конференции Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. NT+MEc*. 2018. С. 7-10.
9. Popa O., Hazkani-Covo E., Landan G. et al. Directed networks reveal genomic barriers and DNA repair bypasses to lateral gene transfer among prokaryotes // *Genome Res*. 2011. V.21. P. 599-609.
10. Ghaly T.M., Tetu S.G., Penesyan A. et al. Discovery of integrons in Archaea: Platforms for cross-domain gene transfer // *Sci. Adv.* 2022. V.8. eabq6376.
11. Lercher M.J., Pal C. Integration of horizontally transferred genes into regulatory interaction networks takes many million years // *Mol. Biol. Evol.* 2008. V.25, N3. P. 559-567.
12. Hall R.J., Whelan F.J., McInerney J.O. et al. Horizontal gene transfer as a source of conflict and cooperation in prokaryotes // *Frontiers Microb.* 2020. V.11. Article 1569.
13. Baltrus D.A. Exploring the costs of horizontal gene transfer // *Trends Ecol. Evol.* 2013. V.28, N8. P.489-496.
14. Cohen O., Gophna U., Pupko T. The complexity hypothesis revisited: connectivity rather than function constitutes a barrier to horizontal gene transfer // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V.28, N4. P.1481-1489.
15. Kanhere A., Vingron M. Horizontal gene transfers in prokaryotes show differential preferences for metabolic and translational genes // *BMC Evol. Biol.* 2009. V.9. P.9.
16. Deschamps P., Zivanovic Y., Moreira D. et al. Pangenome evidence for extensive interdomain horizontal transfer affecting lineage core and shell genes in uncultured planktonic *Thaumarchaeota* and *Euryarchaeota* // *Genome Biol. Evol.* 2014. V. 6, N 7. P.1549-1563.
17. Fuchsman C.A., Collins R.E., Rocap G., Brazelton W. Effect of the environment on horizontal gene transfer between bacteria and archaea // *Peer J*. 2017. V.5. e3865.
18. Lopes-Garcia P., Zivanovic Y., Deschamps P., Moreira D. Bacterial gene import and mesophilic adaptation in archaea // *Nature Rev. Microbiol.* 2015. V. 13, N7. P. 447-456.
19. Nelson-Sathi S., Sousa F.L., Roettger M. et al. Origins of major archaeal clades correspond to gene acquisitions from bacteria // *Nature*. 2015. V. 517. P.77-80.

20. Groussin M., Boussau B., Szollosi G. et al. Gene acquisitions from bacteria at the origins of major archaeal clades are vastly overestimated // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V.33. P.305-310.
21. Garcia-Aljaro C., Balleste E., Muniesa M. Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes // *Curr. Opin. Microbiol.* 2017. V.38. P.95-105.
22. Lerner A., Matthias T., Aminov R. Potential effects of horizontal gene exchange in the human gut // *Front. Immun.* 2017. V. 8. P.1630.
23. Nesbo C.L., Haridon S.L., Stetter K.O., Doolittle W.F. Phylogenetic analysis of two «Archaeal» genes in *Thermatoga maritima* reveal multiple transfers between archaea and bacteria // *Mol. Biol. Evol.* 2001. V.8, N3. P.362-375.
24. Mongodin E.F., Nelson K.E., Daugherty S. et al. The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V.102. P. 18147-18152.
25. Sivabalasarma S., Taib N., Mollat C.L. et al. Horizontal gene transfer of the functional archaeal machinery to bacteria // *bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2025.02.02.636118>*. posted February 2, 2025.
26. Garushyants S.K., Kazanov M.D., Gelfand M.S. Horizontal gene transfer and genome evolution in *Methanosarcina* // *BMC Ecol. Evol.* 2015. V.15. Article 102.
27. Sutherland K.M., Ward L.M., Colombero C-R., Johnston D.T. Inter-domain horizontal gene transfer of nickel-binding superoxide dismutase // *Geobiology.* 2021. V.19. P. 450-459.
28. Barkay T., Kritee K., Boid E., Geesey G. A thermophilic bacterial origin and subsequent constraints by redox, light and salinity on the evolution of the microbial mercuric reductase // *Environ. Microbiol.* 2010. V.12. P.2904-2917.
29. Leu A.O., McIlroy S.J., Je J. et al. Lateral gene transfer drives metabolic flexibility in the anaerobic methane-oxidizing archaeal family *Methanoperedenaceae* // *Appl. Environ. Sci.* 2020. V.11, N3. e01325-20

Информация об авторах**Сергей Васильевич Шестаков**

доктор биол. наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета

МГУ имени М.В.Ломоносова

Москва, Россия

bio.msu.ru

Эл. почта: shestakovgen@mail.ru

Елена Алексеевна Карбышева

кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета

МГУ имени М.В.Ломоносова

Москва, Россия

bio.msu.ru

Эл. почта: karbisheva@mail.ru

Information about authors**Sergey Vasilievich Shestakov**

doctor of science (biol.), professor, academician, Main Researcher,

M.Lomonosov Moscow state university, biological faculty, genetic department

Moscow, Russian Federation

bio.msu.ru

E-mail: shestakovgen@mail.ru

Elena Alekseevna Karbisheva

Phd (phd biol.), Leading Researcher

M. Lomonosov Moscow state university, biological faculty, genetic department,

Moscow, Russian Federation

bio.msu.ru

E-mail: karbisheva@mail.ru

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ piРНК И ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ОНКОГЕНЕЗОМ

В статье рассматриваются возможности применения piРНК и онколитических вирусов в качестве перспективного метода борьбы со злокачественными новообразованиями

Ключевые слова: онкогенез, онколитические вирусы, некодирующие РНК, piРНК

S.M. Shlyapnikov, A.A. Agumava, O.I. Vyshemirsky
Kurchatov Complex of Medical Primatology,
National Research Centre «Kurchatov institute»

POSSIBILITIES OF USING piRNA AND ONCOLYTIC VIRUSES TO FIGHT ONCOGENESIS

The article discusses the possibilities of using piRNA and oncolytic viruses as a promising method for combating malignant neoplasms.

Keywords: oncogenesis, oncolytic viruses, non-coding RNAs, piRNAs

Цель работы. Изучение противоопухолевых эффектов piРНК и онколитических вирусов у животных и человека.

Введение.

Накопление данных о молекулярно-генетических событиях при онкогенезе трансформировало представление о роли малых некодирующих РНК в этом процессе. Наиболее крупный класс этих молекул представлен piРНК. В последние годы значительно выросло число экспериментальных исследований как роли piРНК в противодействии опухолевой трансформации клетки; так и борьбы с последней посредством использования онколитических вирусов. Эти знания могут быть применены как в фундаментальной, так и в практической онкологии.

В соответствии с мутационной теорией онкогенеза, процессу превращения нормальной клетки в опухолевую может предшествовать ряд мутаций в группах генов, регулирующих деление, рост, дифференцировку, апоптоз клеток и репарацию ДНК, в частности, точечные мутации в онкогенах или амплификации последних, точечные мутации в генах супрессоров опухолей или их делеции, драйверные аберрации хромосом или их потери. Не менее важными механизмами канцерогенеза являются эпигенетические, такие как метилирование или деметилирование ДНК, модификация гистонов или ремоделирование хроматина. Такие эпигенетические изменения вызывают подавление или активацию некодирующих РНК, контролирующей экспрессию до нескольких сотен генов [1].

Установление того факта, что лишь ~2–3% генома человека транскрибируется и затем транслируется в белок, привело к росту интереса к некодирующим РНК, ранее упускавшимся из виду. Интерес вызвали, прежде всего, их роль в клеточных функциях и патогенезе заболеваний (в том числе онкологических), а также потенциал в качестве онкомаркеров или терапевтических средств, до сих пор недостаточно раскрытые. Регуляторные некодирующие РНК в зависимости от их молекулярного размера подразделяются на длинные некодирующие РНК – днРНК (long non-coding RNAs – lncRNAs; длина транскриптов превышает 200 нуклеотидов) и малые некодирующие РНК, которые способны к РНК-интерференции. Последняя представляет собой регуляцию экспрессии определенных нуклеиновых кислот-мишеней при их распознавании посредством полного или частичного спаривания оснований, а также за счет направления кофакторов и белков семейства Argonaute, участвующих в образовании РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (RNA-induced silencing complex – RISC) [1].

В число малых некодирующих РНК входят:

1) образующиеся из двухцепочечных предшественников с участием Dicer (рибонуклеазы из семейства РНКазы III) и связывающиеся с белками подсемейства AGO (малые интерферирующие РНК – миРНК; smallinterferingRNAs– siRNAs) и микроРНК (microRNAs – miRNAs);

2) формирующиеся из одноцепочечных предшественников посредством Dicer-независимого механизма – РНК, взаимодействующие с белками PIWI, или piРНК (piwi-interacting RNAs – piRNAs), которые, согласно разным источникам, имеют длину от 21 до 35 нуклеотидов [1].

Молекулы piРНК преимущественно регулируют гены, отличные от их собственного происхождения (гетеросайленсинг), путем ингибирования трансляции, усиления деградации их мРНК, но главным образом посредством эпигенетического сайленсинга последних в ядре. Установлено, что белки PIWI и piРНК связаны с поддержанием опухолевых стволовых клеток, а aberrантная (измененная) экспрессия piРНК является уникальным и отличительным признаком многих заболеваний, включая различные виды опухолей человека. В ряде обзорных статей указывается, что одни piРНК подавляют опухолевый рост, другие имеют онкогенные эффекты, а некоторые из них – дуалистическую роль [1].

В обобщениях работ по ассоциации piРНК и онкогенеза, выполнявшихся другими исследователями ранее, отмечались различия в направленности изменений и степени aberrантности уровня их эндогенной экспрессии в зависимости от молекулы piРНК и конкретного злокачественного новообразования. При обобщении piРНК по их эффектам можно выделить две группы: 1) piРНК с онкогенным эффектом такие как: piR-823, piR-54265, piR-001773, piR-017184, piR-651, piR-30473, piR-31115, piR-31470, piR-162725, piR-18849, piR-19521, piR-17724, piR-31335, piR-48966, piR-52681, (hsa_piR: 001170, 016975, 017724, 019951, 020828, 020829, 020498, 013306), (piR_LLi: 7, 54, 1977, 13491, 24259, 28197, 30517, 30581, 24894, 30552), piR-39980, piR-4987, piR-Hep1, piR-598 (rs149336947), piR-021285 (rs1326306). В опухолевых тканях или культурах опухолевых клеток человека данные piРНК характеризуются эндогенным aberrантно повышенным уровнем. При его дополнительном увеличении наблюдается прогрессирование опухолевого роста за счет усиления пролиферации, миграции и инвазии, ингибирования апоптоза, увеличения экспрессии онкогенов; при понижении в клетке уровня таких piРНК, напротив, усиливается апоптоз, подавляются пролиферация, миграция и инвазия, а также экспрессия онкогенов; 2) piРНК с опухолесупрессорным эффектом такие как: piR-017061, piR-823, piR-651, piR-57125, piR-36712, piRABC (piR_DQ594040), piR-366845, (piРНК: DQ598918, DQ589977 и DQ601609), (hsa_piR: 001078, 001207, 001346, 017061, 017295, 019420, 020450), piR-5937, piR-28876, piR-23210 и piR-32159, которые характеризуются в опухолевых тканях или культурах опухолевых клеток человека aberrантно пониженным эндогенным уровнем. При его повышении наблюдаются ингибирование пролиферации, миграции и инвазии, а также индукция апоптоза; при его дополнительном понижении стимулируются пролиферация и метастазирование, ингибируется апоптоз. В большинстве исследований показано, что аномальная экспрессия piРНК может приводить к неконтролируемой пролиферации опухолевых клеток вследствие хронической дерегуляции пролиферативных сигналов (с последующей активацией классических сигнальных путей, таких как PI3K/АКТ/mTOR), ведущей к неограниченной репликации и пролиферации клеток [1].

Онколитические вирусы – это вирусы, которые обладают способностью инфицировать и разрушать опухолевые клетки, при этом оставляя здоровые клетки нетронутыми. Эти вирусы могут быть как естественными, так и генетически модифицированными. К числу широко известных и наиболее изученных онколитических вирусов с установленным онколитическим эффектом относятся: аденовирусы (для лизиса опухолей часто применяется аденовирус серотипа 5(Ad5); герпесвирусы (в качестве онколитических используются вирусы простого герпеса типов 1 и 2, модифицированные методами генной инженерии); поксвирусы (для онколиза используются аттенуированные штаммы вируса осповакцины); парвовирусы (парвовирусы могут реплицироваться в опухолевых клетках, вызывая их лизис); реовирусы (онколитические свойства реовирусов связаны с их способностью размножаться в

трансформированных клетках и подавлять развитие опухолей различной локализации); пикорнавирусы (онколитические энтеровирусы, такие как вирус полиомиелита, вирус Коксаки, эхо вирус, активно изучаются и находят применение в клинике для лечения различных опухолей); парамиксовирусы (аттенуированные штаммы вируса кори, вирус болезни Ньюкасла (ВБН), вируса Сендай, которые разрушают опухолевые клетки и могут использоваться в составе противоопухолевых композиций); рабдовирусы (обнаружены онколитические свойства вируса везикулярного стоматита млекопитающих, который реплицируется в опухолевых клетках различного тканевого происхождения, подавляя их пролиферацию и индуцируя апоптоз); тогавирусы (перспективен в отношении онколитической активности вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей) [2].

Разрушение опухолевых клеток при инфицировании онколитическими вирусами происходит по различным, еще недостаточно изученным механизмам. С помощью электронной микроскопии показано, что в результате заражения ВБН опухолевых клеток изменяется морфология цитоскелета, происходит нарастающее во времени повреждение их ультраструктуры, подавление роста. В зависимости от типа трансформации опухолевых клеток развивается апоптоз или, при невозможности его реализации вследствие нарушения регуляторных сигнальных путей, аутофагия, тогда как в клетках культуры нормальных фибробластов человека отсутствуют связанные с инфекцией NDV признаки значимого нарушения морфологии. Изучение влияния вакцинного штамма цитолитического вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей на клетки рака Эрлиха показало, что он стимулирует увеличение числа патологических митозов и повышение уровня хромосомных aberrаций. Одним из механизмов цитотоксического действия онколитических вирусов на опухолевые клетки является индукция синтеза цитотоксических белков. К ним относятся цитотоксические белки E3 и E4orf4 аденовирусов. D. Zeng и соавт. установили, что вирус везикулярного стоматита, селективно реплицирующийся в опухолевых клетках различного тканевого происхождения (глиома, рак легкого, рак желудка, рак толстой кишки и др.) с нарушенными интерферонзависимыми противовирусными путями или дефектной функцией гена-супрессора p53, онкогенов Ras или Muc, индуцирует в них апоптоз, причем матриксный белок играет главную роль в этом процессе. Обработка матриксным белком вируса везикулярного стоматита культуры клеток рака желудка MKN-28 эффективно ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптозную гибель клеток [2,3].

Основные характеристики онколитических вирусов:

Специфичность к опухолевым клеткам: Онколитические вирусы имеют механизмы, позволяющие им распознавать и инфицировать только злокачественные клетки, что делает их перспективными для целевой терапии рака.

Индукция иммунного ответа: Инфекция опухолевых клеток вирусами может вызывать иммунный ответ организма, который не только уничтожает инфицированные клетки, но и распознает и атакует другие опухолевые клетки.

Генетическая модификация: Современные исследования направлены на создание вирусов, которые могут быть специально модифицированы для улучшения их онколитической активности и безопасности, а также для доставки генов или других терапевтических молекул непосредственно в опухолевые клетки.

Исследования показывают, что рiРНК могут играть роль в ответе на вирусные инфекции, включая онколитические вирусы. Они могут участвовать в регуляции вирусной репликации и в иммунном ответе на вирусные инфекции, что делает их потенциальными мишенями для улучшения эффективности онколитической терапии.

Таким образом, изучение рiРНК и онколитических вирусов открывает новые горизонты в понимании клеточных процессов и в разработке инновационных подходов к лечению рака.

Взаимодействие рiРНК и онколитических вирусов

Онколитические вирусы (ОВ) представляют собой перспективный класс противораковых агентов, способных селективно инфицировать и лизировать опухолевые клетки, при этом минимально воздействуя на здоровые ткани. Однако, эффективность ОВ может быть

ограничена различными факторами, включая врожденный и адаптивный иммунитет, а также клеточные механизмы защиты, функционирующие в опухолевых клетках. В последнее время, внимание исследователей привлекают рiРНК (piwi-interacting RNAs) – малые некодирующие РНК, играющие ключевую роль в поддержании геномной стабильности и регуляции транскрипции транспозонов в герминальных клетках. Однако, все больше данных свидетельствует об их вовлеченности в процессы, происходящие в соматических клетках, включая канцерогенез. Соответственно, взаимодействие между рiРНК и ОВ представляется сложным и многогранным, потенциально влияющим на эффективность онколитической терапии.

рiРНК влияют на экспрессию генов, кодирующих интерфероны (IFNs), ключевые цитокины, индуцирующие противовирусный иммунный ответ. Например, рiРНК могут либо усиливать, либо подавлять транскрипцию генов IFN путем эпигенетической модификации соответствующих промоторов (метилование ДНК, модификация гистонов) или пост-транскрипционной регуляции стабильности мРНК. Подавление IFN может способствовать репликации ОВ в опухолевых клетках, однако, чрезмерное подавление может ослабить общий противоопухолевый иммунный ответ, опосредованный как врожденным, так и адаптивным иммунитетом.

Регуляция генов RIG-I/MDA5: Рецепторы распознавания паттерна (PRRs), такие как RIG-I и MDA5, играют важную роль в обнаружении вирусной РНК и активации сигнальных путей, приводящих к продукции IFN и других противовирусных цитокинов. рiРНК могут взаимодействовать с мРНК этих рецепторов, влияя на их трансляцию или стабильность. В зависимости от контекста, это может либо усиливать, либо ослаблять противовирусный иммунный ответ.

Модуляция генов, кодирующих компоненты системы комплемента: Система комплемента является еще одним важным компонентом врожденного иммунитета, способным непосредственно лизировать инфицированные клетки и привлекать иммунные клетки к очагу инфекции. рiРНК могут влиять на экспрессию генов, кодирующих компоненты системы комплемента, что может модулировать эффективность ОВ.

Влияние на жизненный цикл ОВ:

Прямое взаимодействие с вирусной РНК: Несмотря на то, что основная функция рiРНК связана с регуляцией транспозонов, нельзя исключать возможность их прямого взаимодействия с вирусной РНК. Если рiРНК обладают комплементарностью к последовательностям в вирусном геноме, они могут нацеливать вирусную РНК на деградацию или подавлять ее трансляцию, что снизит репликацию ОВ.

Регуляция клеточных генов, необходимых для репликации ОВ: Репликация ОВ зависит от клеточных факторов. рiРНК могут регулировать экспрессию этих факторов, тем самым влияя на эффективность репликации вируса.

Модуляция противоопухолевого иммунного ответа:

Влияние на презентацию антигена: Эффективность ОВ часто зависит от индукции противоопухолевого иммунного ответа, опосредованного цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL). Презентация вирусных и опухолевых антигенов на поверхности клеток необходима для активации CTL [4]. рiРНК могут влиять на экспрессию генов, вовлеченных в процессинг и презентацию антигена, тем самым модулируя противоопухолевый иммунный ответ.

Регуляция экспрессии иммунных контрольных точек: Иммунные контрольные точки, такие как PD-1 и CTLA-4, играют важную роль в поддержании иммунной толерантности и предотвращении аутоиммунных реакций. Однако, в контексте опухолей, они часто используются опухолевыми клетками для уклонения от иммунного надзора. рiРНК могут регулировать экспрессию генов, кодирующих иммунные контрольные точки, что может влиять на эффективность онколитической терапии, особенно в комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек.

Заключение:

Некодирующие рiРНК играют важную роль в канцерогенезе. Определение их уровня в опухолях может иметь диагностическое или прогностическое значение.

Понимание механизмов взаимодействия между рiРНК и онколитическими вирусами позволит разработать стратегии для повышения эффективности онколитической терапии, например, путем манипулирования экспрессией определенных рiРНК для усиления противовирусного иммунного ответа или подавления механизмов, ограничивающих репликацию ОВ. Дальнейшие исследования необходимы для детального изучения этих взаимодействий и выявления терапевтических мишеней.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

Не все рiРНК, несмотря на наличие ассоциации с онкогенезом, удобно применять в качестве диагностического биомаркера. Это обусловлено тем, что в клинической практике биомаркер проще использовать, если он основан на повышенном, а не на пониженном уровне экспрессии. Среди рассмотренных нами рiРНК к таким маркерам с низкой диагностической ценностью можно отнести: piR-017061, piR-823, piR-651, piR-57125, piR-36712, piRABC (piR_DQ594040), piR-366845, (piРНК: DQ598918, DQ589977 и DQ601609), (hsa_piR_: 001078, 001207, 001346, 017061, 017295, 019420, 020450), piR-5937, piR-28876, piR-23210 и piR-32159. Некоторые рiРНК, в частности piR-823 и piR-651, при опухолях разного гистологического типа имеют разнонаправленные изменения экспрессии. Это не позволяет рассматривать их в качестве высокоспецифических маркеров, но, несмотря на подобный недостаток, данные рiРНК обладают определенной терапевтической значимостью в отношении конкретных видов опухолей.

Взаимодействие между рiРНК и онколитическими вирусами представляет собой сложный и многогранный процесс, опосредованный различными механизмами.

Конфликт интересов

Отсутствует.

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Литература.

1. Шляпников С.М., Агулова А.А., Панченко А.В., Орлов С.В. Роль рiРНК в онкогенезе: обзор ассоциаций // *Практическая онкология*. 2024. №1(25). С.74-90.
2. Клаан Н.К., Акиншина Л.П., Пронина Т.А. Онколитические вирусы в терапии злокачественных новообразований // *Российский биотерапевтический журнал*. 2018. №4(17). С.6-19.
3. Huang F., Dai C., Zhang Y., Zhao Y., Wang Y. and Ru G. Development of molecular mechanisms and their application on oncolytic Newcastle disease virus in cancer therapy. // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022. 9:889403. doi: 10.3389/fmolb.2022.88940.
4. Guo Z.S., Liu Z. and Barlett D.L. Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity // *Frontiers in Oncology*. 2014. 4:74. doi.org/10.3389/fonc.2014.00074.

Сведения об авторах

Сергей Михайлович Шляпников

К.с.-х.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии Курчатовского комплекса медицинской приматологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
Сочи, Россия
Эл. почта: shlyapnikov_sm@mail.ru
<http://nrcki.ru/>

Аслан Анзорович Агулова

К.б.н., начальник лаборатории молекулярной биологии Курчатовского комплекса медицинской приматологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
Сочи, Россия
Эл. почта: aslan39@yandex.ru

Information about author

Sergey Mikhaylovich Shlyapnikov

Cand. Sci. (Agr.), Associate Professor, Senior Researcher, Laboratory for Molecular biology of Kurchatov Complex of Medical Primatology, National Research Centre «Kurchatov institute»
Sochi, Russia
E-mail: shlyapnikov_sm@mail.ru
<http://nrcki.ru/>

Aslan Anzorovich Agumava

Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory for Molecular biology of Kurchatov Complex of Medical Primatology, National Research Centre «Kurchatov institute»
Sochi, Russia
E-mail: aslan39@yandex.ru <http://nrcki.ru/>

Олег Иванович Вышемирский

*К.мед.н., ведущий научный сотрудник лаборатории
инфекционных вирусов Курчатовского комплекса ме-
дицинской приматологии ФГБУ «Национальный ис-
следовательский центр «Курчатовский институт»
Сочи, Россия
Эл. почта: olegvyshem@mail.ru
<http://nrcki.ru/>*

Oleg Ivanovich Vyshemirsky

*Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Infectious
virus laboratory of Kurchatov Complex of Medical
Primateology, National Research Centre «Kurcha-
tov institute»
Sochi, Russia
E-mail: olegvyshem@mail.ru
<http://nrcki.ru/>*

УДК 544.1 + 546.72 + 548.3

ГРНТИ 31.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.252-257

Н.А. Санина

Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН

МИШЕНЬ-ОРИЕНТИРОВАННЫЕ ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА - ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ

В статье представлены данные по разработке нового подхода к химическому дизайну новых доноров оксида азота (NO), мультитаргетных нетоксичных комплексов железа с двумя функциональными фармакофорами одновременно в одной молекуле, противовоспалительный эффект которых обусловлен их синергетическим действием на ключевые ферментативные системы: гуанилатциклазу и фосфодиэстеразы (ФДЭ).

Ключевые слова: NO, нитрозильные комплексы железа, спектроскопия, MTT тест, цГМФ, фосфодиэстеразы

N.A. Sanina

Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences

TARGET ORIENTED NITRIC OXIDE DONORS AS PROMISING AGENTS FOR THERAPY OF INFLAMMATORY PROCESSES

The article presents data on the development of a new approach to the chemical design of new nitric oxide (NO) donors, viz. multitarget non-toxic iron complexes with two functional pharmacophores simultaneously in one molecule, the anti-inflammatory effect of which is due to their synergistic action on key enzymatic systems: guanylate cyclase and phosphodiesterases

Keywords: NO, nitrosyl iron complexes, spectroscopy, cGMP, phosphodiesterases, MTT test

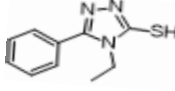
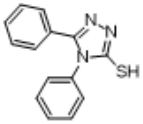
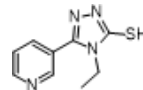
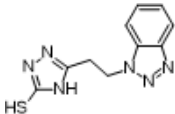
Воспаление как специфический ответ на воздействие различных внешних и внутренних факторов (патогенные бактерии, вирусы, радиоактивное излучение, высокие и низкие температуры, химические вещества и др.), включающий врожденную и адаптивную иммунную систему, является нормальной реакцией организма. Однако, если позволить воспалению безконтрольно продолжаться, оно может привести к аутоиммунным или аутовоспалительным расстройствам, нейродегенеративным заболеваниям или раку. Большинство противовоспалительных лекарственных средств (например, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), комплексные препараты на основе органических кислот, не содержащие гормонов; статины, ингибиторы гистондеацетилазы, агонисты PPAR и малые РНК) обладают существенными побочными эффектами: раздражение желудка и язвы; желудочно-кишечные кровотечения; повышенная вероятность образования синяков; обострение симптомов астмы; повышенный риск инсульта, сердечного приступа и образования тромбов; повреждение почек. Новая эра противовоспалительных средств включает такие подходы как антицитокиновая терапия и применение малых молекул, которые блокируют активность киназ. Этот подход применяется в лечении аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника, псориаз, рассеянный склероз и др.), но имеет недостатки, а именно, снижение иммунной защиты хозяина от инфекции и, возможно, рака.

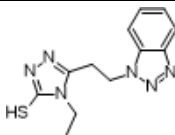
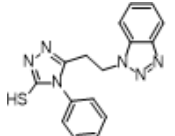
При разработке терапевтических подходов в лечении патологий, связанных с тяжелым острым респираторным синдромом, вызываемым SARS-CoV2 (воспаление легких, кашель, легочная гипертензия, фиброз и тромбоз легких, бронхоспазм и др.), активное внимание к себе привлекли ингибиторы фосфодиэстераз. ФДЭ играют основную роль в контроле сигнала на различных уровнях фосфорилирования и взаимодействия белок/белок, что определяет их важную роль в иммунных реакциях и в контроле воспалительных процессов. Следует отметить, что наиболее перспективными с точки зрения действия на воспалительные процессы являются ингибиторы фосфодиэстераз ФДЭ1, ФДЭ4 и ФДЭ7

[1-3]. Теофиллин является их типичным представителем и применяется в клинике для лечения бронхообструктивного синдрома различного генеза: бронхиальная астма (препарат выбора при астме физического напряжения и как дополнительное средство при других формах бронхиальной астмы), ХОБЛ (хронического обструктивного бронхита, эмфиземе легких), легочной гипертензии, отека легкого почечного генеза (в составе комбинированной терапии), ночное апноэ и пр. С другой стороны, известно, что ингаляция газообразным оксидом азота (NO) помогает регулировать мышечный тонус в артериях легких и уменьшить легочную гипертензию. Это может снизить потребность в искусственной вентиляции легких, что приводит к уменьшению их повреждения. Среди действующих ингибиторов ФДЭ существуют препараты, содержащие нитрогруппу - потенциально способную генерировать NO в результате ферментативной активации (нимодипин (ингибитор ФДЭ1) или препарат BRL-50481 (ингибитор ФДЭ 7, который увеличивает активность минерализации в остеобластах и применяется для лечения остеопороза). Соединения, содержащие в структуре триазолы, представляют особый интерес, так как, триазолы являются эффективными неконкурентными ингибиторами функций ФДЭ1, ФДЭ 4, ФДЭ 7 и ФДЭ10. При этом 1,2,4-триазольный фрагмент, согласно результатам докинга (например, ФДЭ4В), играет ключевую роль в образовании водородных связей и π - π -стэкинг-взаимодействий с белком.

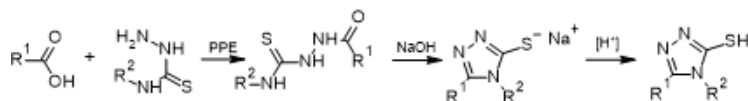
Цель работы состояла в разработке методов синтеза и исследовании строения и свойств новых соединений – доноры NO, нитрозильных комплексов железа (НКЖ) с арилпроизводными 4Н-1,2,4-триазол-3-тиолов, ингибиторов ФДЭ (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристики НКЖ 1-6 и исходных тиолов.

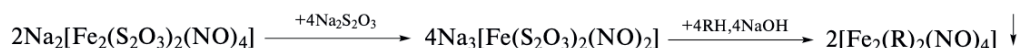
НКЖ	Формула НКЖ/ Мол.вес (г/моль)	Тиол	¹ H ЯМР лиганда (DMSO-d ₆), ppm (J, Hz):
1	[Fe ₂ (C ₁₀ H ₁₀ N ₃ S) ₂ (NO) ₄] 640,23	 L1 5-(фенил)-4-этил-1,2,4-триазол-3-тиол (C ₁₀ H ₁₁ N ₃ S)	1,16 (3H, т, J = 7,1, -CH ₃), 4,05 (2H, к, J = 7,1, -CH ₂ -), 7,58-7,64 (3H, м, Ar-H), 7,68-7,71 (2H, м, Ar-H), 13,94 (1H, с, S-H)
2	[Fe ₂ (C ₁₄ H ₁₀ N ₃ S) ₂ (NO) ₄] 736,29	 L2 4,5-дифенил-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол (C ₁₄ H ₁₁ N ₃ S)	7,30-7,39 (6H, м, Ar-H), 7,43 (1H, т, J = 7,1, Ar-H), 7,48-7,53 (3H, м, Ar-H), 14,14 (1H, с, S-H)
3	Fe ₂ (C ₉ H ₉ N ₄ S) ₂ (NO) ₄ 642,20	 L3 5-(3-пиридил)-4-этил-1,2,4-триазол-3-тиол (C ₉ H ₁₀ N ₄ S)	1,17 (3H, т, J = 7,2, -CH ₃), 4,06 (2H, к, J = 7,2, -CH ₂ -), 7,64 (1H, дд, J ₁ = 7,8, J ₂ = 4,9, Py-H), 8,17 (1H, дт, J ₁ = 7,9, J ₂ = 1,9, Py-H), 8,81 (1H, дд, J ₁ = 4,8, J ₂ = 1,5, Py-H), 8,89 (1H, д, J = 1,8, Py-H), 14,07 (1H, с, S-H)
4	[Fe ₂ (C ₁₀ H ₁₀ N ₆ S) ₂ (NO) ₄] 724,25	 L4 5-[2-(1Н-бензотриазол-1-ил)этил]-4Н-1,2,4-триазол-3-тиол (C ₁₀ H ₁₁ N ₆ S)	3,26 (2H, т, J = 6,8, -CH ₂ -), 5,05 (2H, т, J = 6,8, -CH ₂ -), 7,40-7,47 (1H, м, Ar-H), 7,58 (1H, т, J = 7,6, Ar-H), 7,87 (1H, д, J = 8,4, Ar-H), 8,05 (1H, д, J = 8,4, Ar-H), 13,18-13,37 (2H, м, N-H и S-H)

5	$[\text{Fe}_2(\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{S})_2(\text{NO})_4]$ 778,34	 L5 5-[2-(1H-бензотриазол-1-ил)этил]-4-триазол-3-тиол ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{S}$)	1,17 (3H, т, $J = 7,2$, $-\text{CH}_3$), 3,48 (2H, т, $J = 7,0$, $-\text{CH}_2-$), 3,97 (2H, к, $J = 7,1$, $-\text{CH}_2-$), 5,11 (2H, т, $J = 7,0$, $-\text{CH}_2-$), 7,41-7,45 (1H, м, Ar-H), 7,58 (1H, т, $J = 7,6$, Ar-H), 7,92 (1H, д, $J = 8,3$, Ar-H), 8,05 (1H, д, $J = 8,4$, Ar-H), 13,52 (1H, с, S-H)
6	$[\text{Fe}_2(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{S})_2(\text{NO})_4]$ 876,44	 L6 5-[2-(1H-бензотриазол-1-ил)этил]-4-фенил-1,2,4-триазол-3-тиол ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{S}$)	3,18 (2H, т, $J = 6,8$, $-\text{CH}_2-$), 4,93 (2H, т, $J = 6,9$, $-\text{CH}_2-$), 7,31-7,44 (3H, м, Ar-H), 7,50-7,57 (4H, м, Ar-H), 7,73 (1H, д, $J = 8,3$, Ar-H), 8,04 (1H, д, $J = 8,3$), 13,77 (1H, с, S-H)

Материалы и методы. Тиолы были синтезированы по схеме 1 (PPE- полифосфорный эфир), НКЖ **1-6** были получены по схеме 2.

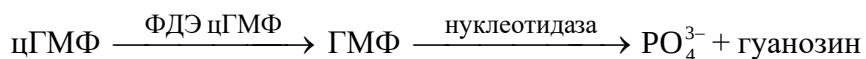


(Схема 1)



(Схема 2)

Строение синтезированных ароматических тиолов подтверждено методом спектроскопии ЯМР ^1H . Строение синтезированных НКЖ в твердой фазе установлено методами элементного анализа, ИК-, ЯГР-, ЭПР спектроскопии и квантовой химии. Активность фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭ цГМФ) определяли в двойной ферментативной системе по количеству выделившихся фосфат-ионов (схема 3), которые образуются на второй стадии из гуанозинмонофосфата (ГМФ) под действием нуклеотидазы [4]. На первой стадии ФДЭ цГМФ гидролизует цГМФ до неактивного метаболита – ГМФ. Исследование цитотоксического действия НКЖ **1-6** выполнялось на нормальных клетках линии Vero (МТТ-тест).



(Схема 3)

Полученные результаты.

В ИК-спектрах поликристаллов НКЖ **1-6** были идентифицированы колебания группы NO в области $1789-1781\text{ см}^{-1}$ и в области $1718-1709\text{ см}^{-1}$ (таблица 2).

Таблица 2 – Значения ν_{NO} для НКЖ 1-6

НКЖ	$\nu_{\text{NO-сим}}$ см^{-1}	$\nu_{\text{NO-асим}}$ см^{-1}	$\Delta \nu_{\text{NO}}$ см^{-1}
1	1881	1709	72
2	1789	1717	72
3	1785	1712	73
4	1785	1718	67
5	1787	1718	69
6	1788	1718	70

Таблица 3 – Значения параметров Мессбауэровских спектров для НКЖ 1-6 ($T=80\text{K}$)

НКЖ	δ_{Fe} , мм/с	ΔE_Q , мм/с	Γ , мм/с
1	0.294(1)	0.919 (1)	0.352 (2)
2	0.300 (1)	0.936 (1)	0.298 (1)
3	0.286 (2)	0.956 (1)	0.288 (1)
4	0.270 (1)	0.974 (2)	0.374 (1)
5	0.283 (2)	1.050 (1)	0.269 (2)
6	0.294 (2)	1,010 (2)	0.386 (1)

Таблица 4 - Параметры спектров ЭПР порошков и растворов НКЖ 1-6.

НКЖ	g-фактор	ΔH , Гс	N	g-фактор	ΔH , Гс	N
1	2,041	137	0,6	2,031	8,7	0,12
2	2,035	98	0,46	2,031	7,5	0,26
3	2,042	99	1,5	2,031	8,5	0,046
4	2,031	61	1,0	2,028	-	0,37
5	2,038	88	1,1	2,031	9,3	0,14
6	2,057	136	0,35	2,031	8,5	0,13

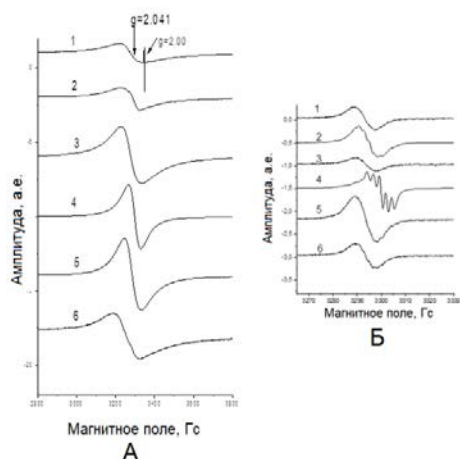


Рис. 1 Спектры ЭПР поликристаллов (А) и растворов (Б) НКЖ 1-6.

Параметр $\Delta \nu_{\text{NO}}$ является эффективным инструментом для определения структурного типа синтезированных НКЖ. Значение разницы $\nu_{\text{NO-NO-сим}}$ и $\nu_{\text{NO-NO-асим}}$ в НКЖ 1-6 составляет $\sim 70 \text{ см}^{-1}$. Этот факт позволяет предположить, что их молекулярные структуры близки, и все они относятся к известному « $\mu\text{-NCS}$ » структурному типу парамагнитных биядерных тетранитрозильных комплексов железа, в которых $\text{Fe} \dots \text{Fe}$ расстояние составляет $\sim 4 \text{ \AA}$. ЯГР спектры порошков НКЖ 1-6 представляют собой одиночные дублеты с параметрами: изомерный сдвиг (δ_{Fe}) и квадрупольное расщепление (ΔE_Q), близкими к таковым для изученных ранее биядерных парамагнитных нейтральных комплексов железа « $\mu\text{-NCS}$ » структурного типа (таблица 3). Все НКЖ в твердой фазе дают только широкие линии (рис.1), и лишь в спектре НКЖ 1 есть линия при $g=2.00$ с $N=7 \cdot 10^5$. В растворах ДМСО НКЖ 1-6 появляется ЭПР сигнал, характерный для мооядерных динитрозильных комплексов: происходит распад биядерных комплексов на мооядерные под действием молекул ДМСО (таблица 4). Подтверждением предполагаемого « $\mu\text{-NCS}$ » строения исследуемых НКЖ 1-6 явилось выполнение квантово-химического моделирования их структуры (на примере НКЖ 4 (рис.2)) и их ИК спектров.

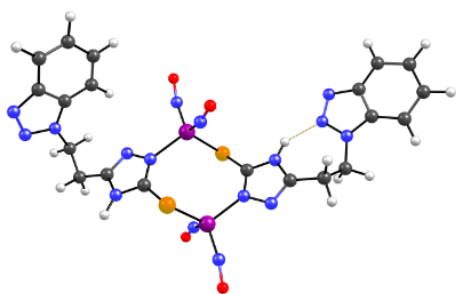
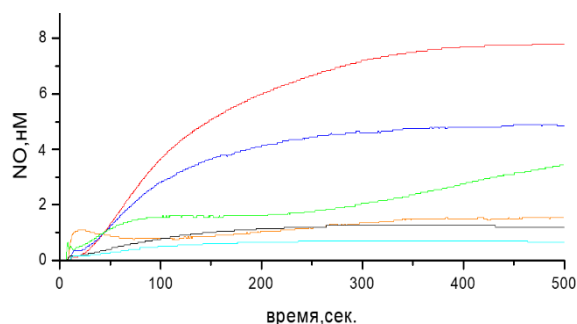


Рис. 2 Оптимизированная геометрия НКЖ 4

Рис. 3 Зависимости концентрации NO, генерируемого НКЖ 1-6 ($0,4 \cdot 10^{-5}$ M) в 1 % водном растворе ДМСО при pH 7,0 и T=25 °C в аэробных условиях от времени (1 ■, 2 ■, 3 ■, 4 ■, 5 ■, 6 ■)

С помощью сенсорного электрода «amiNO-700» системы «in NO Nitric Oxide Measuring System» (Innovative Instruments, Inc., Tampa, FL, USA) установлено, что из всех исследуемых комплексов именно НКЖ 4 наиболее эффективно генерирует NO, а именно ~ 6,8 нМ (рис.3).

Таблица 5 – Ингибирование ФДЭ цГМФ при действии НКЖ 1–6 и тиолов (L1-L6).

Соединение	Ингибирование активности фермента (в % от контроля)		
	Концентрация НКЖ и тиолов		
	0,1 мМ	0,01 мМ	0,001 мМ
1	53,5±3,2	7,0±2,9	0
2	63,4±3,6	53,7±2,6	14,6±4,6
3	77,5±1,7	32,5±3,5	12,5±0,4
4	100,0	69,0±2,1	26,2±1,5
5	81,6±2,0	21,1±3,8	0
6	67,4±4,3	28,3±2,3	19,6±3,2
теофиллин	63±8%	45±5%	30±3%

Тиол	Ингибирование активности фермента (в % от контроля)		
	Концентрация НКЖ и тиолов		
	0,1 мМ	0,01 мМ	0,001 мМ
L1	5,0±3,1	2,5±2,0	0
L2	5,9±2,8	2,9±1,5	0
L3	12,9±4,2	6,5±2,5	3,2±0,1
L4	20,0±4,8	17,1±3,5	8,6±1,3
L5	7,5±2,2	2,5±1,9	0
L6	18,8±3,5	12,5±4,9	3,1±1,5

Все комплексы в диапазоне концентраций 0,01-0,1 мМ оказывают ингибирующее действие на активность ФДЭ цГМФ (Таблица 5). Комплекс 4 является наиболее эффективным ингибитором среди исследованных НКЖ и более активным, чем препарат теофиллин. Тиол L4, входящий в состав НКЖ 4, обладает наиболее выраженной активностью среди исследованных тиолов, но он в 3-5 раз слабее ингибирует функции ФДЭ цГМФ, чем сам комплекс НКЖ 4, т.е. в данном случае связывается с ферментом не только лиганд, но и исходный НКЖ.

Исследование цитотоксического действия позволяет определить потенциал биобезопасности новых соединений. Для его оценки был использован метод МТТ-теста, широко применяемый в токсикологических исследованиях *in vitro* в связи с технологичностью и хорошей воспроизводимостью. В основе метода лежит способность живых клеток в процессе метаболизма восстанавливать желтый краситель МТТ до фиолетового формазана. Интенсивность окрашивания клеток в контроле принимали за 100 %. По снижению или увеличению интенсивности МТТ-окрашивания относительно контроля делали вывод об изменении жизнеспособности клеток в популяции.

В качестве тест-объекта была использована клеточная линия неопухолевых клеток

Vero (почечный эпителий африканской зеленой мартышки), представляющая собой стандартный тест-объект, рекомендованный при исследовании цитотоксичности. В работе действие соединений оценивали как при длительной экспозиции – 72 ч, что позволяет наиболее объективно определить диапазон цитотоксической активности. Установлено, что НКЖ 1, 3 и 4 проявляют низкую цитотоксическую активность, что делает их наиболее перспективными для дальнейших исследований (рис.4).

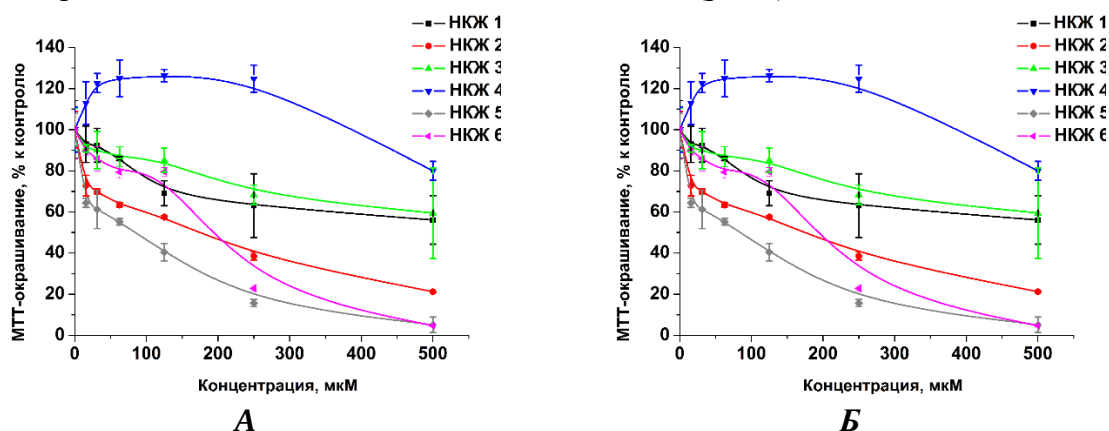


Рис.4 Кривые «доза-эффект» для клеток Vero, 72 ч действия НКЖ 1-6 (А) и тиолов L1-6 (Б).

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Впервые синтезированы нитрозильные комплексы железа, активаторы растворимой гуанилатциклазы с высокой ФДЭ ингибирующей активностью. Способность изученных НКЖ к ингибированию ферментативной функции ФДЭ цГМФ позволяет прогнозировать их высокую терапевтическую активность. Выявленное в результате исследований нетоксичное соединение-лидер НКЖ 4 ($IC_{50} > 500$ мкМ для клеток Vero через 72 ч действия) является потенциальным противовоспалительным препаратом и может быть рекомендовано для дальнейших *in vivo* исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 25-73-20036.

Литература.

1. Laddha S.S., Bhatnagar S.P. A new therapeutic approach in Parkinson's disease: some novel quinazoline derivatives as dual selective phosphodiesterase 1 inhibitors and anti-inflammatory agents // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – 17. – 6796–6802. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.08.041.
2. Jin J., Mazzacuva F., Crocetti L., Giovannoni M.P., Cilibrizzi A. PDE4 Inhibitors: Profiling Hits through the Multitude of Structural Classes// *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – 24. –14. – 11518. DOI: 10.3390/ijms241411518
3. Grewal A.S., Kumar P., Dua J.S., Lather V. Synthesis, Docking and Anti-inflammatory Activity of Some Newer Triazole Derivatives as Potential PDE7 Inhibitors // *Journal of Medicinal Chemistry & Toxicology.* – 2017. – V. 2, № 2. – P. 55-61 DOI:10.15436/2575-808X.17.1392.15436/2575-808X.17.1392.
4. Либинзон Р.Е., Щеколдина Т.Г., Батолкина О.Е., Ягнятинская А.М. Фосфодиэстераза аденозин 3',5'-монофосфата коры головного мозга и действие сердечно-сосудистых препаратов // *Вопросы медицинской химии* – 1977. – Т. 23, №. 4. – С. 526–530.

Сведения об авторе

Наталья Алексеевна Санина

д.х.н., профессор, главный научный сотрудник

ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН (ФИЦ ПХФ и МХ РАН)

г.Черноголовка, Россия.Эл. почта: sanina@icp.ac.ru

Information about author

Natalia A. Sanina

Doctor of Sciences (Chem.), Professor, Chief Researcher

Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences (FRC IPCPMCh RAS) Chernogolovka, Russia.

E-mail sanina@icp.ac.ru

УДК 616.34-06:891-07 + 616 +
612.13
ГРНТИ 31.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.258-275

**В.П. Реутов¹, Н.В. Пасикова¹, Е.Г. Сорокина²,
Л.А. Давыдова³**

¹ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии РАН;

²ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский
центр» здоровья детей Минздрава России ³Белорусский
государственный медицинский университет.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ АЗОТА И КИСЛОРОДА: ВОЗМОЖНОЕ ИХ ВЛИЯНИЕ НА СРЕДНЮЮ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ

В настоящее время известно, что уровень смертности с возрастом увеличивается в геометрической прогрессии. Каковы причины этого явления, и, как можно ему противостоять с учетом достижений современной науки? В работе анализируется роль активных форм азота и кислорода, а также нитрозативного и оксидативного стресса в сокращении средней продолжительности жизни.

Ключевые слова: оксид азота (NO), диоксид азота (NO_2), супероксид (O_2^-), циклы оксида азота и супероксида, продолжительность жизни

V.P. Reutov¹, N.V. Pasikova¹, E.G. Sorokina², L.A. Davydova³

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology
of Russian Academy of Sciences;

²National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of
Health of the Russian Federation;

³Belarusian State Medical University.

REACTIVE FORMS OF NITROGEN AND OXYGEN: THEIR POSSIBLE INFLUENCE ON AVERAGE LIFE EXPECTANCY

It is now known that mortality rates increase exponentially with age. What are the causes of this phenomenon, and how can it be countered given the achievements of modern science? The paper analyzes the role of nitrosative and oxidative stress in reducing average life expectancy.

Key words: nitric oxide (NO), nitric dioxide (NO_2), superoxide (O_2^-), nitric oxide and superoxide cycles, life expectancy

Введение.

Активные формы азота (NO) и кислорода (O_2^-) могут воздействовать практически на все основные компоненты клеток и субклеточных структур [1–3]. В низких концентрациях они выполняют регуляторную функцию [4]. Однако повышение концентрации этих соединений выше определенных значений может приводить к непосредственному взаимодействию NO и O_2^- . В этих условиях возможно образование диоксида азота (NO_2), OH -радикалов и пероксинитритов, вновь распадающихся на NO_2 и OH -радикалы [5]. Таким образом, активные формы азота и кислорода, образующиеся в живых организмах, являются одними из тех факторов, которые могут окислять и повреждать биохимические компоненты, входящие в состав клеток и субклеточных структур [6]. Такие повреждения способны нарушать регуляторные процессы в живых организмах, ускорять процесс старения и развитие многочисленных заболеваний [5–7]. Мы стремились найти такие фундаментальные механизмы, которые предотвращают возможность образования повышенных концентраций активных форм азота и кислорода [8–10]. В наших обобщениях мы также стремились установить преемственную связь между идеями ученых разных поколений. Целью наших исследований было найти то недостающее звено, которое может объединить в единую систему многочисленные достижения физиологии, биохимии и патофизиологии [10–12].

Теории старения и свободные радикалы.

Старение – сложный биологический процесс, а возрастные заболевания населения

во всем мире являются серьезной социальной и медицинской проблемой. В настоящее время существуют более 300 теорий, объясняющих феномен старения. Многие из этих теорий возникают в результате изучения изменений, накапливающихся со временем в организме человека и животных. Среди всех теорий наиболее популярной является свободно радикальная теория старения. Впервые эта теория была постулирована американским геронтологом Денхамом Харманом (1916–2014) (**рис.1**) в 50-х гг. XX века (1954–1956). Первая серьезная публикация Д. Хармана появилась в журнале *The Journal of Gerontology* в 1956 году, когда он опубликовал ставшую знаменитой статью «Старение: теория, основанная на свободных радикалах и радиационной химии». В настоящее время эту статью трудно найти в оригинале, однако о ней можно прочитать, как у Денхама Хармана, так и у его коллег [13–20]. Свободно радикальная теория старения (Free Radical Theory of Aging) в момент своего возникновения казалась для многих невероятной и непонятной. Теперь она является классикой — около 6000 цитирований. Эта теория основана на повреждающем действии химически активных и агрессивных свободных радикалов. К подобным выводам приходили многие исследователи, которые разделяли *свободно радикальную теорию старения*.



Рис.1. Американский геронтолог Денхам Харман (1916–2014), «отец свободно радикальной теории старения». Сам Харман прожил 98 лет. Он не дождался 100-летнего юбилея 1 год и 3 мес.

Механизмы воздействия ионизирующего излучения на живой организм, свободно радикальные механизмы повреждения мембран клеток, природные защитные молекулярные реакции клетки в норме и при гипотермии с 1950 г. изучал член-корреспондент АН СССР/РАН Кузин Александр Михайлович (**рис. 2**).



Рис.2. Кузин Александр Михайлович (1906–1999), прожил 93 года и 2 месяца, член-корреспондент АН СССР/РАН, лауреат Государственной премии СССР (1987) за исследования механизмов лучевой гибели лимфоидных клеток. Награжден орденами и медалями СССР/РАН.

Он был организатором и первым директором Института биологической физики АН СССР (1952–1957), затем заведующим отделом радиобиологии этого института. На основании экспериментальных данных и данных литературы он создал структурно-метаболическую теорию в радиобиологии (1970–1986). В основе этой теории лежит идея о том, что вслед за физическим поглощением энергии в клетке развиваются следующие процессы: 1) радиационно-химические и 2) биохимические механизмы, которые усиливают повреждения биологически важных молекул и макромолекул [21]. Свободно

радикальные продукты, образующиеся в ненасыщенных жирных кислотах фосфолипидов мембран клеток и субклеточных структур, на фоне нитрозативного стресса нашли свое отражение в публикациях [22, 23], а при радиационном воздействии – в публикациях сотрудника Отдела радиобиологии, которым руководил член-корреспондент АН СССР/РАН А.М. Кузин, профессора И.К. Коломийцевой (1928–2022) [24].

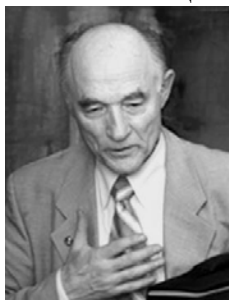


Рис. 3. Владимиров Юрий Андреевич (р. 1932), в настоящее время ему 92 года, академик АМН СССР (1988), РАМН (1992), РАН (2013), Лауреат государственной премии СССР, Заслуженный деятель науки РФ, внес значительный вклад в исследование люминесценции белков, ароматических аминокислот и механизма фотохимических процессов в белковых системах.

С середины 50-х гг. XX века советский и российский ученый Владимиров Юрий Андреевич (**рис. 3**), а затем и Арчаков Александр Иванович (**рис. 4**) стали развивать основы теории патологии клетки как результат свободно радикального повреждения мембранных структур клеток и субклеточных структур активными формами кислорода. В своей книге Владимиров Ю.А. и Арчаков А.И. представили сведения о реакциях цепного окисления ненасыщенных жирных кислот липидов биологических мембранах, приводящих к нарушению проницаемости и повреждению мембранных структур [25].



Рис. 4. Арчаков Александр Иванович (р. 1940), советский и российский врач-биохимик, академик АМН СССР (1991), РАН (2013), член Президиума РАН, лауреат премии имени А.Н. Баха (1982).

Было показано, что центральная роль в реакциях перекисного окисления принадлежит ионам двухвалентного железа. Однако кроме ионов железа в регуляции процесса перекисного окисления липидов участвует целый ряд ферментативных и не ферментативных реакций. Установлено, что процесс перекисного окисления универсально распространен в живых клетках, а его усиление происходит практически всегда при патологических состояниях, завершающихся повреждением и гибелью клеток и субклеточных структур. При физиологических значениях биохимических показателей в нормальных клетках перекисное окисление может регулировать проницаемость мембран [25].

Многие отечественные ученые неоднократно обращались к теории Д. Хармана, сопоставляя результаты собственных исследований с ее основным выводом: старение и смерть наступают в результате накопления повреждений в клетках, нанесенных свободными радикалами в течение жизни. В 70-х годах XX века Д. Харман высказал предположение о том, что митохондрии играют ключевую роль в образовании свободных радикалов, повреждающих клетки [13–17]. Харман не детализировал природу свободных радикалов. Для Хармана свободные радикалы – это любые молекулы или атомы, содержащие один или несколько неспаренных электронов на внешнем электронном уровне. В силу своей природы свободные радикалы являются весьма активными соединениями.

Образуюсь в клетке в результате каких-либо биологических процессов, они могут приводить к повреждению биологических молекул (белков, липидов, нуклеиновых кислот и других, в том числе, низкомолекулярных, компонентов клеток). Накопление большого количества таких повреждений в клетках приводит к нарушению их нормальной работы, и, увеличивают вероятность необратимых изменений, приводящих к смерти [15–17]. В дальнейшем Харман связал *свободнорадикальную теорию старения* со свободными радикалами кислорода, такими как супероксид. Позднее теория Хармана была расширена на действие *супероксида и перекиси водорода/пероксида водорода* [14–17]. Современная теория связывает старение с *окислительным стрессом* в целом. В настоящее время окислительный/оксидативный стресс рассматривают как дисбаланс между образованием свободных радикалов как продуктов реакций метаболизма и антиоксидантными свойствами клеток. В СССР/России свободно радикальную теорию старения развивал физико-химик академик АН СССР Н.М. Эмануэль (**рис. 5**) [26]. Он также пришел к выводу, что свободно радикальные процессы играют важную роль в старении и развитии патологических состояний. При некоторых условиях активные формы кислорода могут увеличивать вероятность перерождения клеток нормальных тканей в злокачественные клетки [27, 28].



Рис. 5. Эмануэль Николай Маркович (1915–1984),
Член-корреспондент АН СССР (1958), академик АН СССР (1966)
советский физико-химик; один из ведущих в СССР специалистов в области кинетики и механизма химических реакций.

В экспериментах профессора А.Н. Саприна, долгое время работавшего в Отделе химической кинетики академика АН СССР Н.М. Эмануэля, было показано, что антиоксиданты малой токсичности, обладают антиканцерогенным действием [28, 29]. Имеются также данные сотрудников Н.М. Эмануэля о возможности использования антиоксидантов малой токсичности в качестве «геропротекторов» [26–29].

В XXI веке новый виток интереса к ингибиторам свободных радикалов возник благодаря труду большой группы ученых под руководством биохимика академика АН СССР/РАН В.П. Скулачёва (**рис. 6**).



Рис. 6. Скулачев Владимир Петрович (1935–2023),
академик АН СССР (1990), РАН (1991), лауреат Государственной премии СССР (1975), Премии имени А.Н. Баха АН СССР (1974), Ломоносовской премии (2014), Демидовской премии (2017). Он также награжден Орденом «За заслуги перед Отечеством» IV степени (2005).

Академик АН СССР/РАН В.П. Скулачёв посвятил всю творческую жизнь изучению функционирования митохондрий [30, 31]. Именно в этих субклеточных структурах протекает большинство окислительных реакций, сопряженных с образованием АТФ [31]. Важную роль в этих процессах играет кислород (O_2), который может восстанавливаться до супероксидного анион-радикала ($\cdot O_2^-$) во время переноса электрона по дыхательной цепи митохондрий в ходе одноэлектронного восстановления O_2 .

Э.К. Рууге (рис. 7) еще в 70-х гг. XX века установил, что при переносе электронов в дыхательной цепи митохондрий возникают свободно радикальные промежуточные продукты различных типов, а свободные радикалы коэнзима Q10 (рис. 8) ответственны за образование в митохондриях активных форм кислорода – $\cdot O_2^-$, $\cdot OH$ -радикалов и H_2O_2 [32]. В совместной статье с В.П. Скулачевым [33], которая называлась «Попытка предотвратить старение: митохондриальный подход», Э.К. Рууге использовал свои более ранние наработки [32].



Рис. 7. Профессор Энно Куставич Рууге (1935–2024)

Свободные радикалы кислорода (в относительно больших количествах) могут образовываться в митохондриях в нормальных физиологических условиях. Существует точка зрения, что свободные радикалы, образующиеся во время транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий, ответственны за повреждение этих субклеточных структур [34–37]. Естественно возникает вопрос, каким образом можно снизить концентрацию активных форм кислорода/азота в митохондриях/митохондриях [34].

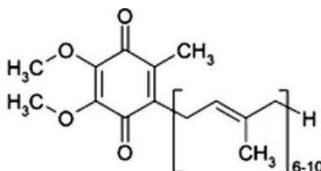


Рис.8. Коэнзим Q10 – один из участников транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий. В настоящее время это соединение также используется в качестве вещества, обладающего антиоксидантным действием подобно жирорастворимым витаминам А и Е.

Окислительные процессы в митохондриях и последствия нарушений этих процессов являются крайне существенными для клеточной патофизиологии [32]. Супероксидные радикалы ($\cdot O_2$), H_2O_2 , гидроксильные радикалы ($\cdot OH$) являются нормальными продуктами клеточного метаболизма. Однако, если они производятся постоянно с большой скоростью как побочные продукты аэробного метаболизма, они могут быть вредными и вызывать повреждения различных компонентов клетки, таких как мембранные липиды, ДНК и белковые комплексы. Поэтому в аэробных клетках работает специальная система защиты, предназначенная для борьбы с активными формами кислорода. Обычные источники реакционноспособных свободных радикалов кислорода хорошо известны. Основным источником оксидантов в клетках являются митохондрии. Эти внутриклеточные органеллы присутствуют в большом количестве во всех клетках и их электрон-транспортная система потребляет 85% кислорода в клетке. Дефицит энергии в клетках, вызванный нарушениями митохондриальных функций, может нарушить нормальные активности клетки и повлиять на способность клеток адаптироваться к различным физиологическим

стрессам. Природные гидрофобные антиоксиданты – коэнзим Q и витамин E – обеспечивают в организме баланс оксидантов и антиоксидантов. Особенно это относится к коэнзиму Q, который локализован как электронный переносчик в митохондриальной дыхательной цепи и обеспечивает связь между комплексами I и III, II и III. В то же время в восстановленной форме коэнзим Q служит эффективным антиоксидантом, предотвращая перекисное окисление липидов в биологических мембранах и липопротеидных частицах, а дефицит его является важным фактором при развитии митохондриальных болезней [32, 33].

В настоящее время не вызывает ни у кого сомнений в том, что митохондрии производят супероксид и перекись водорода/пероксид водорода в белковых комплексах на внутренней мембране между комплексами I и III, II и III, в митохондриальном матриксе и во внутренних мембраносвязанных дегидрогеназах. Однако существуют разногласия относительно того, какие именно участники электронно-транспортной цепи митохондрий вносят наибольший вклад в производство активных форм кислорода. Некоторые исследователи считают, что основной вклад в производство супероксида комплексом I вносят низкопотенциальные железо-серные кластеры. Другие предполагают, что основным производителем супероксида является флавин мононуклеотид, ответственный за генерацию перекиси водорода. Третьи считают, что основным местом производства АФК в нормально функционирующих митохондриях является матрикс. Кроме того, существуют споры относительно точных объемов производства АФК на разных участках дыхательной цепи. Некоторые исследования показывают, что производство наибольшего количества перекиси водорода в комплексе I, другие указывают на комплекс III. Практически все митохондриальные источники O_2^- / H_2O_2 , кроме комплекса III, являются флавинодержащими ферментами. Производство супероксида митохондриями может приводить к окислительному повреждению митохондриальных белков, мембран и ДНК. При этом нарушается способность митохондрий синтезировать АТФ, нарушается цикл трикарбоновых кислот, окисление жирных кислот, цикл мочевины, метаболизм аминокислот, синтез гема и сборка железо-серных кластеров, которые являются центральными для нормальной работы большинства клеток. Окислительное повреждение мембран митохондрий способствует выходу межмембранных белков, таких как цитохром c (cyt c) в цитоплазму и, тем самым, активирует апоптоз клетки [32, 35, 36]. Открытие РТР-поры (permeability transition pore) при окислительном стрессе делает внутреннюю мембрану проницаемой для малых молекул. Следовательно, неудивительно, что окислительное повреждение митохондрий способствует широкому спектру патологий, включая локальные повреждения мембран и отек клеток и субклеточных структур (митохондрий) (рис. 9). Кроме того, локальные повреждения митохондрий и повышение метаболизма арахидоновой кислоты вызывает дополнительное образование высокореакционных свободных радикалов, которые являются одним из основных факторов развития каскада свободно радикальных реакций, вторичного повреждения ненасыщенных жирных кислот и гибели митохондрий. Такие реакции составляют *типовой патологический процесс*, характерный для многих воспалительных заболеваний, гипоксии/ишемии и активации иммунных и аутоиммунных реакций [44].

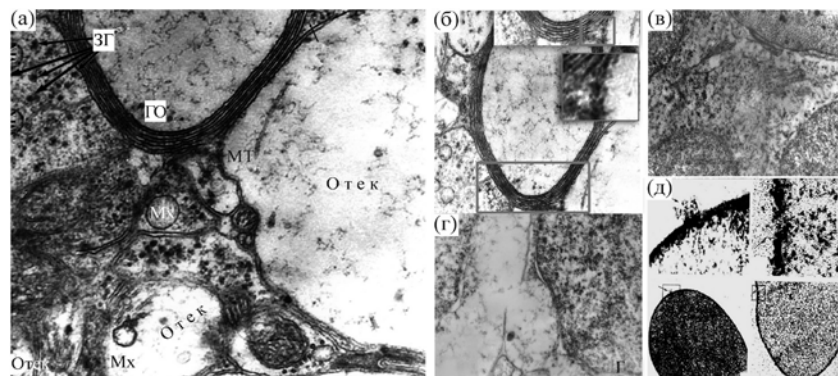


Рис. 9. Неспецифические нарушения и повреждения клеток и субклеточных структур (митохондрий) в условиях, моделирующих активацию оксидативного и нитрозативного стресса при развитии инсульта (глутаматная нейротоксичность) – отек (а) и локальные повреждения мембран (б–д): (б) – в глиальных клетках, образующих многоядные «обкрутки» вокруг зон отека и повреждения нейронов (на врезках – зоны повреждения); (в) и (г) – в слое зернистых клеток мозжечка (от локальных повреждений до слияния клеток); (д) – перераспределение белков из растворимого в мембранно-связанное состояние в эритроцитах и локальные повреждения эритроцитарных мембран [8]. DOI: 10.31857/S0006302924050122, EDN: MJPEXM

Известно, что антиоксиданты, как правило, с большим трудом проходят внутрь митохондрий. Особенно, в необходимых количествах. В 2005 году В.П. Скулачев предложил митохондриальный антиоксидант SkQ1 (ион Скулачёва), химическое название – пласто-хинонилдецилтрифенилфосфония бромида или бромид [10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония] (рис. 9).

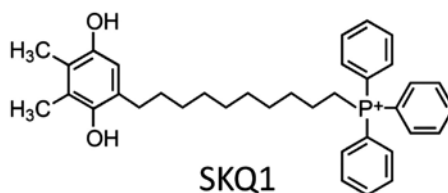


Рис. 10. Ион SkQ1 – класс митохондриально-направленных антиоксидантов, разработанных под руководством академика АН СССР/РАН В.П. Скулачева. В широком смысле слова SkQ представляет липофильный катион. Он состоит из двух основных частей: остатка пластохинона и трифенилфосфония. Полное химическое его название [10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфония]. Антиоксидант SkQ1 (ион Скулачева) обладает уникальной способностью проникать и накапливаться в митохондриях клеток https://skq.one/assets/images/skq/idea/ion/cell_674x450.png

История открытия иона SkQ1. В конце 60-х годов XX века В.П. Скулачев (1935–1992) и его коллеги в МГУ, совместно с группой профессора Е.А. Либермана (1925–2011) в Институте проблем передачи информации АН СССР, были заняты проверкой справедливости хемиосмотической гипотезы Питера Дениса Митчелла (1920–1992). Этот ученый получил за формулировку хемиосмотической гипотезы Нобелевскую премию по химии (1978). П. Митчелл постулировал отрицательный заряд внутри митохондрий и наличие разности электрических потенциалов на мембране митохондрий. В.П. Скулачев и Е.А. Либерман (**рис. 11**) для подтверждения гипотезы П. Митчелла применили необычные молекулы, которые имеют положительный электрический заряд. Однако в виду того, что эти молекулы имеют положительный заряд и липофильный жирнокислотный хвост, можно было ожидать, что они смогут проникать внутрь отрицательно заряженных митохондрий через биологические мембраны, образованные двойным слоем липидов.



Рис. 11. Либерман Ефим Арсентьевич советский и российский биофизик (1925–2011) (канд. физ.-мат. наук) и физиолог (доктор биологических наук), лауреат Государственной премии СССР (1975). В последние годы жизни разрабатывал концепцию молекулярного компьютера как одной из клеточных функций. В соответствии с идеей Либермана, работа молекулярного клеточного компьютера реализуется посредством программ, связанных с последовательностями нуклеотидов ДНК и РНК, и выполняется соответствующими ферментами, действующими как процессоры, которые работают с этими последовательностями нуклеотидов, представляющими адреса и команды.

В.П. Скулачев и Е.А. Либерман показали это в изящном эксперименте, а результаты своих исследований опубликовали в 3-х статьях в журнале Nature [38–40]. В 1974 г. такие соединения были названы «ионами Скулачева» известным американским биохимиком Дэвидом Е. Грином – директором Института энзимологии в Мэдисоне (США, административный центр штата Висконсин),

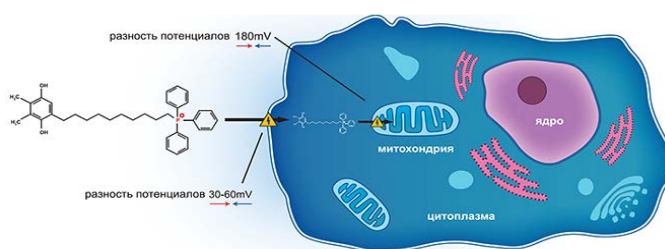


Рис.11. Проникновение иона SkQ1 внутрь митохондрии. Основное свойство иона SkQ1 состоит в том, что он блокирует апоптоз – самоликвидацию клетки, запускаемую свободными радикалами – активными формами кислорода и азота. Эти соединения образуются в различных тканях при воспалительных и дегенеративных процессах. https://skq.one/assets/images/skq/idea/iony/cell_674x450.png

Таким образом, с 2005 года В.П. Скулачев возглавил проект по созданию препарата – геропротектора на основе митохондриально-адресованного антиоксиданта, который способен, как мечтал Харман, проникать внутрь митохондрий, перехватывая радикалы в местах их массового образования [34–37]. В настоящее время этот антиоксидант продается в аптеках России как *Визомитин* — лекарственный препарат от возрастной катаракты. В последнее десятилетие ученики, коллеги и сын В.П. Скулачева – М.В. Скулачев, продолжают решать большую научную проблему. Они выясняют, можно ли доказать существование программы старения с помощью количественного анализа динамики смертности [37]. Возможно, впереди этих ученых ждет большое открытие: доказательство того, что существует программируемое старение млекопитающих и появятся новые перспективы для терапии процесса старения [35, 37].

Теломеры и старение. Согласно другой теории, учитывающей роль генетического аппарата в процессе старения, существует некий предел деления клетки, из-за которого и происходит старение организма. Автором этой теории является профессор анатомии Калифорнийского университета Леонард Хейфлик (**рис.12**). Л. Хейфлик экспериментально определил, что количество делений большинства клеток человеческого

организма не превышает 50–60 раз. Исчерпав лимит, клетки погибают, а организм стареет. Однако Хейфлик не объяснил, почему существует этот предел. Американские ученые Герман Джозеф Мёллер (1890–1967) и Барбара Мак-Клинтон (1902–1992) еще в тридцатые годы обратили внимание на концевые последовательности хромосом (рис. 9). Они назвали участки хромосом, состоящие в клетках позвоночных из шести повторов нуклеотидов (TTAGGG) ДНК, теломерами. В каждой теломере человека последовательность TTAGGG повторяется от 100 до 1000 раз. В настоящее время ученые считают, что человек рождается с длиной теломер 15–20 тыс. пар нуклеотидов, а умирает через 50–60 делений клеток с длиной около 5–7 тыс. пар нуклеотидов.



Рис. 12. Леонард Хейфлик (1928–2024), профессор анатомии Калифорнийского университета.

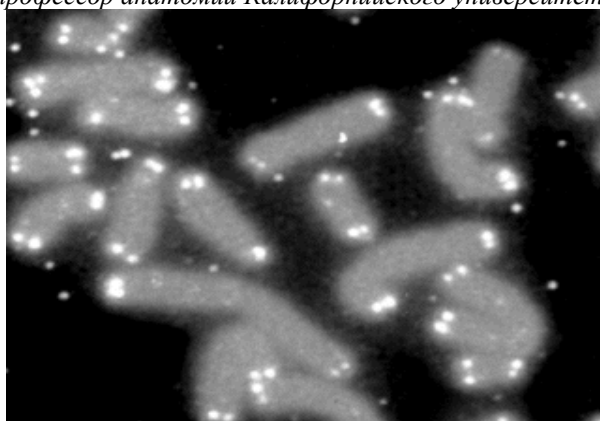


Рис. 13. Теломеры расположены на концах хромосом. В состав теломер позвоночных входит большое количество повторов (TTAGGG) нуклеотидов ДНК. Гуаниновые основания ДНК (GGG) особо чувствительны к воздействию активных форм азота и кислорода. Показано, что хромосомы чётко различимы в световом микроскопе только в период митотического или мейотического деления клеток. Используя специальные флуоресцентные метки, теломеры можно окрасить так, чтобы они были видимы в световой микроскоп, а по цвету отличались от центральных частей каждой хромосомы. Световые пятна на концах хромосом, представленные на рис. 13 – это и есть теломеры. [https:// trends.rbc.ru](https://trends.rbc.ru)

Герман Джозеф Мёллер (**Рис. 14**) – лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1946) «за открытие появления мутаций под влиянием рентгеновского облучения». Американский цитогенетик Барбара Мак-Клинтон (**Рис. 15**) была удостоена Нобелевской премией по физиологии и медицине значительно позднее (1983) «за открытие мобильных генетических элементов».



Рис.14. Герман Джозеф Мёллер (1890–1967) – лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1946) «за открытие появления мутаций под влиянием рентгеновского облучения».



Рис. 15. Барбара Мак-Клинток (1902–1992) – лауреат Нобелевской премии (1983) «за открытие мобильных генетических элементов».

В 1971 году советский и российский ученый Алексей Матвеевич Оловников (**рис.17**), объяснил старение клеток недорепликацией концевых участков хромосом – теломер.



Рис. 17. Алексей Матвеевич Оловников (1936–2022), ведущий научный сотрудник Института биохимической физики РАН, биолог-теоретик, специалист в области биологии старения, теоретической молекулярной и клеточной биологии, лауреат Демидовской премии РАН (февраль 2010).

А.М. Оловников предположил, что в соматических клетках при каждой репликации из-за особенностей работы ферментов репликации (ДНК-полимеразы) недореплицируются концевые участки хромосом – теломеры. Он же предсказал существование **теломеразы** – фермента, добавляющего особые повторяющиеся последовательности нуклеотидов ДНК (TTAGGG у позвоночных) к 3'-концу цепи ДНК на участках теломер, которые располагаются на концах хромосом в эукариотических клетках.

Наиболее активный период изучения теломер пришелся на 80-е годы XX века и продолжился вплоть до начала XXI века. В 1985 году американские генетики Кэрл Грайдер (Carol Greider) и Джек Шостак (Jack Szostak) обнаружили в клетках фермент теломеразу, а в 1998 году им удалось «омолодить» культуру клеток с помощью этого фермента. В дальнейшем эти ученые пришли к такому же выводу, как и А.М. Оловников: **в соматических клетках при каждой репликации из-за особенностей работы ферментов репликации (ДНК-полимеразы) недореплицируются концевые участки хромосом – теломеры.**

В 2009 году «за открытие того, как теломеры и связанный с ними фермент теломераза защищают хромосомы» Элизабет Блэкберн (р. 1948), Кэрол Грейдер (р. 1961) и Джек Шостак (р. 1952) были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине.



Рис. 18. а) А.М. Оловников (1936–2022) – лауреат Демидовской премии (февраль 2010); б) Элизабет Блэкберн (р. 1948), в) Кэрол Грейдер (р. 1961); г) Джек Шостак (р. 1952) – лауреаты Нобелевской премии по физиологии и медицине (2009)

Как сказано в пресс-релизе Нобелевского комитета, лауреаты смогли решить «главную проблему в биологии – установить, как в процессе размножения клеток копируются хромосомы», что помогло понять сам механизм старения клеток. Бывший научный руководитель А.М. Оловникова академик РАН В.П. Скулачев вместе с другими учеными выдвигал в 2009 году кандидатуру Оловникова на соискание Нобелевской премии. Он считал «очень несправедливо, что российский ученый, предсказавший значительно раньше это явление, не получил Нобелевскую премию, а лауреаты, подтвердившие это явление, Нобелевскую премию получили». В.П. Скулачев и Е.А. Либерман, доказавшие экспериментально хемиосмотическую гипотезу П. Митчелла и опубликовавшие 3 статьи в журнале «Nature», остались без Нобелевской премии. Нобелевскую премию по химии (1978) тогда получил английский химик П. Митчелл, который сформулировал хемиосмотическую гипотезу.

Какое отношение имеют активные формы азота и кислорода к теломерным концам хромосом? Известно, что хромосомы укорачиваются с возрастом. Как это происходит и как их длина связана с продолжительностью жизни? Исследования показывают, что старение организма связано с укорачиванием теломер. Однако оно не сводится к нему. Старые клетки есть и в молодом организме. Разница в том, что с возрастом их становится все больше: накопление старых клеток приводит к дегенеративным процессам, которые, в свою очередь, приводят к возрастным заболеваниям.

Во время деления клетки длина теломерных концов хромосом сокращается на 30–200 пар оснований. Потери концевой ДНК делают невозможной бесконечную пролиферацию. При укорочении хромосом до определенного размера индуцируются процессы клеточного старения. Таким образом, длина теломерных повторов хромосом, согласно существующим представлениям, может служить мерой пролиферативного потенциала клеток. Теломерные повторы имеют большое количество остатков гуанина (повтор TTAGGG). Гуаниновые основания ДНК (в повторах TTAGGG) особенно чувствительны к воздействию активных форм азота и кислорода. Оксидативный и нитрозативный стресс являются одной из основных причин систематического повреждения ДНК. В результате воздействия оксидативного и нитрозативного стресса происходит накопление окисленного гуанина (8-оксигуанина) [41–43]. Это приводит к ингибированию активности теломеразы. В таких условиях проблема концевой недорепликации ДНК при участии теломеразы становится особенно острой. Таким образом, в условиях оксидативного и нитрозативного стресса активируются процессы старения, которые ведут к снижению продолжительности жизни. Накопление 8-оксигуанина в отсутствии адекватной репарации приводит к одно – и двухцепочечным разрывам ДНК, которые вызывают нестабильность

генома (рис. 19, 20).



Рис. 19. Хромосомы и ДНК. [https:// trends.rbc.ru](https://trends.rbc.ru)

У разных людей концевые участки хромосом – теломеры по мере старения становятся короче с разной скоростью. Ученые исследовали некоторые факторы, которые приводят к более быстрому, чем обычно, укорачиванию теломер и, вероятно, к преждевременному старению. Что укорачивает теломеры? Длительный психологический стресс, гипоксия/ишемия, проблемы с сердцем и сосудами, избыточный вес, воздействие вредных веществ и особенно, активных форм азота и кислорода. Что поддерживает длину теломер? Умеренная физическая нагрузка, умеренное и сбалансированное питание, кратковременное голодание, природные антиоксиданты и пища, богатая омега-3 жирными кислотами.

Некоторые ученые считают, что чем длиннее теломеры, тем больше у человека шансов прожить долгую жизнь. Однако обычная клетка не просто так ограничивает количество своих делений. Чем дольше она живет, тем больше в ней накапливается поломок и изменений, которые развиваются под влиянием вредных факторов внешней среды. Имеются основания предполагать, что чем длиннее теломеры, тем выше шанс дожить до развития онкологического заболевания.

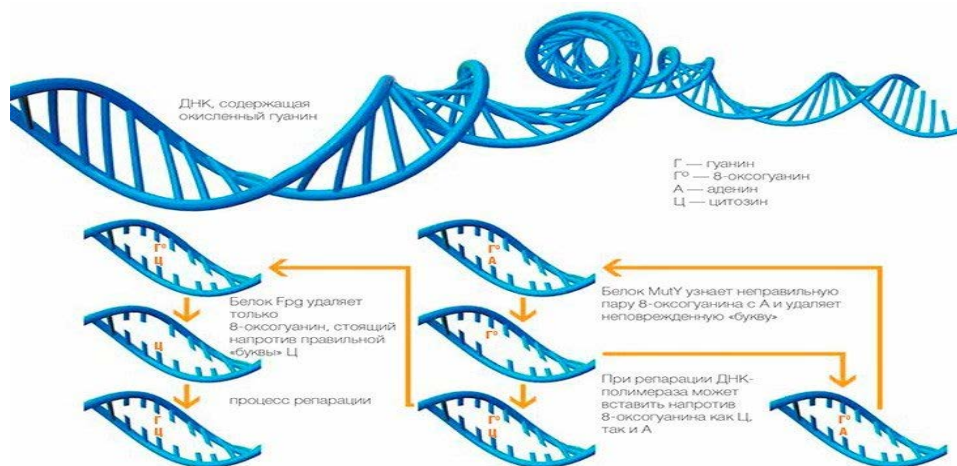


Рис. 20. Накопление 8-оксигуанина (8-гидроксигуанина, OH8Gua) – одного из наиболее распространенных продуктов окисления ДНК, в отсутствии адекватной репарации приводит к одно – и двухцепочечным разрывам ДНК, которые вызывают нестабильность генома. Известно также, что система репарации в районе теломерных концов ДНК работает значительно хуже, чем в геноме в целом. Все это приводит к концевой недорепликации теломерных участков ДНК. [https:// trends.rbc.ru](https://trends.rbc.ru)

Циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала. Выход концентраций активных форм азота и кислорода за пределы регуляторных возможностей биохимических антиоксидантных систем приводит к нарушению циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала [12, 44]. С точки зрения этой концепции повреждение мембран клеток и субклеточных структур при токсическом воздействии глутамата является следствием образования при указанных выше нарушениях высокореакционного

соединения – диоксида азота, способного участвовать в цепных свободно радикальных реакциях и окислять основные биохимические компоненты, входящие в состав живых организмов: ДНК/РНК (гуаниновые основания в первую очередь); жирные кислоты (ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов мембран); белки (SH-группы серосодержащих аминокислот и OH-группы тирозиновых остатков белков, с последующим образованием нитротирозина). Эта концепция хорошо согласуется с представлениями о том, что любая «болезнь начинается с недостаточности регуляторных механизмов» (Р. Вирхов) и представляет собой, прежде всего, «дизрегуляторную патологию» (Г.Н. Крыжановский). И, еще всегда необходимо помнить слова Л.А. Орбели: «Мы мало считаемся с тем, что все процессы осуществляются циклически и каждый процесс имеет свою цикличность».

В цикле оксида азота (рис.21 а) можно выделить NO-синтазную компоненту: L-аргинин $\rightarrow$ NO $\rightarrow$ NO₂/NO₃⁻ (1), в ходе которой происходит образование NO в присутствии кислорода [9]. Эти реакции были установлены в 80-х годах XX века.

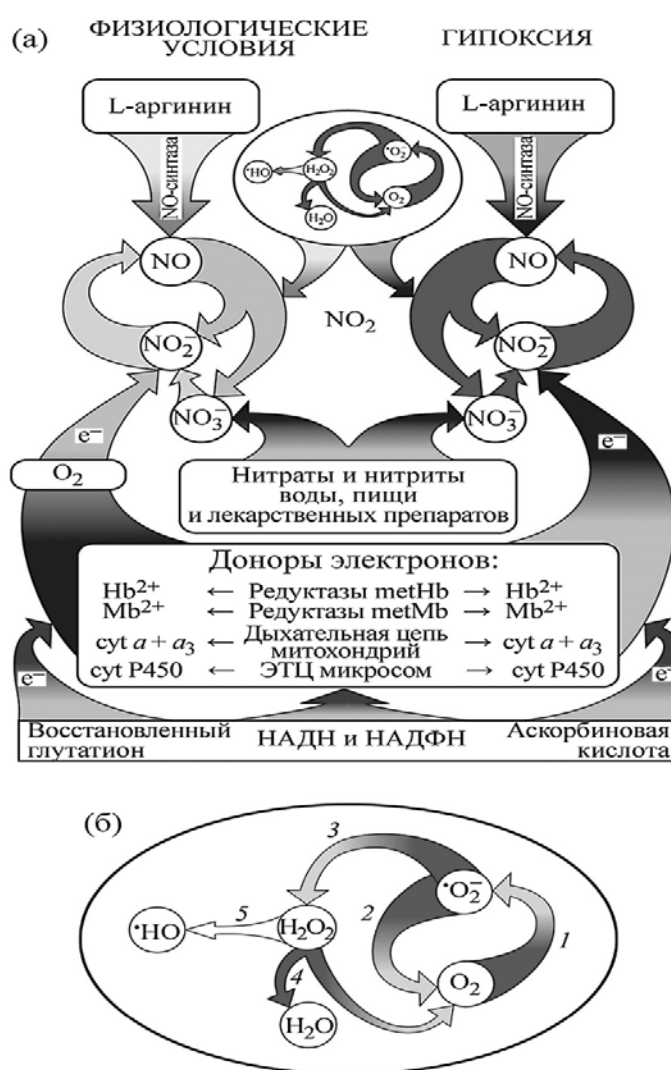


Рис. 21. Циклы оксида азота (а) и супероксидного анион-радикала (б)

Ионы NO₂⁻, образующиеся из L-аргинина или поступающие в организм, могут вновь при участии нитритредуктазных систем, включающих в себя гемоглобин (Hb), миоглобин (Mb) и цитохромы (cyt a + a₃ и cyt P450), замыкать в цикл цепочку «L-аргинин $\rightarrow$ NO $\rightarrow$ NO₂⁻ /NO₃⁻». Кислород, связываясь с гемом, ингибирует

нитритредуктазную активность этих белков. При гипоксии и функциональной нагрузке, когда гемсодержащие белки переходят в дезокси-форму, ионы NO_2^- начинают активно восстанавливаться в NO , акцептируя электроны с этих гемсодержащих белков. Вместе с тем необходимо отметить, что активная утилизация L-аргинина при гипоксии/ишемии может происходить лишь в течение относительно короткого промежутка времени (около часа). Это обусловлено тем, что количество этой условно-незаменимой аминокислоты в крови и тканях весьма ограничено. Один из многочисленных смыслов *цикла оксида азота* состоит так же и в том, чтобы минимизировать безвозвратные потери дефицитного для организма L-аргинина.

В *цикле супероксидного анион-радикала* (рис. 21 б) происходят: 1 — восстановление O_2 и образование супероксидного анион-радикала (O_2^-); 2 и 3 — реакции дисмутации супероксида, катализируемые супероксид-дисмутазой; 4 — разложение пероксида водорода (H_2O_2) на воду (H_2O) и молекулярный кислород (O_2), осуществляемое ферментом каталазой; 5 — пероксид водорода (H_2O_2) также разлагается с образованием двух молекул $\text{OH}^\bullet$ -радикала. Циклическая регуляция активных форм азота и кислорода обеспечивает превращение этих активных, высокореакционных соединений в менее активные вещества. При нарушении *циклов оксида азота* и *супероксидного анион-радикала* появляются еще более активные молекулы диоксида азота и пероксинитритов, вновь распадающихся на $\text{NO}_2^\bullet$ и $\text{OH}^\bullet$ -радикалы, которые повреждают основные биохимические компоненты живых организмов.

Согласно развиваемым нами представлениям *циклы оксида азота* и *супероксидного анион-радикала* (рис. 21 а, б) являются теми регуляторными механизмами, которые не допускают взаимодействия $\text{NO}^\bullet$ с O_2^- и образования $\text{NO}_2^\bullet$, анионов пероксинитритов [49] и после протонирования вновь распадаются с выделением $\text{NO}_2^\bullet$ и $\text{OH}^\bullet$ -радикалов, порождая тем самым, патогенетические циклы [44]. *Цикл оксида азота* вместе с гемсодержащими белками, связывающими избыток $\text{NO}^\bullet$, а также *цикл супероксидного анион-радикала* (O_2^-) вместе с супероксиддисмутазами (СОД-1, СОД-2, СОД-3), каталазами и пероксидазами, нейтрализующими и разлагающими O_2^- и H_2O_2 , можно сравнить с графитовыми стержнями в системе регулирования цепных реакций в ядерном реакторе. Таким образом, регуляторные *циклы оксида азота* и *супероксида* обеспечивают протекание физиологических реакций, завершающихся образованием ионов NO_3^- (цикл $\text{NO}^\bullet$) и молекул H_2O (цикл O_2^-), а избыточное образование $\text{NO}_2^\bullet$ и $\text{OH}^\bullet$ -радикалов запускает развитие патогенетических циклов реакций с участием диоксида азота ($\text{NO}_2^\bullet$) и $\text{OH}^\bullet$ -радикалов, усиливающих вред первоначально незначительных и некритичных изменений в организме.

Важную роль для формулировки концепции цикла оксида азота сыграли механизмы нитритредуктазной реакции в крови и тканях млекопитающих, которые были обнаружены в нашей работе (рис. 22) и подтверждены через 20 лет в работе зарубежных коллег (рис. 23).

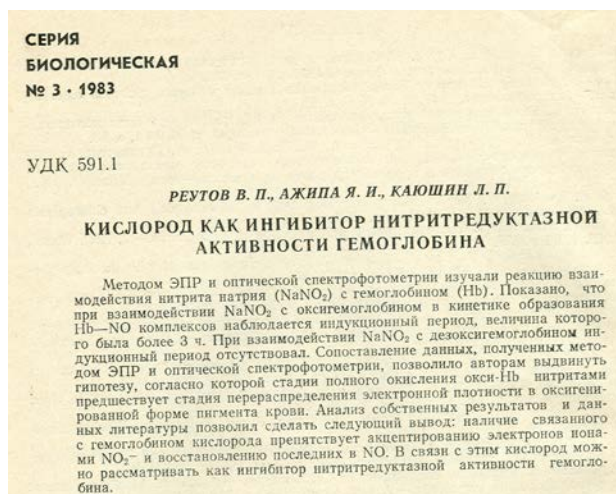


Рис. 22. Статья сотрудников Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР (Ажипа Я.И., Реутов В.П.) и сотрудника Института химической физики АН СССР (Каюшин Л.П.), опубликованная в журнале «Известия АН СССР, сер. биологическая», 1983, №3, с.408–418. Эти данные открыли новое направление в проблеме NO в биологии и медицине. Они легли в основу концепции цикла оксида азота и позволили внести их в Отчет академика-секретаря Отделения физиологии АН СССР (1963–1983), академика АН СССР П.Г. Костюка. В этой статье была показана нитритредуктазная активность дезоксигемоглобина и способность кислорода выполнять функцию ингибитора восстановления ионов NO_2^- в NO при участии пигмента (Hb) крови. В зависимости от концентрации нитритов и содержания кислорода количество высокореакционных свободно радикальных молекул NO и NO_2 может существенно изменяться, что, в свою очередь, влияет на повреждающие/токсические свойства этих молекул (особенно, NO_2), способных окислять/повреждать ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран клеток, митохондрий и других субклеточных структур.

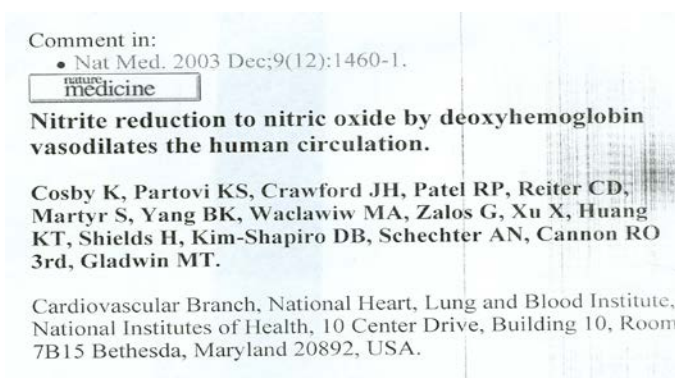


Рис. 23. Большая группа ученых, состоящая из 16 специалистов из Национального Центра Здоровья (Bethesda, USA), через 20 лет (2003) опубликовала статью в престижном журнале Nature Medicine, в которой в ходе независимых исследований, по сути дела, подтвердила результаты исследований указанных выше российских авторов. Они смогли внимательно отнестись к экспериментальным данным, опубликованным в Изв. АН СССР, сер. биол. 1983, №3, с.408–418. В 2009 году один из авторов (В.П.Р.) был приглашен в качестве докладчика (invited special guest) на Конференцию в Стокгольм (Nitrite-2009), которая завершилась публикацией статьи в журнале Nature Chemical Biology, 2009, 5 (12) P.865–869 [45]. Зарубежные ученые более 3000 раз процитировали статьи российских исследователей (В.П.Р., Е.Г.С.) в своих работах, опубликованных в журналах с высоким значением импакт-фактора. Цитирование не прекратилось и в последние годы. За короткое время статья, опубликованная в Nature Chem. Biol.,–2009,–V.5,№12.–P.865–869 [45], была процитирована свыше 800 раз.

Некоторые ученые «за открытие роли оксида азота в функционировании сердечно-сосудистой системы человека» были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине. Роберт Ф. Ферчготт (1916–2009), Луис Дж. Игнаро (р. 1941) и Ферид Мурад (1936–2023) (**рис. 24**, слева направо) стали Нобелевскими лауреатами по физиологии и медицине (1998).



Рис. 24. Нобелевские лауреаты по физиологии и медицине (1998) Роберт Ф. Ферчготт (1916–2009), Луис Дж. Игнаarro (р. 1941) и Ферид Мурад (1936–2023).

Заключение. Уровень смертности с возрастом увеличивается в геометрической прогрессии [44]. Для того чтобы ответить на вопрос о причинах этого явления, был проведен анализ достижений современной науки о роли активных форм азота и кислорода в механизмах повреждения клеток, субклеточных структур (митохондрий) и концевых участков хромосом – теломер, которые содержат половину (50%) весьма чувствительных к окислению гуаниновых оснований в повторах TTAGGG ДНК. Проведенный анализ позволяет сделать вывод: активные формы азота и кислорода, а также нитрозативный и оксидативный стресс могут быть основной причиной сокращения средней продолжительности жизни населения. Среди всех активных форм азота и кислорода наиболее реакционноспособными и потенциально опасными являются диоксид азота ($\cdot\text{NO}_2$) и $\cdot\text{OH}$ -радикалы [44–50]. Именно эти соединения начинают активно продуцироваться при гипоксии/ишемии, воспалительных процессах, активации иммунных и аутоиммунных реакций, при которых нарушаются регуляторные физиологические циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала (рис. 21) и активируются патогенетические циклы реакций с участием диоксида азота ($\cdot\text{NO}_2$) и $\cdot\text{OH}$ -радикалов, усиливающие вред первоначально незначительных и некритичных изменений в организме.

Работа выполнена при поддержке РАН

Литература

1. Hassan H.A., Ahmed H.S., Hassan D.F. Hum. Antibodies. – 2024. – V. 32, №4. – P.151–167.
2. Zaric B.L., Macvanin M.T., Isenovic E.R. Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2023. –V.154.–P. 106346.
3. Kehrer J.P., Klotz L.O. Crit. Rev. Toxicol. – 2015. – 45, №9. – 765–798.
4. Dröge W. Physiol Rev. – 2002. – V.82, №1. –P.47-95.
5. Lakshmi S.V., Padmaja G., Kuppusamy P., Kutala V.K. Indian J. Biochem. Biophys. – 2009. – V.46, №6. – P.421 – 440.
6. Misra M.K., Sarwat M., Bhakuni P., Tuteja R., Tuteja N. Med. Sci. Monit. – 2009. – V.15, №10. – P.209–219.
7. Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S. Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.–2005.–V.25, №1.–P.29–38.
8. Самосудова Н.В., Реутов В.П. Морфология. –2015. –Т.148, №5.–С.32–37.
9. Reutov V.P., Sorokina E.G. Biochemistry (Mosc). – 1998. – V.63, №7. – С.874–884.
10. Reutov V.P. Biochemistry (Mosc). – 1999. – V.64, №5. – P.528 – 542.
11. Reutov V.P., Schechter A.N. –Physics-Uspekhi. – 2010. – V.53, №4. –P.377–396.
12. Reutov V.P., Davydova L.A., Sorokina E.G. Biophysics (Oxf). –2022. –V.67, №5. –P. 816–834.
13. Harman D. Mutat Res. – 1992. – V.275, №3-6. P.257–266.
14. Harman D. Drugs Aging. – 1993. – V.3, №1. – P.60–80.

15. Harman D. *Mol Cell Biochem.* – 1988. – V.84, №2. – P.155–161
16. Harman D. *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1981. – V.78, №11. – P.7124–7128.
17. Harman D. *J Am Coll Nutr.* – 1982. – V.1, №1. – P.27–34.
18. Kozina L.S., Arutjunyan A.V. *Curr Aging Sci.* – 2017. – V.10, №1. – P.:2.
19. de Grey A.D. *Rejuvenation Res.* – 2014. – V.17, №6. – P.479–480.
20. Ashok B.T., Ali R. *Exp Gerontol.* – 1999. – V.34, №3. – P.293–303.
21. Kuzin A.M. *Radiobiologiya.* – 1967. – V.7, №5. – P.744–750.
22. Реутов В. П., Ажипа Я. И., Каюшин Л. П. Докл. АН СССР, сер. биол. –1978. –Т. 241, №6. –С. 1375–1377.
23. Реутов В. П., Ажипа Я. И., Каюшин Л. П. Бюлл. эксперим. биол. и медицины.–1978. №9. –С.299–301.
24. Коломийцева И. К. Радиационная биохимия мембранных липидов. М.: Наука, 1989.
25. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М.: Наука, 1972.
26. Emanuel N.M. *Q Rev Biophys.* – 1976. – V.9, №2. – P.283–308.
27. Emanuel N.M. *Izv Akad Nauk SSSR Biol.* – 1974. №6. – P. 773–784..
28. Saprin A.N., Klochko E.V., Chibrikin V.M., Krugliakova K.E., Emanuel' N.M. *Biofizika.* – 1966. –V.11, №3. –P.443–452. Russian. PMID: 4299235.
29. Saprin A.N., Kalinina E.V., Shuliakovskaia T.S. *Farmakol. Toksikol.* – 1987. – V.50, №3. – P.81–84. Russian. PMID: 3111882.
30. Skulachev V.P. *Eur. J. Biochem.* – 1992. –V.208, №2. – P.203–209.
31. Skulachev V.P. *J. Membr. Biol.* – 1990. – V.114, №2. – P.97–112.
32. Kashkarov K.P., Vasil'eva E.V., Ruuge E.K. *Biokhimiya.* 1994. – V.59, №6. – P.813–818.
33. Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Erichev V.P., Filenko O.F., Kalinina N.I., Kapelko V.I., Kolosova N.G., Kopnin B.P., Korshunova G.A., Lichinitser M.R., Obukhova L.A., Pasyukova E.G., Pisarenko O.I., Roginsky V.A., Ruuge E.K., Senin I.I., Severina I.I., Skulachev M.V., Spivak I.M., Tashlitsky V.N., Tkachuk V.A., Vyssokikh M.Y., Yaguzhinsky L.S., Zorov D.B. *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – V.1787, №5. – P.437–461.
34. Skulachev V.P. *Russ. J. Gen. Chem.* – 2010. – V. 80. – P.1523–1541.
35. Skulachev M.V., Skulachev V.P. *Biochemistry (Mosc).* – 2017. – V.82, №12. – P.1403–1422.
36. Skulachev V.P. SkQ1 treatment and food restriction--two ways to retard an aging program of organisms. *Aging (Albany NY).* 2011 Nov;3(11):1045-50. doi: 10.18632/aging.100410. PMID: 22170754; PMCID: PMC3249450.
37. Shilovsky G.A., Putyatina T.S., Lysenkov S.N., Ashapkin V.V., Luchkina O.S., Markov A.V., Skulachev V.P. *Biochemistry (Mosc).* –2016. V.81, №12. – P.1461–1476.
38. Skulachev V.P., Sharaf A.A., Liberman E.A. *Nature.* –1967. –V.216, №5116. – P.718–719.
39. Liberman E.A., Topaly V.P., Tsofin L.M., Jasaitis A.A., Skulachev V.P. *Nature.* –1969. – V. 222, №5198. –P.1076–1078.
40. Drachev L.A., Jasaitis A.A., Kaulen A.D., Kondrashin A.A., Liberman E.A., Nemecek I.B., Ostroumov S.A., Semenov A.Yu., Skulachev V.P. *Nature.* –1974. –V.249, №455. – P.321–324.
41. Есипов Д.С., Горбачева Т.А., Реутов В.П. *Физиологический журнал (Киев).* –2008. – Т.54, №4. –С.68.
42. Есипов Д.С., Есипова О.В., Зиневич Т.В. и др. *Вестник МИТХТ.* –2012. –Т.7, №1. –С. 59–63.
43. Есипов Д.С., Сидоренко Е.В., Зиневич Т.В. и др. *Вестник МИТХТ.* –2010. – Т.5, №3. –С. 69–74.
44. Реутов В.П., Пасикова Н.В., Сорокина Е.Г. *Биофизика.*–2024.–Т.69, №5.–С.1044–1077.
45. Lundberg J.O., Gladwin M.T., Ahluwalia A., et al. *Nature Chem. Biol.* –2009.–V.5, №12,– P865–869.
46. Reutov V.P., Sorokina E.G., Shvalev V.N., *Uspekhi fiziologicheskikh nauk.*–2012.–V.43, №4.– P.30–58.
47. Reutov V.P., Okhotin V.E., Shuklin A.V., *Uspekhi fiziologicheskikh nauk.*–2007–V.38, №4.– P.39–58.
48. Sukmansky O.I., Reutov V.P., *Uspekhi fiziologicheskikh nauk.*–2016.–V.47, №3.–P.73–93.
49. Reutov V.P., Samosudova N.V., Sorokina E.G. *Biophysics.*–2019.–V.64, №2.–P.233–25

50. Menshikova E.B., Zenkov N.K., Reutov V.P. *Biochemistry (Moscow)*.–2000.–V.65, №4.– P.409–426

Сведения об авторах

Валентин Палладиевич Реутов

докт. биол. наук, ведущий научный сотрудник

Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН

Москва, Россия

Эл. почта: valentinreutov@mail.ru

Наталья Викторовна Пасикова

канд. биол. наук, главный научный сотрудник

Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН

Москва, Россия

Эл. почта: natpas@mail.ru

Елена Геннадьевна Сорокина

канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник

Национальный медицинский исследовательский
центр здоровья детей Минздрава России

Москва, Россия

Эл. почта: sorokelena@mail.ru

Людмила Александровна Давыдова

канд. мед. наук, доцент

Белорусский государственный медицинский
университет

Минск, Белоруссия

Эл. почта: la-davydova@yandex.by

Information about author

Valentin Palladievich Reutov

Doctor of Biol. Science, Leading Researcher

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of
Russian Academy of Sciences, Moscow

Moscow, Russian Federation

E-mail: valentinreutov@mail.ru

Nataliya Viktorovna Pasikova

PhD, канд. биол. наук, chief researcher

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of
Russian Academy of Sciences, Moscow

Moscow, Russian Federation

Москва, Россия

E-mail: natpas@mail.ru

Elena Gennad'evna Sorokina

PhD., Leading Researcher

National Medical Research Center for Children's Health of
the Ministry of health of the Russian Federation

Moscow, Russian Federation

E-mail: sorokelena@mail.ru

Lyudmila Alexandrovna Davydova

Ph.D., Associate Professor

Belarusian State Medical University
Minsk, Belorussia

E-mail: la-davydova@yandex.by

УДК 616.062

ГРНТИ 31.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.275-282

Е.Г. Сорокина¹, В.П. Реутов², Ж.Б. Семенова³, О.В. Глоба¹,
О.В. Карасева³, В.Г. Пинелис¹, И.Е. Смирнов¹

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России,

²ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

³НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы

ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА, ГЛУТАМАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ОКСИД АЗОТА

В статье представлены клинко-экспериментальные данные исследований на протяжении длительного времени (1980–2020). Начало положили исследования содержания глутаминовой кислоты (Glu) в крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) у детей при различных патологиях, сопровождающихся гипоксией головного мозга (перинатальная гипоксия, нарушение мозгового кровообращения, гидроцефалия и нейрорейкоз). С начала

XXI века эти данные дополнились исследованием глутаматных рецепторов (GluRc) у детей с эпилепсиями и черепно-мозговой травмой (ЧМТ). Полученные результаты позволили оценить роль оксида азота (NO) и продуктов его превращения в функциональной активности рецепторов глутамата (GluRc) и показать участие NO в защитных и повреждающих процессах мозговой ткани.

Ключевые слова: Глутаминовая кислота (Glu), глутаматные рецепторы (GluRc), оксид азота (NO), гипоксия головного мозга у детей, эпилепсии (Э), черепно-мозговая травма (ЧМТ)

**E.G. Sorokina¹, V.P. Reutov², J.B. Semenova³, O.V. Globa¹,
O.V. Karaseva³, V.G. Pinelis¹, I.E. Smirnov¹**

¹National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation,

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences;

³ Research Institutes of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology

GLUTAMIC ACID, GLUTAMATE RECEPTORS AND NITRIC OXIDE

The article presents clinical and experimental research data over a long period of time (1980–2020). The beginning was the study of the content of glutamic acid (Glu) in the blood and CSF in children with various pathologies accompanied by cerebral hypoxia (perinatal hypoxia, cerebrovascular accident, hydrocephalus and neuroleukosis). Since the beginning of the 21st century, these data have been supplemented by the study of glutamate receptors (GluRc) in children with epilepsy and traumatic brain injury (TBI). The results obtained made it possible to evaluate the role of nitric oxide (NO) and its conversion products in the functional activity of glutamate receptors (GluRc) and to show the involvement of NO in protective and damaging processes of brain tissue.

Key words: Glutamic acid (Glu), glutamate receptors (GluRc), nitric oxide (NO), cerebral hypoxia, newborn children with cerebral circulatory disorders, epilepsy (E), traumatic brain injury (TBI)

Введение

Роль полифункциональной глутаминовой кислоты (глутамат, Glu) при нарушении мозгового кровообращения и гипоксии мозга изучали с 70-х гг. 20 века [1]. Glu является основным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе (ЦНС). Обеспечивая возбуждающую нейротрансмиссию, Glu активирует глутаматные рецепторы (GluRc), связанные с поступлением кальция [2]. Нарушение поддержания внутриклеточной и внеклеточной концентрации Glu приводит к увеличению внеклеточной Glu [3]. Это способствует эффекту эксайтотоксичности, при котором происходит перегрузка нервных клеток кальцием (Ca^{2+}) и запуск многочисленных патофизиологических путей, ведущих к гибели нейронов [4]. Острая и хроническая Glu эксайтотоксичность и оксид азота (NO) играют ведущую роль в механизмах гибели нейронов при гипоксии мозга, которая сопровождается нарушениями мозгового кровообращения, инсультами, эпилепсией, черепно-мозговую травму (ЧМТ) и нейродегенеративные заболевания [5,6].

Цель работы. П

редставить и оценить данные о содержании глутаминовой кислоты в крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) и функциональной активности рецепторов глутамата у детей с различными патологиями мозга, ведущей среди которых является гипоксия головного мозга.

Материалы и методы.

Все исследования в клинике проведены в рамках государственных программ и определялись исключительно клинической необходимостью. Тяжесть гипоксических повреждений мозга у новорожденных детей оценивалась по шкале Апгар, тяжесть

состояния детей с черепно-мозговой травмой (ЧМТ) – по шкале комы Глазго (ШКГ) и шкале исходов Глазго (ШИГ). Всего в исследовании приведены данные, полученные от новорожденных детей с нарушениями мозгового кровообращения (79), врожденной гидроцефалией (36), острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), осложненным нейрорлейкозом (58), эпилепсиями и пароксизмальными состояниями (42), ЧМТ (159). Содержание глутаминовой кислоты (Glu), глутамина (Gln), аммиака (NH_3) и биохимические параметры гипоксии (глюкоза, лактат) определены в СМЖ и крови новорожденных детей с нарушениями кровообращения с помощью ферментных методов с использованием наборов Boehringer (Германия). Содержание аутоантител (аАТ) к NMDA и AMPA GluRc определяли иммуноферментными методами, описанными в работе Дамбиновой С.А. [7]. Содержание оксида азота и продуктов его превращения оценивали по суммарному содержанию нитритов и нитратов ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) по методу Грисса (наборы Calbiochem, R&D Systems).

Полученные результаты.

Анализ полученных данных свидетельствовал о том, что с ростом гипоксических повреждений мозга у новорожденных детей снижался уровень глюкозы, увеличивалось содержание лактата, белка, аммиака и Glu, нарастала проницаемость ГЭБ (Табл. 1). Напротив, снижалась концентрация Gln, что свидетельствует о нарушении «глутаматного цикла» (Glutamate/GABA-Glutamine Cycle) в мозге [8]. У детей с врожденной гидроцефалией так же, как и у перенесших внутриутробную гипоксию новорожденных детей, в СМЖ увеличивалось содержание Glu, белка и сывороточного альбумина (СА). После лечения в группе детей с удовлетворительным состоянием отмечена нормализация всех показателей за исключением Glu. Лечение в группе детей с тяжелым состоянием оказывалось малоэффективным, содержание СА, Glu и проницаемость ГЭБ оставались повышенными (Табл. 2). Изучение взаимосвязи тяжести повреждения мозговой ткани с повышением содержания основной фракции сывороточных белков – СА и Glu было проведено нами у детей с различной степенью тяжести врожденной гидроцефалии и детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), осложненным нейрорлейкозом (Табл. 3).

Табл. 1. Содержание глутаминовой кислоты, глутамина, аммиака и белка в спинномозговой жидкости новорожденных детей, родившихся с гипоксией (данные представлены в $M \pm m$ НМК – нарушение мозгового кровообращения; данные для здоровых новорожденных взяты из литературных источников: Vissacorgu et al., 1964; Heiblim et al., 1978; Tikanoja et al., 1982; Цветанова, 1986; *,*** - $p < 0,05$; 0,001 с группой «здоровых» новорожденных детей)

Показатели СМЖ	Доношенные новорожд. дети		Недоношенные новорожденные дети			Группа сравнения новорожд. дети
	Гипоксия средней тяжести	Тяжелая гипоксия	Гипоксия средней тяжести НМК I ст.	Тяжелая гипоксия НМК II ст.	Тяжелая гипоксия НМК III ст.	Данные литературы
Количество обследованных детей (n)	(8)	(12)	(31)	(20)	(8)	
Оценка при рождении по шкале Апгар (баллы)	5-7	5	6-7	4-6	4-5	10
Глюкоза (моль/л)	3,2±0,9	3,8±0,6	3,0±0,2	2,6±0,2	1,7±0,4*	2,2-3,9
Лактат (моль/л)			1,9±0,2	2,7±0,4*	5,8±0,1***	1,5±0,2
Белок (г/л)	1,00±0,13	1,63±0,12*	0,92±0,07	1,41±0,26***	2,28±1,13***	0,22-0,86
Глутаминовая К-та (мкмоль/л)			36,6±5,0	117,3±37,9***	329,4±74,7***	3,6-61,0
Глутамин (мкмоль/л)			682±79	912±143,0	429±150,2	660±200

Показатели СМЖ	Доношенные новорожд. дети		Недоношенные новорожденные дети			Группа сравнения новорожд. дети
Аммиак (мкмоль/л)			27,5±5,9*	29,2±8,0*	188±98***	11,9-20,0
Градиент СМЖ/кровь для глутаминовой К-ты			0,06±0,03*	0,36±0,09***	1,28±0,46***	0,02-0,08

Табл. 2. Показатели СМЖ у детей с врожденной гидроцефалией до (А) и после (Б) лечения (* – достоверные различия по сравнению с группой здоровых детей. Проницаемость ГЭБ оценивалась по концентрационному градиенту $K_{CA} = [CA]_{СМЖ} / [CA]_{сыворотки\ крови} \times 1000$).

Группы детей	Белок, г/л	СА, г/л	Глу, мкмоль/л	К СА
Удовлетвор. Состояние	А: 0.39±0.01 Б: 0.22±0.05	А: 0.20±0.04 Б: 0.09±0.02	А: 165±28* Б: 139±36*	А: 3 ± 1.5 Б: 2.8 ± 0.2
Тяжел. сост-е	А: 1.00±0.39 * Б: 0.67± 0.12*	А: 0.60±0.01* Б: 0.42±0.02*	А: 192 ± 16* Б: 241 ± 15*	А: 19 ± 4* Б: 12 ± 2*
Здоровые дети (Цветанова, 1986)	< 0,45	< 0,35	4–50	< 9

У детей с ОЛЛ, осложненным появлением лейкоэмических очагов в мозге, на фоне повышенной проницаемости ГЭБ содержание общего белка, его основной фракции СА и Glu в СМЖ было также повышено по сравнению с группой детей с ОЛЛ, находящихся в ремиссии (Табл. 3).

Табл. 3. Показатели СМЖ у детей с острым лимфобластным лейкозом, осложненным нейрорлейкозом (* – достоверные различия с группой ремиссии).

Группы	Белок, г/л	СА, г/л	Глу, мкмоль/л	К СА
Ремиссия	0,46 ± 0,02	0,23 ± 0,01	57 ± 4	3,4 ± 0,3
Нейрорлейкоз	0,73 ± 0,05 *	0,36 ± 0,02 *	95 ± 13*	15,5 ± 4,2*

Во многих случаях содержание СА в СМЖ и коэффициент проницаемости ГЭБ для СА имели прогностическое значение. Так, в случаях летального исхода нейрорлейкоза, коэффициент проницаемости ГЭБ для СА при повторных пункциях в процессе лечения имел тенденцию к повышению. В случаях же перехода нейрорлейкоза в ремиссию, концентрация СА и Glu в СМЖ в процессе лечения неуклонно снижалась. Таким образом, на большом клиническом материале нами получены общие закономерности, заключающиеся в том, что, чем более выраженные повреждения мозга отмечались у детей с различными гипоксическими повреждениями ЦНС, тем более высокие значения содержания Glu, общего белка и СА отмечались в СМЖ. Прямая связь тяжести гипоксического повреждения мозга и увеличения Glu способствовали проведению новых работ, в которых тяжесть состояния детей с гипоксией оценивалась по гиперстимуляции GluRc и увеличению уровня аАТ к GluRc. У детей всех возрастов с судорожной активностью было выявлено одновременное повышение в крови аАТ к AMPA -типу GluRc и содержания цГМФ (косвенный показатель NO), что позволяло предположить роль NO в феномене образования аАТ (Табл. 4 и 5).

Табл. 4. Концентрация аАТ к аутоантител к АМРА (GluR1) в сыворотке крови у детей (в $M \pm m$; в нг/мл и в % по отношению к контролю) (* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; в круглых скобках представлено число исследований).

Возрастные группы	Эпилепсия + Эписиндромы	Пароксизмальные состояния неэпилепт. генеза	Группы контроля
До 1 года (нг/мл)	$1,58 \pm 0,32$ (13) $195 \pm 39\%*$	$1,22 \pm 0,15$ (8) $151 \pm 18\%*$	$0,81 \pm 0,22$ (10) $100 \pm 27\%$
1 год–6 лет (нг/мл)	$2,09 \pm 0,12$ (36) $167 \pm 10\%*$	$1,74 \pm 0,37$ (14) $139 \pm 29\%$	$1,25 \pm 0,12$ (10) $100 \pm 10\%$
6 лет–16 лет (нг/мл)	$2,36 \pm 0,35$ (52) $163 \pm 24\%*$	$1,7 \pm 0,53$ (17) $117 \pm 36\%$	$1,45 \pm 0,19$ (15) $100 \pm 13\%$

Табл. 5. Содержание цГМФ в плазме крови у детей с эпилепсией и пароксизмальными состояниями неэпилептического генеза (*, **, *** - $p < 0,05$, 0,01 и 0,001 по сравнению с уровнем цГМФ у здоровых детей - $10,9 \pm 1,0$ пмоль/мл; данные представлены в $M \pm m$ в пмоль/мл плазмы крови; в круглых скобках представлено число исследований)

Возрастные группы	Эпилепсия	Пароксизм. состояния	Неврологическ. контроль
2 мес.- 1 год	$75,4 \pm 26,9^{***}$ (8)	$138,5 \pm 44,1^{***}$ (4)	$47,1 \pm 23,1^{**}$ (4)
1 год – 6 лет	$45,7 \pm 7,0^{***}$ (21)	$42,6 \pm 10,0^{***}$ (9)	$18,4 \pm 2,8^*$ (6)
6 лет – 12 лет	$39,6 \pm 6,4^{***}$ (25)	$40,2 \pm 3,0^{***}$ (6)	$16,9 \pm 3,2^*$ (7)

Прямое участие NO в образовании аАТ к GluRc было показано нами в экспериментах на животных при введении животным NO-генерирующего соединения NaNO_2 .

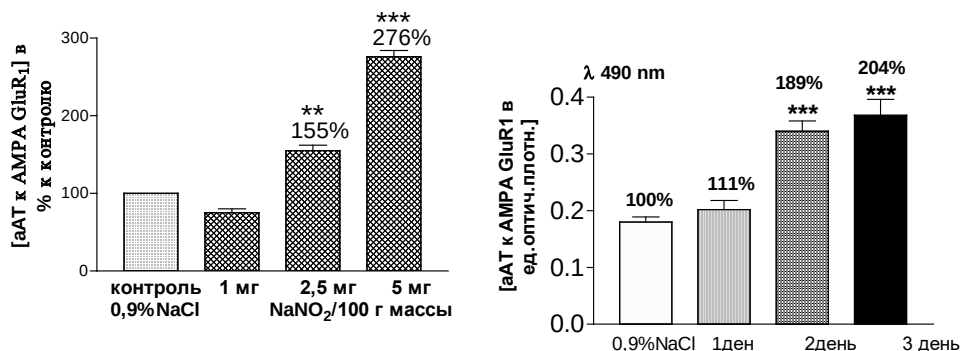


Рис. 1. NO-генерирующее соединение повышает в сыворотке крови крыс уровень аАТ к GluRc

Связь образования аАТ к другому типу GluRc – NMDA(NR2) с повышением концентрации NO была показана нами в многочисленных исследованиях у детей, перенесших ЧМТ [9, 10].

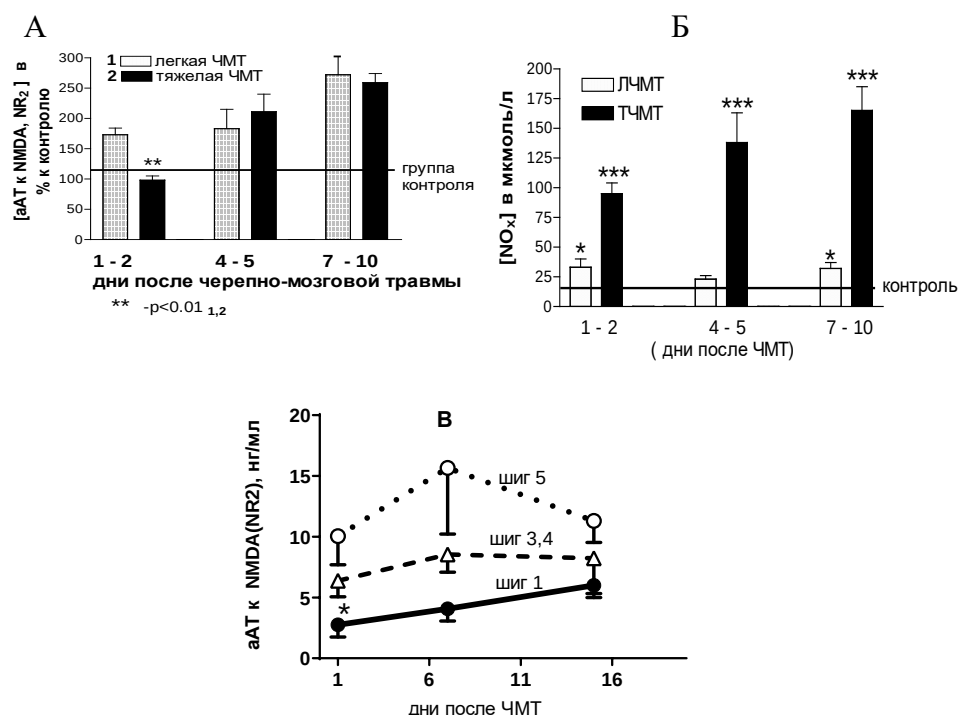


Рис. 2. Динамика содержания аАТ к NMDA GluRc (А) и NO (Б) в крови детей с легкой и тяжелой черепно-мозговой травмой (ЛЧМТ и ТЧМТ) и различными исходами тяжелой ЧМТ (В: ШИГ 1 – летальный исход (ШИГ 3,4) инвалидизация (ШИГ 5- выздоровление).

Одним из последствий токсического действия Glu при гипоксии мозга является развитие аутоиммунного ответа, что выражается в возрастании уровня аАТ к AMPA- и NMDA-типам GluRc [11, 12]. Показано, что NO способен регулировать деятельность иммунной системы [13]. Полученные нами результаты показали, что содержание аАТ к GluRc и NO у детей с ЧМТ возрастает с 1-го по 15 день, что, скорее всего, является следствием развития вторичной гипоксии головного мозга. Повышение содержания аАТ в 1-й день после ЧМТ связано с активацией DAMPs (danger associated molecular partens), к числу которых относится молекула АТФ [14]. Учитывая ранее полученные данные [10], мы полагаем, что NO через DAMPs повышает содержание аАТ к GluRc сразу после травмы мозга и снижает гиперстимуляцию GluRc, что защищает нейроны мозга от гипоксических повреждений.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

1. Увеличение содержания глутаминовой кислоты в СМЖ пропорционально тяжести гипоксических повреждений мозга.
2. Увеличение содержания глутаминовой кислоты в СМЖ на фоне повышенного альбумина способствует более выраженным повреждениям мозга.
3. Гиперстимуляция GluRc обусловлена повышением Glu, концентрация которого может увеличиваться вследствие нарушения цикла глутамат/ГАМК-глутамин и нарушает равновесие возбуждающих и тормозящих сигналов.
4. Судорожные состояния у детей протекают на фоне повышенного содержания NO, который способствует образованию аАТ к GluRc.
5. аАТ к GluRc и NO играют существенную роль в патогенезе ЧМТ у детей и выполняют двойственную функцию.
6. Более высокий уровень аАТ к рецепторам глутамата сразу после тяжелой ЧМТ является благоприятным признаком для исхода ЧМТ, а продолжающееся увеличение содержания аАТ к GluRc и NO после 2х недель может отражать вторичную гипоксию и способствовать неблагоприятным исходам ЧМТ

Авторы выражают благодарность профессору Рошалю Леониду Михайловичу за многолетнюю поддержку научных исследований по патогенезу черепно-мозговой травмы у детей, а также глубокую благодарность профессору Жуковой Тамаре Павловне, Кошелю Игорю Васильевичу, Масловой Ольге Ивановне, Яцык Галине Викторовне, при которых были начаты исследования.

Литература

1. Раевский К.С. Возбуждающие аминокислоты, глутаматные рецепторы и патология центральной нервной системы. Журнал патофизиология и экспериментальная терапия.–1990.–Т. 3.–С. 3–9.
2. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain Chris J. , Menniti Frank S. , Vance Katie M , Kevin K. Ogden, Kasper B. Hansen, Hongjie Yuan, Scott J. Myers, Ray Dingledine Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. Pharmacological Reviews.–2010.–V.62, №3, P.405–496
3. Homola A, Zoremba N, Slais K, Kuhlen R, Syková E. Changes in diffusion parameters, energy-related metabolites and glutamate in the rat cortex after transient hypoxia/ischemia. Neurosci Lett.–2006.–V.404, №1-2.–P.137–142.
4. Wang Y., Qin Z.H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. Apoptosis: an international journal on programmed cell death.–2010.–V.15, №11.–P.382–1402.
5. Choi D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. 1988. Neuron, V.1, №8. –P.623–634.
6. Раевский К.С. Оксид азота – новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии центральной нервной системы. Бюлл. эксперимент. биол. и мед. –1997. №5. –С. 484–490.
7. Dambinova S.A., Aliev K.T., Bondarenko E.V., Ponomarev G.V., Skoromets A.A., Skoromets A.P., Skoromets T.A., Smolko D.G., Shumilina M.V. The biomarkers of cerebral ischemia as a new method for the validation of the efficacy of cytoprotective therapy. Zh. Nevrol. Psikiatr. Im S. S. Korsakova.–2017.–V.117, №5.–P.62–67.
8. Andersen J.V. The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle: Insights, Updates, and Advances. Journal of neurochemistry.–2025.–V.169, №3.–P.e70029.
9. Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Bazarnaya N.A., Meshcheryakov S.V., Reutov V.P., Goryunova A.V., Pinelis V.G., Granstrem O.K., Roshal L.M. Autoantibodies to glutamate receptors and products of nitric oxide metabolism in serum in children in the acute phase of craniocerebral trauma. Neuroscience and behavioral physiology. V.39, №4. –P. 329–334.
10. Sorokina E.G., Semenova Z.B., Reutov V.P., Arsenieva E.N., Karaseva O.V., Fisenko A.P., Roshal L.M., Pinelis V.G. Brain Biomarkers in Children After Mild and Severe Traumatic Brain Injury. Acta neurochirurgica.–2021. Supplement, 131.–P.103–107.
11. Dambinova S.A., Khounteev G.A., Izykenova G.A., Zavolokov I.G., Ilyukhina A.Y., Skoromets A.A. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. Clin Chem.–2003.–V.49. №10.–P.1752–1762.
12. Dambinova S.A. Biomarkers for transient ischemic attack (TIA) and ischemic stroke. Clin. Lab. Int. –2008.–V.32, №7.–P.7–10.
13. Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Карасева О.В., Семенова Ж.Б., Пинелис В.Г., Смирнов И.Е., Бакаева З.В. Влияние NO-генерирующих соединений на содержание аденозинтрифосфата в лимфоцитах и связи с уровнями аутоантител к рецепторам глутамата у детей, перенёсших черепно-мозговую травму. Российский педиатрический журнал.–2024.–V.27, №3.–P.161–167.
14. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. Trends Immunol.–2015. – V.36, №3.–P.161–178.

Сведения об авторах

Елена Геннадьевна Сорокина

канд. биол. наук., ведущий научный сотрудник ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России
Москва, Россия

Эл. почта: sorokelena@mail.ru

Валентин Палладиевич Реутов

докт. биол. наук, ведущий научный сотрудник

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Москва, Россия; Эл. почта: valentinreutov@mail.ru

Жанна Борисовна Семенова

докт. мед. наук, профессор, рук. отд. нейротравмы, НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы
Москва, Россия

Эл. почта: j.seman@mail.ru

Ольга Витальевна Карасева

докт. мед. наук, руководитель отдела сочетанной травмы, анестезиологии-реанимации, НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы
Москва, Россия

Эл. почта: karaseva.o@list.ru

Всеволод Григорьевич Пинелис

д-р биол. наук, профессор, главн. науч. сотр., ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России

Эл. почта: pinelis@mail.ru

Иван Евгеньевич Смирнов

доктор мед. наук, профессор, нач. методического отдела ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Эл. почта: smirnov@nczd.ru

Information about author

Elena Gennadievna Sorokina

Ph.D., Leading Researcher
National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of Health of Russia
Moscow, Russian Federation
E-mail: sorokelena@mail.ru

Valentin Palladievich Reutov

Doctor of Biol. Science, Leading Researcher
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation
E-mail: valentinreutov@mail.ru

Zhanna Borisovna Semenova

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Neurotrauma, Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology of the Department of Health of the City of Moscow
Moscow, Russian Federation
E-mail: j.seman@mail.ru

Olga Vitalievna Karaseva

Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Combined Trauma, Anesthesiology-Intensive Care, Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology of the Department of Health of the City of Moscow
Moscow, Russian Federation
E-mail: karaseva.o@list.ru

Vsevolod Grigorievich Pinelis

Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Scientific Officer, "National Medical Research Center for Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation
E-mail: pinelis@mail.ru

Ivan Evgenievich Smirnov

Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief of Methodology Department, "National Medical Research Center for Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation
Moscow, Russian federation; E-mail: smirnov@nczd.ru

УДК 577.152.3

ГРНТИ 31.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.283-288

Л.А. Савлущинская, В.П. Дерягина,

Н.И. Рыжова, Л.В. Кривошеева

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

ЭКСПРЕССИЯ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗ В АДЕНОКАРЦИНОМАХ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

Определение экспрессии эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в аденокарциномах толстой кишки человека показало высокую частоту их выявляемости, при низкой или умеренной степени иммунореактивности к антителам изоферментов. Наличие отдаленных метастазов или метастазов в лимфатических узлах повышает вероятность усиления экспрессии iNOS и eNOS в прилежащих тканях. Низкие или умеренные уровни экспрессии изоферментов могут способствовать опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: индуцибельная NO-синтаза (iNOS), эндотелиальная NO-синтаза (eNOS), аденокарцинома толстой кишки человека.

L.A. Savluchinskaya, V. P. Deryagina, N.I. Ryzhova, L.V. Krivosheeva
FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the
Ministry of Health of the Russian Federation

EXPRESSION OF INDUCIBLE AND ENDOTHELIAL NO SYNTHASES IN HUMAN COLON ADENOCARCINOMAS

Determination of the expression of endothelial (eNOS) and inducible NO synthase (iNOS) in human colon adenocarcinomas showed a high frequency of their detection with a low or moderate degree of immunoreactivity to antibodies of isoenzymes. The presence of distant metastases or metastases in the lymph nodes increases the likelihood of increased expression of iNOS and eNOS in adjacent tissues. Low or moderate levels of isoenzyme expression can contribute to tumor progression.

Key words: inducible NO-synthase (eNOS), endothelial NO-synthase (eNOS), human colon adenocarcinoma.

Введение.

Колоректальный рак входит в тройку основных причин смертности во всем мире. Согласно обновленным данным МАИР, в 2022 году колоректальный рак был одним из наиболее распространенных как по количеству новых случаев (9,6%), 3-е место), так и по количеству смертей (9,3%, 2 место) [1, с. 1]. Оксид азота (NO) играет важную роль в качестве молекулы-посредника прогрессии разных типов раковых клеток. Повышение уровня NO напрямую связано с избыточной экспрессией индуцибельной NOS (iNOS) и эндотелиальной NOS (eNOS) и с усилением миграции, инвазии, ангиогенеза и метастазирования рака [2-4, с. 1]. Важно отметить, что NO играет ключевую роль во многих сигнальных путях при колоректальных карциномах, таких как пути Wnt/ β -катенин и внеклеточной сигнальной киназы (ERK), которые тесно связаны с возникновением рака, метастазированием, воспалением и химио- и радиорезистентностью [5, с. 1]. На культурах клеточных линий толстой кишки HRT-18 and HT-29 было показано, что NO, продуцируемое iNOS или обработка клеток донором NO усиливала инвазию клеток аденокарциномы [6, с.1]. Активация другой изоформы – eNOS приводила к стимулированию роста эндотелиальных клеток и изменению кровотока в опухоли [7, с.1]. Исследована причинно-следственная связь между повышением уровня экспрессии iNOS и риском развития колоректального рака. Так, фармакологическое или генетическое подавление экспрессии iNOS приводит к уменьшению количества полипов в кишечнике [8, с.1]. Однако,

большинство работ посвящено роли iNOS и очень редко – роли eNOS в колоректальном канцерогенезе.

Цель работы.

Определение экспрессии iNOS и eNOS в аденокарциномах толстой кишки (АТК) и прилежащих к ним тканях у человека.

Материалы и методы.

Пациенты и сбор тканей

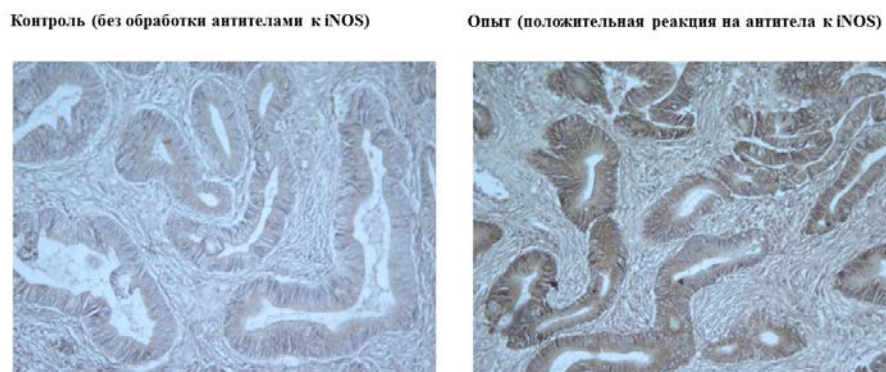
Образцы были получены от 7 пациентов (6 женщин, 1 мужчина), возраст – от 45 до 85 лет (средний возраст – 66 лет). Всем проведены хирургические операции по удалению первичных колоректальных аденокарцином. 6 опухолей были расположены в сигмовидном отделе кишечника и 1 опухоль – в прямой кишке. Опухоли были классифицированы как умеренно дифференцированные (6 опухолей) и высокодифференцированные (1 опухоль) и разделены на стадии в соответствии с системой классификации по раку (стадия Т1-Т2 с метастазированием или без метастазирования – 5 опухолей, стадия Т3, Т2-Т5 – 2 опухоли). Из каждого образца были извлечены ткани опухоли, которые фиксировали в забуференном 4%-ном формальдегиде и заливали парафином.

Иммуногистохимическое определение экспрессии iNOS и eNOS в парафиновых микросрезах колоректальных опухолей проводили с использованием стрептавидин-биотин-пероксидазного метода [9, 10, с.2]. Микросрезы, толщиной 5 мкм депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в нагретом до 95-99° С цитратном буфере (рН=6) в течение 40 минут. Блокирование эндогенной пероксидазы осуществляли 3% раствором пероксида водорода. Для предотвращения неспецифического связывания антител с клетками опухоли срезы инкубировали с блокатором (Invitrogen, США). Инкубацию с первичными поликлональными кроличьими антителами (Santa Cruz Biotechnology, США) в разведении 1:100 проводили при 4° С в течение 16-18 часов. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали проявочную тест-систему (Invitrogen, США). Степень иммуноокрашивания iNOS и eNOS оценивали с применением светового микроскопа Biolam (Ломо, Россия) полуколичественно по 3-х бальной системе, основанной на проценте окрашенных опухолевых эпителиальных клеток: ноль баллов – от 1 до 20%; 1 балл – от 21 до 60%; 2 балла – более 60%. При оценке стромальных клеток также использовали 3-х бальную систему: 1 – слабая экспрессия 0-2 положительно окрашенные клетки; 2 – умеренная экспрессия, от 2 до 10 окрашенных клеток; 3 – сильная экспрессия от 3 до 10 окрашенных клеток в различных полях зрения (объектив х40).

Полученные результаты.

Иммуногистохимическое определение экспрессии iNOS выявило в 85,7% образцов АТК слабую или умеренную экспрессию фермента, который был локализован в цитоплазме эпителиальных опухолевых клеток. Фермент был обнаружен в 22-62% опухолевых клеток, при среднеарифметическом показателе степени иммуноокрашивания, равном 1,33 балла. В эндотелии сосудов трёх АТК (42,9%) отмечали слабое или умеренное окрашивание на антитела к iNOS (Рис. 1).

Рис. 1.
Экспрессия iNOS в эпителиальных клетках аденокарциномы толстой кишки человека



Белок iNOS был также обнаружен в липогранулёмах микросрезов метастазирующей аденокарциномы сигмовидной кишки; более 50% клеток проявили сильную иммунореактивность по отношению к iNOS. При инкубировании микросрезов АТК с первичными антителами к eNOS была выявлена положительная реакция в 6 из 7 образцов (85,7%), при этом относительное количество эпителиальных клеток, экспрессирующих eNOS, варьировало от 24 до 65%, что в пересчёте на баллы составило 1,33. С такой же частотой (в 6 из 7 образцов) фермент eNOS был обнаружен в клетках эндотелия сосудов АТК при среднеарифметическом показателе в 1,19 балла. Особенно сильная экспрессия eNOS была определена в клетках эндотелия (до 65% клеток) при инфильтративно-язвенной карциноме прямой кишки. В клетках фибробластов (25% клеток) в одной метастазирующей крупной опухоли отмечали повышенную иммунореактивность по отношению к iNOS и eNOS.

Что касается результатов определения экспрессии ферментов в прилежащей к опухоли ткани, то в 2 из 7 образцов (28,6%) регистрировали повышенную экспрессию iNOS и eNOS в эпителиальных клетках (до 40% клеток) и практически с такой же частотой и степенью экспрессии в клетках эндотелия сосудов. В остальных 5 образцах, в прилежащих к АТК тканях, экспрессия iNOS и eNOS в опухолевых эпителиальных клетках и клетках стромы была низкой или практически отсутствовала.

Таким образом, оценивая экспрессию iNOS и eNOS в опухолевых и стромальных клетках, можно отметить высокую частоту экспрессии eNOS в эпителиальных и эндотелиальных клетках в проанализированных образцах АТК. С высокой частотой (85,7%) регистрировали положительную реакцию на антитела к iNOS в опухолевых эпителиальных клетках и в 2 раза реже – в эндотелиальных. С учётом % окрашенных клеток степень иммунореактивности к антителам к iNOS и eNOS как в опухолевых эпителиальных, так и эндотелиальных клеток можно оценить как слабую или умеренную.

В большинстве образцов тканей, прилежащих к опухолям, практически не экспрессировались изоферменты NOS, за исключением 2-х образцов больных с метастатическими аденокарциномами на поздних стадиях опухолевого процесса. Степень экспрессии iNOS и eNOS в этих образцах оценивалась как слабая или умеренная. Повышенную экспрессию iNOS регистрировали в очаговых лимфоцитарных инфильтратах прилежащих тканей; около 50% клеток экспрессировали фермент.

Известно, что для проявления биологической функции NO, концентрация, экспозиция и контекст его микроокружения являются ключевыми факторами. При концентрации $NO < 1-30$ нМ, процессы опосредованы cGMP; по мере повышения уровня NO, Akt фосфорилируется по серину 472. Это событие, как известно, защищает от апоптоза, вызывая фосфорилирование Bad и каспазы-6. При концентрации NO от 50 до 100 нМ

стабилизируется HIF-1 α , что способствует пролиферации и обеспечивает защиту от повреждения тканей, активируется ERK, MMP9, P-AMPK. При концентрации от 300 до 500 нМ наблюдают нитрование/нитрозирование функциональных белков, в том числе онкобелков, ингибирование репарации ДНК [11, с.3]. В целом, низкие концентрации NO способствуют выживанию и пролиферации клеток, повышению проницаемости сосудов, усилению активности проангиогенных факторов, мобилизации предшественников эндотелиоцитов из костного мозга и усилению VEGF-C/VEGF-D-индуцированного лимфангиогенеза, метастазированию, в то время как более высокие уровни NO способствуют механизмам, вызывающим остановку клеточного цикла, старение или апоптоз [7, с.3]. Установленное ранее другими авторами наличие корреляции между ферментативной активностью iNOS и уровнем белка iNOS, выявленного методом иммуногистохимии ($p < 0,01$) в опухолях толстой кишки человека [12, с.3], позволяет нам предположить, что при слабой или умеренной экспрессии iNOS и eNOS, наблюдаемые нами в АТК, количество NO, продуцируемое этими ферментами будет находиться на низких уровнях. Это дает основание полагать, что в таком случае NO и его производные (N_2O_3 , NO_2 , $ONOO^-$) будут способствовать поддержанию протуморогенных процессов – стимулированию пролиферации и ангиогенезу. Исследования, проведенные раньше показали, что повышенная экспрессия NOS в тканях колоректального рака коррелирует с повышенной частотой метастазирования и в долгосрочной перспективе предсказывает неблагоприятный исход [13,14, с.3]. Несмотря на NO-концентрационную неоднородности ландшафта опухолевой ткани, авторы работ сходятся во мнении, что при повышенной гиперпродукции NO и его производных опухолью, ферменты iNOS, eNOS могут стать потенциальными терапевтическими мишенями, снижение активности которых может привести к замедлению развития опухолей. В связи с этим, представляется перспективным использование селективных ингибиторов к изоформам NOS как терапевтической стратегии в ограничении патологической роли NO при прогрессии колоректальных опухолей. Ряд препаратов, с различной селективностью к iNOS и eNOS, показали многообещающие результаты в исследованиях на животных на разных моделях опухолевого роста [15, 16, с.3]. В тоже время двойственная природа NO (защитное и вредное воздействие) создают трудности для использования ингибиторов в клинике. Необходимо понять сложные функции NOS и механизмы, вовлеченные в противоопухолевые эффекты ингибиторов NOS, их токсичность, прежде чем будут определены эффективные препараты для лечения онкологических заболеваний у человека.

Выводы.

Иммуногистохимический анализ микросрезов аденокарцином толстой кишки человека выявил высокую частоту экспрессии eNOS и iNOS в эпителиальных опухолевых клетках, а также в клетках эндотелия сосудов проанализированных образцов, при этом степень иммунореактивности к антителам изоферментов была низкой или умеренной. Наличие отдаленных метастазов или метастазов в лимфатических узлах повышает вероятность усиления экспрессии iNOS и eNOS в прилежащих тканях. Можно ожидать, что в условиях низкого или умеренного уровней экспрессии изоферментов в опухолевой ткани будут преобладать реакции, способствующие проканцерогенным процессам. Что касается перспективы использования высокоселективных ингибиторов изоферментов NOS в терапии колоректальных аденокарцином человека, то для этого необходимо подтвердить противоопухолевые эффекты ингибиторов и их безопасность в клинических исследованиях.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие результаты: дана комплексная оценка уровней экспрессии iNOS и eNOS в эпителиальных опухолевых клетках, а также в клетках эндотелия сосудов аденокарцином толстой кишки человека, которые классифицируются как низкие или умеренные. При таких концентрациях NO может способствовать протуморогенным процессам – выживанию и пролиферации

клеток, повышению проницаемости сосудов, усилению активности проангиогенных факторов.

Литература.

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clinic*. 2024.V.74 (3): p. 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
2. Choudhari K.S., Chaudhary M., Bagde S., Gadbail A.R., Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology*. 2013. 11:118.
3. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Кривошеева Л.В., Савлучинская Л.А., Хоченков Д.А. Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016. Т.3. С. 73-80. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80.
4. Granados-Principal S., Liu Y., Guevara M.L., Blanco E., et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015. 17:25. DOI: 10.1186/s13058-015-0527-x.
5. Wang H., Wang L., Xie Z., et al. Nitric oxide (NO) and NO synthases (NOS)-based targeted therapy for colon cancer. *Cancers (Basel)*. 2020. 12(7):1881. DOI: 10.3390/cancers12071881.
6. Siegert A., Rosenberg C., Hauptmann S. Nitric oxide of human colorectal adenocarcinoma cell lines promotes tumour cell invasion. *British J Cancer*. 2002. DOI:10.1038/sj.bjc.6600224.
7. Fukumura D., Jain R.K. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev*. 1998. 17(1):77-89. DOI: 10.1023/a:1005908805527.
8. Ahn B., Ohshima H. Suppression of intestinal polyposis in Apc (min/+) mice by inhibiting nitric oxide production. *Cancer Res*. 2001. 61:8157-8360. PMID: 11731407.
9. Vakkala M., Kahlos K., Lakari E. et al. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in situ and invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000. 6(6): 2408–16.
10. Cianchi F., Cortesini C., Fantappie O. et al. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. *American J Pathol*. 2003. V. 162(3):793-801.
11. Thomas D.D., Heinecke J.L., Ridnour L.A., Cheng R.Y., Wink D.A., and Miranda K.M. Signaling and stress: the redox landscape in NOS2 biology. *Free Radic Biol Med*. 2015. 87: 204–225. DOI:org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.002.
12. Ambis S., Merriam W.G., Bennet W.P. et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res*. 1998. 58: 334-341.
13. Lagares-Garcia J.A., Moore R.A., Collier B., et al. Nitric oxide synthase as a marker in colorectal carcinoma. *Am Surg* 2001. 67: 709–713.
14. Nozoe T., Yasuda M., Honda M., Inutsuka S., and Korenaga D. Immunohistochemical expression of cytokine induced nitric oxide synthase in colorectal carcinoma. *Oncol Rep*. 2002. 9: 521–524.
15. Gao Y., Zhou Sh., Xu Yi., et al. Nitric Oxide Synthase Inhibitors 1400W and L-NIO Inhibit Angiogenesis Pathway of Colorectal Cancer. *Nitric Oxide*. 2019. 83: 33–39. DOI:10.1016/j.niox.2018.12.008.
16. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Савлучинская Л.А., Курсанов К.И. Участие eNOS в канцерогенезе и перспективы применения ингибиторов фермента. *Материалы международной конференции "Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии"*. Гурзуф, 29мая-08 июня 2022 г. Том 30: 310-321.

Сведения об авторах

Людмила Александровна Савлучинская,
к.б.н., н.с.
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России
Москва, Россия
Эл. почта: blood-research@yandex.ru

Information about author

Ludmila Alexandrovna Savluchinskaya,
Ph. Dr., scientific. employee,
FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation
Moscow, Russian Federation
e-mail: blood-research@yandex.ru

Валентина Петровна Дерягина

к.б.н., н.с. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России
Москва, Россия

1. почта: derygina@inbox.ru

Наталья Ильинична Рыжова, к.б.н., н.с.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

Москва, Россия

Эл. почта: 1124415@mail.ru

Лейла Владимировна Кривошеева, к.б.н., н.с.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

Москва, Россия

Эл. почта: lvkrivosheeva@mail.ru

Valentina Petrovna Deryagina

Ph. Dr., scientific. employee,
FSBI “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation

Moscow, Russian Federation

E-mail: derygina@inbox.ru

Natalia Ilynichna Ryzhova, Ph. Dr., scientific. employee,
FSBI “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation

Moscow, Russian Federation

e-mail: 1124415@mail.ru

Leyla Vladimirovna Krivosheeva, Ph. Dr., scientific. employee,

FSBI “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation

Moscow, Russian Federation

e-mail: lvkrivosheeva@mail.ru

УДК 577.3; 576.32; 544.277

ГРНТИ 31.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.288-295

З.В. Куроптева¹, О.Л. Белая², В.П. Реутов³

¹Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН,
Москва, Россия.

²Московский государственный медико-стоматологический
университет им. А. И. Евдокимова» Минздрава России
Москва, Россия.

³Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии
РАН Москва, Россия.

ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ОКСИДА АЗОТА В ЛЕЙКОЦИТАХ И МАКРОФАГАХ

В статье обсуждаются вопросы регуляции синтеза оксида азота, являющегося одним из главных действующих факторов (основным цитотоксическим агентом) клеток иммунной системы - лейкоцитов и макрофагов - в борьбе с бактериальной и вирусной инфекциями. Продолжено изучение влияния аскорбиновой кислоты на процесс образования оксида азота в этих клетках и методами Электронного Парамагнитного Резонанса (ЭПР) и УФ-спектроскопии в опытах in vitro показано, что использование аскорбиновой кислоты может приводить к многократному увеличению продукции оксида азота в лейкоцитах крови и макрофагах.

Ключевые слова: оксид азота, аскорбиновая кислота, лейкоциты, перитонеальные макрофаги, метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), УФ-спектроскопия.

Kuropteva Z.V.¹, Belaya O.L.², Reutov V.P.³

¹Emanuel N.M. Institute of biochemical physics, Russian Academy of Sciences, Russia,

²Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov of the Ministry of Healthcare of Russia,

³Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences

THE INCREASE OF NITRIC OXIDE PRODUCTION IN LEUKOCYTES AND MACROPHAGES

The effect of ascorbic acid (AA) on the formation of nitric oxide in leukocytes and peritoneal macrophages of animals was studied. ESR and UV spectroscopy revealed a significant increase in nitric oxide formation in a suspension of incubated at room temperature cells with AA.

Key words: nitric oxide, ascorbic acid, leukocytes, peritoneal macrophages, ESR method, UV spectroscopy.

Введение. Известно, что состояние клеточного (врождённого) иммунитета определяется функциональной активностью клеток иммунной системы – лейкоцитов и тканевых макрофагов. А одним из главных действующих факторов *лейкоцитов и макрофагов*, обеспечивающих их цитотоксическую/цитостатическую активность в борьбе с бактериальной и вирусной инфекциями, является оксид азота (NO) [1-3]. Так, для

макрофагов, например, уже *экспериментально* показано, что течение многих инфекционных заболеваний зависит от функциональной активности этих клеток [4]. Особенно моноядерные фагоциты выступают в качестве первой линии защиты организма от разнообразных патогенов. Было показано, что поддерживаемая продолжительная продукция NO в макрофагах обеспечивает их цитостатическую/цитотоксическую активность как *по отношению* к опухолевым клеткам, так и в отношении вирусов, бактерий, грибов, простейших, гельминтов [4-9]. Было установлено на клеточных линиях и линиях мышей, что резистентность к микробам часто связана с экспрессией индуцируемой NO-синтазы (iNOS). Более прямое доказательство роли iNOS было получено вначале в работе [10], а затем и в работах многих других исследователей. Они использовали ингибиторы iNOS и показали, что ингибиторы ухудшают течение болезней, вызванных множеством вирусов и бактерий. Были установлены и механизмы действия оксида азота - это ингибирование дыхания митохондрий (MX) и синтеза ДНК, потеря железа клетками, ингибирование ферментов, участвующих в цикле Кребса [9-12].

Очевидно, что NO не единственный антипатогенный эффектор иммунной защиты, но в значительном большинстве случаев он является либо индуктором, либо исполнителем бактерицидной программы. Поэтому уровень синтезируемого NO в клетках иммунной системы имеет важное значение для проявления устойчивости организма к инфекционным заболеваниям, и, возможно, исходя из данных литературы, и профилактике опухолевых заболеваний.

Были сообщения, что в ряде клеток синтез NO может быть повышен под действием аскорбиновой кислоты (АК) [13-15, 20]. АК посвящено большое число исследований и в настоящее время достаточно хорошо изучено распределение АК в тканях и клетках организма животных и человека. Оказалось, что распределена она неравномерно, некоторые клетки и ткани поддерживают достаточно высокие уровни АК. Так, установлено, что высокие уровни аскорбиновой кислоты содержат все иммунокомпетентные клетки - макрофаги и лейкоциты [16].

Известно, что клетках крови, например, АК распределена также неравномерно и особенно высокие уровни ее содержатся в лейкоцитах. Так, если в плазме крови человека АК содержится, в среднем, в концентрации 50-150 мкМ, то лейкоциты и тромбоциты проявляют выраженную способность аккумулировать витамин С до концентраций, которые больше чем на порядок превышают концентрации в плазме [16]. Так,

свежевыделенные нейтрофилы человека содержат мМ концентрации АК, а при инкубации с АК или дегидроаскорбиновой кислотой (ДГА) *in vitro* они накапливают ещё более высокие концентрации этого витамина.

Однако, несмотря на большое количество исследований до недавнего времени функциональная роль АК в клетках лейкоцитарного типа оставалась неизвестной. Но имеющиеся данные о высоком содержании АК в лейкоцитах макрофагах уже указывают на то, что АК должна играть важную роль в физиологической функции этих клеток.

Исследования влияния АК на активность синтеза NO в клетках немногочисленны и данные достаточно противоречивы. Поэтому исследования по влиянию АК (а также других антиоксидантов) на синтез NO в клетках иммунной системы остаются актуальными.

Цель работы.

Получить дополнительные данные о возможности регулирования продукции оксида азота в клетках иммунной системы. Показать, что в лейкоцитах крови и перитонеальных макрофагах мышей линии SHK количество синтезируемого NO также может быть значительно увеличено под действием АК.

Материалы и методы.

Перитонеальные макрофаги выделяли стандартным способом вымывания содержимого брюшной полости мышей линии SHK (The SHK male mice Swiss-H mice from nursery Kriukovo, Russia) 0,9% раствором NaCl. Собранные клетки дважды промывали тем же раствором и центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. Осадок суспендировали в физрастворе. Концентрация клеток составила 2×10^9 в 1 мл. Для питания клеток добавляли 2% р-р сыворотки КРС (Biowest, France). Суспензию макрофагов делили на 2 части. К одной части добавляли раствор АК (АК фирмы Sigma) в трис-HCl буфере с pH 7,4. Концентрация АК в суспензии МФ составляла 9-10 мМ. Вторая часть с добавленным трис-HCl буфером использовалась в качестве контроля.

Суспензии МФ с АК и без неё инкубировали при комнатной температуре. Через 20 и 48 часов инкубации отбирали пробы надосадочной жидкости и измеряли поглощение на спектрофотометре "Shimadzu" (Япония). Для ЭПР исследований в суспензии МФ в качестве ловушки NO добавляли раствор Hb в концентрации 10^{-5} М.

Для изучения лейкоцитов (форменных элементов крови (ФЭК) свежую гепаринизированную кровь животных центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин и осторожно отбирали плазму. Оставшуюся массу промывали 3 раза раствором NaCl (0,9%) и снова центрифугировали при 4000 об/мин по 15 мин. После удаления физиологического раствора готовили суспензии ФЭК в трис-HCl буфере (pH 7,4). Использовали растворы АК (АК фирмы "Sigma") также в трис-HCl буфере. Концентрация АК в суспензии ФЭК составляла 12-15 мМ. Суспензии ФЭК с АК и без неё инкубировали при комнатной температуре. Через определенные времена инкубации отбирали пробы и готовили образцы в виде столбиков в тефлоновых трубочках диаметром 3 мм и высотой 30 мм, замораживали их при температуре жидкого азота. Далее образцы освобождали от тефлоновых трубочек и получали образцы суспензии макрофагов и лейкоцитов, замороженные при температуре жидкого азота, в виде столбиков диаметром 3мм и высотой 30 мм. Спектры ЭПР приготовленных образцов регистрировали на спектрометре ESP-300 фирмы Bruker-Analitishe-Messtechnik» (ФРГ), при температуре жидкого азота.

Результаты.

Но оказалось, что выделенные стандартным способом перитонеальные МФ, инкубируемые при комнатной температуре, без дополнительного стимулирования также могут синтезировать незначительное количество NO, которое можно было обнаружить по появлению нитритов и нитратов, являющихся стабильными продуктами окисления NO и регистрируемых как методом ЭПР, так и УФ-спектроскопии при поглощении 330-340 нм. Эта способность МФ была использована в настоящей работе для изучения

влияния АК на синтез NO в этих клетках.

Макрофаги. При изучении влияния АК на синтез оксида азота в перитонеальных МФ мышей были исследованы спектры оптического поглощения надосадочной жидкости суспензий МФ, инкубированных при комнатной температуре в течение 48 час как с АК, так и без нее. На рис. 1 показаны спектры оптического поглощения надосадочной жидкости МФ в области 330-340 нм.

В образцах, инкубированных в присутствии АК регистрировалось поглощение (рис.1.2), значительно большее, чем в образцах надосадочной жидкости макрофагов, инкубированных без АК (рис.1.1). Инкубационная среда состояла из трис-буфера с добавлением 2% сыворотки КРС в контрольных образцах. В опытных образцах дополнительно добавлялись АК или АК + L-аргинин – все в трис-буфере. Здесь следует отметить, что количество образующегося нитрита на самом деле больше, чем

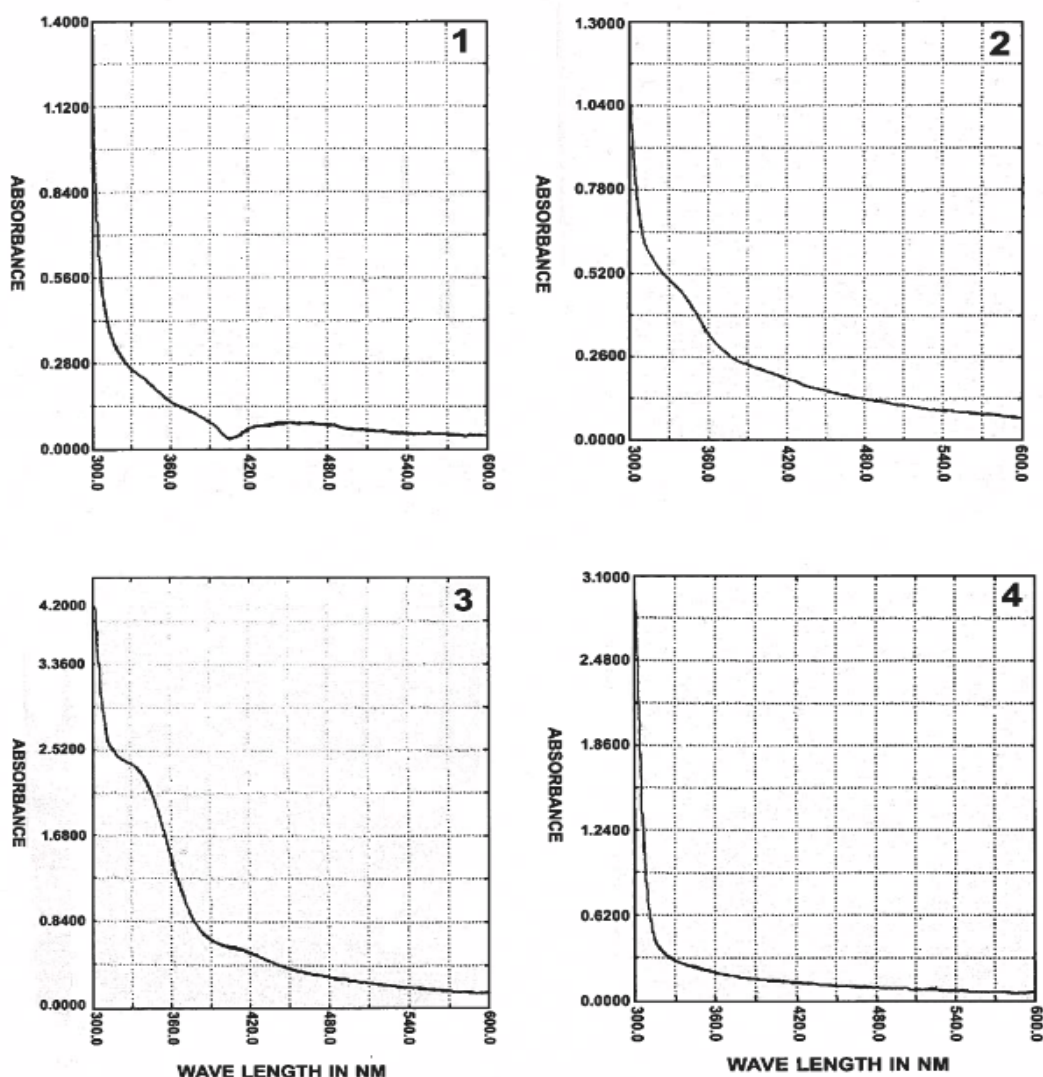
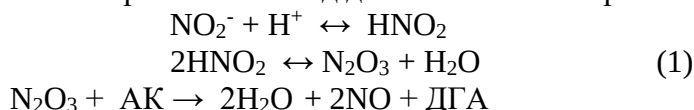


Рис. 1. Спектры оптического поглощения надосадочной жидкости суспензии макрофагов, инкубированных: 1- без АК (контроль); 2 – в присутствии АК; 3 – в присутствии АК + L-аргинин; 4 – к образцам надосадочной жидкости (АК + аргинин), спектр которых представлен на рис. 3.3, непосредственно перед измерением была добавлена АК.

зарегистрировано, так как пока не использована полностью АК, часть образующегося нитрита вновь разлагается под действием АК с образованием NO по реакции [19]



И хотя из образующегося NO вновь может образоваться нитрит, часть NO все же теряется (уходит в виде газа). Поэтому в опытах с использованием метода ЭПР, когда образующиеся молекулы NO акцептируются гемоглобином, к 48 ч было зарегистрировано более, чем в 3 раза увеличение количества NO по сравнению с контрольными образцами, в отличие от данных, приведенных на рис. 1.2, когда увеличение составило не более, чем в 2 раза. На рис. 1.3 показан спектр поглощения надосадочной жидкости макрофагов, инкубированных в присутствии АК с добавлением L-аргинина (10^{-3} мМ), субстрата NO-синтазы и дополнительного источника NO, и в этом случае величина поглощения (и, следовательно, количество образовавшегося нитрита) была выше, чем в образцах макрофагов, инкубированных только с АК. После добавления к образцам надосадочной жидкости МФ, инкубированных с АК и L-аргинином, спектры поглощения которой приведены на рис. 1.3, аскорбиновой кислоты в концентрации 10^{-2} мМ это поглощение полностью исчезало (рис. 1.4) в течение 2-3 мин, что подтверждает, что поглощение в области 330-340 нм было обусловлено нитритными ионами, которые быстро распадаются под действием АК по реакции разложения нитритов под действием АК по приведенной выше схеме (1).

Лейкоциты. Были исследованы суспензии форменных элементов крови (ФЭК) млекопитающих (после удаления плазмы суспензия, содержащая лейкоциты, тромбоциты и эритроциты). Полученная суспензия ФЭК была разделена на две части: к одной была добавлена АК в концентрации 12-15 мМ в трис-буфере, к второй добавлен просто трис-буфер (рН 7,4). Обе эти части были инкубированы при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени отбирали образцы для исследования.

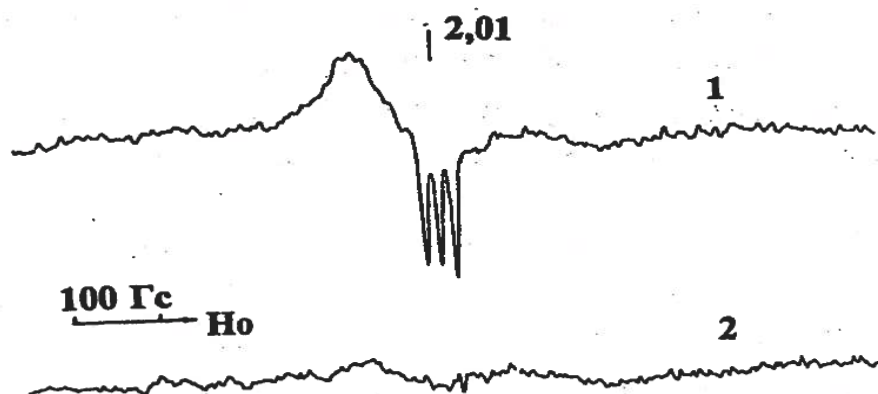


Рис. 2. Спектры ЭПР образцов суспензии форменных элементов крови (ФЭК) животных после 20 час инкубации при комнатной температуре: 1 – в присутствии 12 мМ АК, 2 – без добавления АК. Условия регистрации спектров: мощность СВЧ 20 мВт, амплитуда модуляции магнитного поля 4 Гс, температура регистрации 77 К.

На рис. 2 показаны спектры ЭПР образцов суспензии ФЭК крови, инкубированной с АК и контрольных образцов без АК. В образцах ФЭК с АК через 6 час после начала инкубации появляется и растет со временем инкубации сигнал ЭПР с триплетным расщеплением 17 Гс при $g=2,01$, обусловленный нитрозильными комплексами гемового железа Гем-NO (рис. 2.1). Этот сигнал не регистрируется в образцах ФЭК без добавления АК (рис. 2.2).

Образование комплексов Гем-NO - это результат взаимодействия гемоглобина и оксида азота. Молекулы гемоглобина имеют высокое сродство к NO и являются эффективными ловушками его. Эритроциты в наших опытах были использованы как элементы, содержащие гемоглобиновые ловушки для NO. В спектрах ЭПР контрольных образцов ФЭК сигнал нитрозильных комплексов Гем-NO отсутствовал. Появление и

рост комплексов Гем-NO в образцах ФЭК, инкубированных с АК, ещё раз показывает, что АК стимулирует механизмы образования NO в иммунокомпетентных клетках крови - лейкоцитах и тромбоцитах. Известно, что лейкоциты и тромбоциты могут синтезировать NO в результате активации их LPS, хронической инфекцией или внутриклеточными патогенами. Но о влиянии АК на синтез NO лейкоцитами до недавнего времени не было известно.

Обсуждение.

Полученные в работе данные показали, что АК способна значительно увеличивать синтез оксида азота в перитонеальных макрофагах и в лейкоцитах животных. В образцах суспензий этих клеток при инкубации с АК методами электронного парамагнитного резонанса и УФ-спектроскопии было зарегистрировано количество образующегося NO более чем в 3 раза превышающее количество образцах, инкубированных без АК. Проведённая нами ранее количественная оценка по результатам ЭПР исследований показала, что каждая клетка МФ в условиях эксперимента за 48 часов могла синтезировать до $1,5 \times 10^9$ молекул NO. По спектрам поглощения нитритов/нитратов было зафиксировано меньшее увеличение синтеза NO, чем методом ЭПР. Это связано с тем, что в опытах ЭПР все образующиеся молекулы NO акцептируются Hb, приводя к появлению стабильных НК Гем- NO, тогда как при регистрации спектров поглощения до тех пор, пока не израсходована вся АК в надосадочной жидкости, образовавшиеся нитриты частично могут разлагаться под действием АК по схеме 1.

В настоящее время уже можно сделать обоснованные предположения каким образом АК влияет на стимулирование синтеза NO в клетках иммунной системы. В литературе имеются данные, которые показывают, что увеличение синтеза NO под действием АК связано с активацией работы iNOS и не связано с экспрессией этого фермента. Индуцируемая NO-синтаза - тщательно регулируемый фермент и для нормального функционирования этого фермента необходимы 6 кофакторов: FMN, FAD, NADH, BH_4 , NADPH и связанный с активным центром кальмодулин. Чтобы iNOS могла нормально функционировать, должны в достаточном количестве присутствовать кофакторы iNOS. А среди них (помимо совершенно необходимого для синтеза NO кислорода) – имеются два кофактора, которые при работе iNOS окисляются – это BH_4 и НАДФН. При этом, было показано, что окисляется ключевой кофактор iNOS тетрагидробиоптерин (BH_4), превращаясь в дигидробиоптерин BH_2 , что приводит к инактивации фермента [13, 21-22].

Предположение о роли АК как восстановителя кофакторов iNOS основано на имеющихся в литературе данных об увеличении под действием АК содержания BH_4 и содержания НАДФН, об участии АК в восстановлении BH_4 из окисленного BH_2 , а также результатов, свидетельствующих о том, что повышенная активность iNOS связана с поддержанием в восстановленном состоянии ключевого кофактора iNOS – BH_4 . Приводятся убедительные данные, которые показывают, что АК необходима, чтобы предотвращать необратимое окисление ключевого кофактора NO-синтазы тетрагидробиоптерина BH_4 в дигидробиоптерин BH_2 и тем самым поддерживать активность iNOS.

Действительно, при исследовании роли BH_4 в синтезе NO в макрофагах была установлена прямая зависимость между увеличением связанного с ферментом кофактора BH_4 и повышенной NO-синтазной активностью [21]. Имеются экспериментальные данные, показывающие, что АК повышает активность iNOS и эндотелиальной NO-синтазы, приводя к увеличению тетрагидробиоптерина [21-22], что АК увеличивает активность eNOS, путем химической стабилизации BH_4 , что длительное действие АК приводит к увеличению содержания BH_4 , что, в свою очередь, приводит к повышению NO-синтазной активности и увеличению продукции NO [21-22]. Данные, полученные в работе [13] о том, что АК не влияет на экспрессию iNOS, также свидетельствуют дополнительно о роли её как восстановителя кофакторов iNOS.

О связи иммунной системы животных с АК, свидетельствует и тот факт, что при неблагоприятных воздействиях у животных, которые сами способны синтезировать АК,

сразу же повышается синтез АК, т.е. потребность в этом витамине возрастает. То, что АК способна поддерживать иммунную систему организма человека, известно уже в течение многих лет. Особенно эффективным, оказалось использование АК в профилактике и борьбе с простудными заболеваниями. Но механизмы участия её в антибактериальном, антивирусном и противоопухолевом действии был непонятен ранее.

Заключение.

Полученные в работе данные подтверждают ещё раз те немногочисленные исследования, которые показали, что АК может участвовать в регуляции синтеза NO в клетках иммунной системы, и, следовательно, влиять на активность этих клеток. Оказалось, что снижение цитотоксического действия этих клеток зависит от содержания ключевого кофактора NO-синтазы - тетрагидробиоптерина ВН₄. Если имеется недостаточное количество этого кофактора NO-синтазы - (ВН₄), в клетках снижается и выработка основного цитотоксического агента – оксида азота, и, следовательно, снижается и функциональная активность клеток – лейкоцитов и макрофагов. А использование АК, способной восстанавливать ВН₄ - ключевой кофактор NO-синтазы, и восстанавливать активность фермента, будет способствовать и восстановлению функциональной активности этих клеток.

Литература.

1. Nathan, C. *Natural resistance and nitric oxide* // *Cell*. 1995. V. 82. P. 873–876.
2. Hibbs J. B. Jr., Taintor R. R., Vavrin Z. *Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine, deiminase and amino nitrogen oxidation to nitrite* // *Science*. 1987. V. 235. N4787. P. 473-476.
3. Krahenbuhl J.L., Remington J.S. *The role of activated macrophages in specific and nonspecific cytostasis of tumor cells* // *J. Immunology*. 1974. V. 113. P. 507-516.
4. Sibille, Y., and Reynolds, H. Y. *Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury* // *Am. Rev. Respir. Dis*. 1990. V. 141, P. 471–501.
5. Stuehr D.J., Nathan C.F. *Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells* // *J.Exp. Med*. 1989. V.169. P. 1543-1555.
6. Stuehr D.J. Marletta M.A. *Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, interferon-gamma* // *J. Immunol*. 1987. V. 139. P. 518-525.
7. Keller R. *The macrophage response to infectious agents: mechanisms of macrophage activation and tumour cell killing*. *Res. Immunol.* // 1993. V. 144. P. 271-273.
8. Farias-Eisner R., Sherman M.P., Aerberhard E., Chaudhuri G. *Nitric oxide is an important mediator of tumoricidal activity in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 9407-9411.
9. Croen K.D. *Evidence for an antiviral effect of nitric oxide* // *J. Clin. Invest*. 1993. V. 91. P. 2446-2452.
10. Hibbs J. B. Jr., Vavrin Z. Taintor R.R. *L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells* // *J. Immunol*. 1987 V. 138. № 2. P. 550-565.
11. Beltran B., Mathur A., Duchon M.R., Erusalimsky J.D., Moncada S. *The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 14602-14607.
12. Fang, F. C. *Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity* // *J. Clin. Invest*. 1997. V. 99. P. 2818–2825.
13. Nakai K., Urushihara M., Kubota Y., Kosaka H. *Ascorbate enhances iNOS activity by increasing tetrahydrobiopterin in RAW 264.7 cells* // *Free radical Biology and Medicine*. 2003. V. 35. P. 929-937.
14. Куроптева З.В., Жумабаева Т.Т., Байдер Л.М., Алещенко А.В. *Аскорбиновая кислота индуцирует образование оксида азота в лейкоцитах человека. Докл. РАН. 2001. Т. 376. № 2. С. 258-260.*
15. Жумабаева Т.Т., Байдер Л.М., Володина Л.А., Куроптева З.В. *Исследование методом ЭПР взаимодействия клеток E. coli с аскорбиновой кислотой и нитритом натрия* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2001. V. 37. № 6. С. 742-746.

16. 1 Paaytty S.J., Levine M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C // CMAJ. 2001. V. 164. P. 353–355.
17. Bi Z., Reiss C.S. Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide // J. Virol. 1995. V. 69. P. 2208–2213.
18. Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H., and Fang, F. C. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro // J. Exp. Med. 2000. V. 192, P. 227–236.
19. Archer M.C., Tannenbaum S.R., Fan T.Yi., Weisman M. Reaction of Nitrite with Ascorbate and Its Relation to Nitrosamine Formation // J. National Cancer Inst. 1975. V. 54. Issue 5. P. 1203–1205.
20. Huang A., Vita J.A., Venema R.C., Keaney J.F. Jr. Ascorbic acid enhances endothelial nitric oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 17399–17406.
21. Hebel J.M., Marletta M.A. Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 7160–7165.
22. Zhumabaeva T.T., Kuropteva Z.V., Zh.T. Moldaliev. Ascorbic acid and the formation of nitric oxide in human leukocytes // World Science. 2019. V. 1. P. 42–45.

Сведения об авторах

Куроптева Зоя Вениаминовна. доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Москва, Россия
Эл. почта: zv.kuropteva@gmail.com

Белая Ольга Леонидовна, доктор мед. наук, профессор кафедры госпитальной терапии № 2 лечебного факультета ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А. И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия.
Эл. почта: olgabelaya@gmail.com

Валентин Палладиевич Реутов
докт. биол. наук, ведущий научный сотрудник
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
Москва, Россия;
Эл. почта: valentinreutov@mail.ru

Information about author

Kuropteva Zoya Veniaminovna
Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher
Emanuel Institute of biochemical physics,
Russian Academy of Sciences
Moscow, Russian Federation
E-mail: zv.kuropteva@gmail.com

Belaya Olga Leonidovna
Doctor of Medical Sciences, Professor
Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov of the Ministry of Healthcare of Russia, the Department of Internal Medicine № 2 of the medical faculty, Moscow, Russian Federation
E-mail: olgabelaya@gmail.com

Valentin Palladievich Reutov
Doctor of Biol. Science, Leading Researcher
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation
E-mail: valentinreutov@mail.ru

УДК 612.884+ 612.816.3
ГРНТИ 76.03.53+ 76.29
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.296-313

**Е.М.Трошина¹, С.О.Болтнева², Е.В.Шарова³,
И.А.Воронина¹, О.Б.Сазонова¹**

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. ак. Н.Н.Бурденко Минздрава России, Москва

²ФГАОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет имени Н.Н.Пирогова» Минздрава России, Москва

³ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН» Москва

ИССЛЕДОВАНИЕ БОЛИ: ВОЗМОЖНОСТИ СУБЪЕКТИВНЫХ И ОБЪЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ БОЛЕВЫХ ОЩУЩЕНИЙ У ЧЕЛОВЕКА (Обзор литературы)

Боль представляет собой важный эволюционно сформировавшийся механизм защиты большинства живых организмов, выполняющий сигнальную функцию и формирующий адаптивное поведение. Боль – это субъективное ощущение, возникающее в результате трансдукции, трансмиссии и модуляции сенсорной информации, преломленное через «фильтр» генетических особенностей человека. Болевое восприятие претерпевает изменения под воздействием физиологического и психоэмоционального состояния человека в данный момент. Это делает её оценку сложной задачей, поскольку в настоящее время применяются методы субъективной оценки болевых ощущений (опросники, шкалы), и отсутствуют однозначно объективные методы измерения или визуализации, которые могли бы точно отразить интенсивность и характер болевых ощущений.

В статье дается обзор литературы, в которой представлены различные теории и классификации боли, механизмы формирования и патофизиология болевых ощущений, рассматриваются положительные и спорные моменты субъективных методов оценки, а также различные инструментальные методы, которые можно расценивать как попытку объективизации болевых ощущений у человека для оценки эффективности диагностики и лечения.

Ключевые слова: исследование боли, методы оценки болевых ощущений, возможность объективизации болевых ощущений

**E.M.Troshina¹, S.O.Boltneva², E.V.Sharova³,
I.A.Voronina¹, O.B.Sazonova¹**

¹Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Pirogov Russian National Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

³Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences", Moscow

PAIN RESEARCH: THE POSSIBILITIES OF SUBJECTIVE AND OBJECTIVE METHODS FOR ASSESSING PAIN IN HUMANS

(Literature review)

Pain is an important evolutionarily formed defense mechanism of most living organisms that performs a signaling function and forms adaptive behavior. Pain is a subjective sensation resulting from the transduction, transmission and modulation of sensory information, refracted through the "filter" of human genetic characteristics. Pain perception undergoes changes under the influence of the physiological and psycho-emotional state of a person at the moment. This makes its assessment a difficult task, since currently methods of subjective assessment of pain (questionnaires,

scales) are used, and there are no unambiguously objective measurement or visualization methods that could accurately reflect the intensity and nature of pain.

The article provides an overview of the literature, which presents various theories and classifications of pain, the mechanisms of formation and pathophysiology of pain, discusses the positive and controversial aspects of subjective assessment methods, as well as various instrumental methods that can be regarded as an attempt to objectify pain in humans to assess the effectiveness of diagnosis and treatment.

Keywords: *pain research, methods of pain assessment, the possibility of objectification of pain*

Введение.

Боль всегда субъективна, её восприятие и оценка субъектом обусловлены местом и характером повреждения, природой повреждающего фактора, а также психологическим состоянием человека и его индивидуальным жизненным опытом.

С медицинской точки зрения боль рассматривается как своеобразное неприятное ощущение, а также как реакция на это ощущение, которая характеризуется определённой эмоциональной окраской, рефлекторными изменениями функций внутренних органов, двигательными безусловными рефлексам, а также волевыми усилиями, направленными на избавление от болевого фактора.

Научное определение боли пытались дать многие ученые, но до сих пор этот вопрос окончательно не решен.

Английский физиолог Ч. Шерингтон (1906) определил боль как психическое дополнение защитного рефлекса. Он рассматривал боль как важную защитную функцию, которая сигнализирует о потенциальной угрозе и побуждает к действию.

П. К. Анохин (1958) полагал, что боль – это «своеобразное психическое состояние человека, определяющееся совокупностью физиологических процессов в центральной нервной системе, вызванных каким-либо сверхсильным или разрушительным раздражением».

Г. Кассиль (1975) определяет боль как «неприятное, гнетущее, иногда нестерпимое ощущение, возникающее преимущественно при сверхсильных или разрушительных воздействиях на организм человека и животных».

Формулируя определение боли с позиции теории функциональных систем К.В. Судаков (1979) указывал, что «боль является интегративной функцией организма, которая мобилизует организм и его разнообразные функциональные системы на защиту от воздействующих вредных факторов и включает такие компоненты, как сознание, память, мотивации, вегетативные, соматические, поведенческие реакции, эмоции».

По мнению Л.В. Калюжного (1984), «боль как интегративная функция организма является отрицательной биологической потребностью, ответственной за формирование функциональной системы по сохранению гомеостаза».

Международная ассоциация по изучению боли (International Association for the Study of Pain, IASP) определяет боль как неприятное сенсорное или эмоциональное переживание, связанное с действительным или возможным повреждением тканей или описываемое в терминах такого повреждения [1]. Согласно данному определению ощущение боли может возникать не только при повреждении ткани, но даже при отсутствии какого-либо повреждения. В этом случае определяющим в механизме возникновения боли является психоэмоциональное состояние человека.

Теории боли.

Для объяснения физиологии болевого восприятия в разное время предлагались различные теоретические модели.

Согласно *теории специфичности* М.Фрея (Von Frey, 1894) утверждается, что у тела есть отдельная сенсорная система для восприятия боли. В соответствии с этой теорией боль является специфическим чувством (шестое чувство), имеющим собственный рецепторный аппарат, афферентные пути и структуры головного мозга, перерабатывающие

болевою информацию.

Оппозиционная ей *теория интенсивности*, предложенная изначально английским врачом Э.Дарвином (1794) и поддержанная в дальнейшем Гольдшнайдером (Goldschneider, 1920) и Р. Nafe (1929), отрицает наличие отдельной системы для восприятия боли и специфических болевых структур, а боль является результатом суммации термических, механических и других сенсорных импульсов. Т.е., любой сенсорный стимул, достигающий определенной интенсивности, может вызвать боль. Позже *теория интенсивности* стала более известна как *теория паттернов* или *суммации*.

Предложенная Р. Мелзаком и П. Уоллом (Melzack и Wall, 1965) *теория воротного контроля* основывается на признании существования специфичных болевых рецепторов, но вместе с тем учитывает роль центральной суммации и конвергенции в механизмах боли. Т.е. данная теория опирается на ранее предложенную теорию специфичности и теорию паттернов.

Согласно этой теории, болевые импульсы передаются по тонким медленным волокнам в задние рога спинного мозга, а затем другие клетки передают эти импульсы в головной мозг. Однако, их активность опосредована клетками, которые расположены в определенной области спинного мозга, называемой желатинозной субстанцией. Данное образование спинного мозга работает как ворота, контролирующие сенсорный вход от периферических нервных волокон. Она регулирует возбуждающее действие толстых и тонких волокон на вставочные клетки спинного мозга. В одних случаях она может препятствовать передаче импульсов, тогда как в других случаях позволяет импульсам достигать центральной нервной системы. Все зависит от величины общего афферентного входа. Т.о., в теории воротного контроля постулируется признание спинного и головного мозга активной системой, которая избирательно реагирует на входные сенсорные сигналы, а также определяется центральная нервная система как ведущее звено в болевых процессах.

В процессе наблюдения за больными с перерывом спинного мозга и пациентами с фантомными болями (R.Melzack, 1989) [2] были выявлены факты, которые невозможно было объяснить с позиции теории воротного контроля:

- отсутствующая конечность ощущается как реально существующая при отсутствии входных проприоцептивных сигналов, следовательно, ощущение нормальной конечности обусловлено процессами в головном мозге
- если сенсорные ощущения, включая боль, могут возникать в отсутствие внешнего раздражения, то можно полагать, что источники возникновения нервных паттернов, формирующих качество переживания, находятся не в периферической нервной системе, а в нейрональных сетях головного мозга.

Принимая во внимание данные факты, Р.Мелзак (R. Melzack, 1990) [3] предложил *теорию нейроматрикса*, согласно которой боль – это не просто реакция на повреждение, а результат работы нейронной сети (нейроматрикса) в головном мозге. Эта сеть, состоящая из нейронов в центральной нервной системе, генерирует паттерны импульсов, которые определяют качество боли.

Нейроматрикс – это не просто передатчик информации о боли, а сам генератор болевых ощущений. В нем интегрируется информация о теле, окружающей среде и пережитых опытах. Структура нейроматрикса в значительной степени обусловлена генетически. Однако опыт и обучение могут влиять на эту структуру, что приводит к изменениям в болевой чувствительности. Периферические стимулы (например, травма) могут действовать как триггеры, активирующие нейроматрикс и вызывая болевые ощущения. Теория подчеркивает центральную роль головного мозга в возникновении боли, в том числе в развитии фантомных болей. Нейроматрикс способен генерировать различные виды боли, в том числе хроническую, фантомную и центральную. Прошлые переживания боли, психоэмоциональные состояния и контекст ситуации могут влиять на работу нейроматрикса и, следовательно, на интенсивность и качество боли.

Классификации боли.

Боль в современной алгологии рассматривается как многокомпонентная интегративная реакция организма на повреждение или представление такого повреждения. В зависимости от патогенетических, этиологических, временных, клинических и других признаков существуют разные классификации боли.

Существуют различные классификации типов боли [4 - 9].

По продолжительности боль делится на острую, хроническую и острую на фоне хронической. *Острая боль* выполняет предупреждающую сигнальную функцию, ее возникновение связывают с действием повреждающего фактора. Считается, что острая боль должна исчезнуть при прекращении действия этого фактора или устранении последствий повреждения. Острая боль является краткосрочной, её длительность обычно меньше трёх месяцев, а также она локализуется в определённой области организма.

В отличие от острой *хроническая боль* длится больше трёх месяцев. Это многофакторный патологический процесс, который формируется при невозможности устранить действие вредоносного агента. В некоторых случаях этот процесс приобретает качество автономного, самоподдерживающегося патологического состояния, не прекращающегося при устранении причины развития болевого синдрома.

По механизму возникновения боль разделяют на: ноцицептивную, то есть физиологическую и нейропатическую: патологическую, психогенную и смешанную.

Ноцицептивная боль возникает в результате активации периферических болевых (ноцицептивных) рецепторов. Ноцицепторы — это сенсорные окончания нервов, которые будучи возбужденными или sensibilizированными будут сигнализировать о имеющемся или потенциальном повреждении тканей. Данный тип боли является защитным механизмом, чаще всего это острая боль. Она возникает при травме, воспалении, ишемии и пр.

Нейропатическая (или нейрогенная) боль возникает при повреждении нейронов периферической и центральной нервной системы. Примерами такой боли могут служить повреждение спинного мозга, поражение головного мозга, невралгия тройничного нерва, фантомные боли, таламические боли, каузалгии, диабетическая полинейропатия.

Психогенная боль, при которой обследование не выявляет патофизиологического механизма, который объяснял бы ее наличие. Психогенная боль связана с психологическими или социальными факторами. Триггером в патогенезе являются психосоциальные связи, часто она является следствием депрессивного состояния. Примером является головная боль напряжения.

Смешанная боль — это сложное сочетание различных типов боли в любой комбинации, которые действуют одновременно или какой-то тип боли преобладает в любой момент времени. Наиболее частым вариантом является сочетание ноцицептивной и нейропатической боли, например, радикулярная боль в спине, онкологическая боль, посттравматическая боль, послеоперационная боль, боль при воспалении суставов. Смешанная боль может быть острой или хронической.

По локализации повреждения боль может быть соматической, висцеральной, нейропатической и центральной. Соматическая, в свою очередь, делится на поверхностную, при повреждении кожных или слизистых покровов, и глубокую, при повреждении костей, мышц или соединительной ткани. Глубокая висцеральная боль возникает при повреждении или сдавлении внутренних органов.

По интенсивности боль бывает слабой, средней, сильной, сверхсильной и даже непереносимой. Данный показатель является субъективным, попытки объективизировать интенсивность болевых ощущений привели к появлению шкал интенсивности боли. В настоящее время существуют различные опросники и шкалы для определения боли [10].

По распространению:

- местная (локальная) боль локализуется в очаге патологического процесса, т.е. в зоне ноцицептивного раздражения;

- иррадиирующая боль распространяется из зоны иннервации одного нерва в зоны иннервации других;
- проекционная боль ощущается по ходу и на периферии нерва при раздражении в проксимальном его участке;
- отраженная - возникает в результате распространении боли в определенную зону на теле, связанную с иннервацией поврежденных структур. Отраженная боль отличается от проекционной боли тем, что она вызывается не прямой стимуляцией нервных волокон, а раздражением каких-либо рецептивных окончаний.

Ноцицептивная система.

Ощущение боли возникает при активации ноцицептивной системы в результате поражения центральных участков системы ноцицепции или при активации болевых рецепторов в тканях [4, 5, 11 - 14].

Ноцицепция включает 4 основных физиологических процесса [15].

1. *Трансдукция* - это процесс, при котором на окончаниях чувствительных нервов повреждающее воздействие травмирующего агента трансформируется в электрические импульсы. Чувствительные рецепторы (ноцицепторы), ответственные за кодирование и передачу информации о повреждающих факторах, по своей структуре являются свободными нервными окончаниями периферических Аδ- и С-волокон, их тела располагаются в спинномозговых узлах (ганглиях задних корешков) и узле тройничного нерва. Локализация ноцицепторов обширная – они располагаются во многих участках организма таких как кожа, подкожная ткань, надкостница, суставы, мышцы и стенки внутренних органов. Ноцицепторы – гетерогенная группа рецепторов, обладающих чувствительностью к химическим, термическим и механическим стимулам, то есть они могут быть активированы химическими веществами альгогенами, а также нагреванием или охлаждением соответственно.

Альгогены, взаимодействуя с соответствующими мембранными рецепторами, оказывают возбуждающее действие на окончания ноцицепторов. Помимо альгогенов в центральной нервной системе активация ноцицепции осуществляется через возбуждающие аминокислоты, а именно глутамат и аспартат, содержащиеся в основном в нейронах спинномозговых ганглиях. Физиологические реакции, такие как, например, защитные рефлексы, осуществляются при взаимодействии возбуждающих нейромедиаторов и АМРА-рецепторов, но длительное болевое ощущение, переходящее далее в хроническую боль, возникает при взаимодействии глутамата с NMDA-рецепторами. Существуют также «молчащие» рецепторы, которые активируются только при повреждении или воспалении тканей.

2. *Трансмиссия* - это распространение волны возбуждения по чувствительным волокнам к задним рогам спинного мозга. Трансмиссия болевого сигнала происходит по миелинизированным Аδ-волоконкам и немиелинизированным С-волоконкам. Первые имеют высокую скорость проведения импульса (15-30 м/с) и большой диаметр. Они ответственны за острую боль, тактильную и температурную чувствительность. С-афференты, наоборот, не обладают высокой скоростью проведения сигнала (0,4-2 м/с) и имеют малый диаметр. Они передают информацию о длительной боли, температурной и тактильной чувствительности.

Центральные отростки ноцицептивных нейронов входят в состав задних корешков спинного мозга. Они далее взаимодействуют с тремя типами нейронов. Первый тип - это нейроны, находящиеся в I пластине заднего рога и иннервирующие все ткани тела. Они отвечают только на механические или температурные стимулы. Второй тип включает в себя нейроны широкого динамического диапазона или ШДД-нейроны. Исходя из названия, данные нейроны активируются различными стимулами, такими как тактильные и ноцицептивные. Они локализируются в V-VII пластинах дорсального рога. И, наконец, третий тип включает в себя тормозные интернейроны желатинозной субстанции, расположенные во II пластине дорсального рога. Они активируются ноцицептивными и неноцицептивными стимулами, также они способны изменять возбудимость нейронов первого и второго типов.

3. *Модуляция* – это процесс, при котором ноцицептивная трансмиссия модифицируется под влиянием невральные воздействия. Существуют два варианта модуляции:

тормозной и возбуждающий. Первый механизм оказывает тормозное действие за счёт нейротрансмиттеров: глицина и γ -аминомасляной кислоты. Во втором же происходит высвобождение главного возбуждающего нейротрансмиттера – глутамата.

4. *Перцепция* – это процесс оценки информации (восприятия боли), который обеспечивается передачей нервного импульса в различные структуры головного мозга. Ретикулярная формация (РФ) ствола передает болевую информацию в неспецифические ядра таламуса, затем в кору, а также в гипоталамус и лимбическую систему, усиливает и пролонгирует защитные реакции спинного мозга и ствола, вовлекает в ответ вегетативную (особенно симпатическую) нервную систему.

Таламус участвует в передаче и переработке болевой информации: специфические ядра таламуса обеспечивают анализ локализации болевого раздражения, его силы и длительности, неспецифические ядра таламуса участвуют в формировании мотивационно-аффективного аспекта боли. Таламус является главной структурой для приёма и интеграции болевых стимулов перед их передачей в соматосенсорную кору больших полушарий.

Лимбическая система получает болевую информацию от передних ядер таламуса и формирует эмоциональный компонент боли, запускает вегетативные, соматические и поведенческие реакции, обеспечивающие приспособительные реакции к болевому раздражителю. Кора больших полушарий (кора постцентральной извилины) получает болевую импульсацию из специфических (в меньшей степени из неспецифических) ядер таламуса и создает ощущение боли. Двигательная кора совместно с базальными ганглиями и мозжечком формирует моторные программы болевого поведения. Лобная кора обеспечивает самооценку боли (ее когнитивный компонент) и формирование целенаправленного болевого поведения.

Антиноцицептивная система мозга.

Система болевой чувствительности, или ноцицепция, имеет свой функциональный антипод – антиноцицептивную систему, которая выступает как регулятор деятельности ноцицепции. Структурно антиноцицептивная, как и ноцицептивная система, представлена теми же нервными образованиями спинного и головного мозга. Антиноцицептивная система способствует уменьшению или даже исчезновению чувства боли. Основной целью антиноцицептивной системы является эндогенное торможение ноцицептивной системы, данный процесс лежит в основе внутреннего обезболивания у человека и животных. Торможение болевых сигналов происходит по принципу петли обратной связи. Реализация деятельности антиноцицептивной системы осуществляется через специализированные нейрофизиологические и нейрохимические механизмы.

Выделяют три основных механизма антиноцицепции, оказывающие влияние на модуляцию, снижение интенсивности и исчезновение боли: афферентная информация, поступающая по миелинизированным волокнам в задние рога спинного мозга от рецепторов; нисходящие тормозные влияния на уровне задних рогов спинного мозга и гуморальные механизмы антиноцицепции [4, 5, 11 - 14, 16 - 18].

Афферентация от тактильных, температурных и проприорецепторов, которая поступает в спинной мозг по миелинизированным волокнам, стимулирует образование нейронами задних рогов энкефалинов и эндорфинов. Последние тормозят образование и выделение из пресинаптической терминали в пресинаптическую щель субстанции Р. В результате передача болевого импульса в ЦНС подавляется и формирование болевого ощущения не происходит.

Полагают, что формирование нисходящих тормозных влияний на уровне задних рогов спинного мозга происходит вследствие возбуждения болевыми импульсами определенных зон головного мозга (гигантоклеточного ядра, ядра шва, центрального серого околосредоводного вещества (ЦСОВ), миндалины, островка, передней и задней поясной коры, префронтальной области коры) [16, 17, 18]. Нисходящие тормозные влияния осуществляются через ЦСОВ и ядра шва с выделением на уровне задних рогов спинного мозга ряда гуморальных факторов (энкефалины, норадреналин, дофамин, серотонин, ГАМК) [17, 18, 19].

Серотонинергические нисходящие пути являются главной мишенью в анальгезии спинного мозга. Нисходящие адренергические влияния оказывают тормозное действие на болевые импульсы посредством взаимодействия с α_2 -адренорецепторами. Происходит блокада выделения глутамата и субстанции Р в синаптическую щель через изменение тока Ca^{2+} . Нисходящие ГАМКергические пути осуществляются через торможение передачи болевого импульса с ЦНС за счёт взаимодействия ГАМК с ГАМКв-рецепторами, активации калиевых и натриевых каналов и гиперполяризации постсинаптической мембраны. Энкефалинэргические нисходящие пути работают за счёт стимуляции тока калия из постсинаптической терминали при взаимодействии с μ - и δ - опиоидными рецепторами, тем самым они тормозят передачу болевого импульса в ЦНС. Также известно, что нисходящие волокна, которые поступают из структур головного мозга способны выделять серотонин, стимулирующий в свою очередь выделение энкефалина [17].

Методы субъективной оценки боли (шкалы и опросники).

В настоящее время оценка боли основывается на субъективной характеристике интенсивности болевых ощущений пациента. Для субъективной оценки интенсивности болевых ощущений используются опросники и проводится тестирование с помощью различных шкал. Шкалы интенсивности боли — это инструмент, который позволяет наглядно оценить степень субъективных болевых ощущений по определенной числовой или визуальной системе [20, 21, 22].

Поведенческая шкала оценки боли (Behavioral Pain Rating Scale – BPRS) включает в себя четыре показателя: тревожность или беспокойство, сокращение мышц, выражение лица или гримаса, а также звуки, издаваемые пациентом. Каждый показатель оценивается по трёхбалльной шкале, где 0 — это нормальное поведение и 3 – проявление сильной боли. Далее это баллы суммируются и интерпретируются, 0 указывает на отсутствие боли и 12 является показателем максимальной боли. Главным недостатком данного метода оценки является тот факт, что пациенты, принимающие лекарственные препараты для блокады мышечных сокращений, не способны проявлять болевое поведение. Также данный метод не учитывает пациентов с изменённым сознанием на фоне принимаемых лекарств и патологий [23, 24].

Инструмент для оценки боли у пациентов в бессознательном состоянии (Critical-Care Pain Observation Tool – CPOT) оценивает четыре поведенческих аспекта: выражение лица, движения, мышечные сокращения и соблюдение режима искусственной вентиляции лёгких. Каждый из показателей оценивается в зависимости от степени выраженности от 0 до 8. Минимальное значение интенсивности боли 0, максимальное — 8. Пациенты, находящиеся в отделении реанимации и интенсивной терапии, вне зависимости от уровня сознания реагируют на повреждающий стимул определенной поведенческой реакцией. Поэтому поведенческая шкала оценки интенсивности боли CPOT может быть использована у этой категории пациентов не только для оценки степени интенсивности боли, но и для оценки эффективности анальгезии. [23, 26].

Шкала невербальной боли (Nonverbal Pain Scale – NVPS) – это инструмент для оценки боли у пациентов, которые не могут выразить свои боли словами, например, у детей, людей с когнитивными нарушениями или тех, у пациентов в бессознательном состоянии. По NVPS учитываются в основном три поведенческих аспекта: выражение лица, движения тела, сокращение абдоминальных мышц. Кроме этого добавляются четыре дополнительных параметра, разделённых на две группы. В первую группу входят изменения жизненных показателей и изменение цвета кожи. Вторую группу составляют температура тела и расширение зрачков. Каждый параметр оценивается от 0 до 2, общий результат варьируется от 0 (отсутствие боли) до 10 (сильная боль). Данный метод не применяется широко в отделениях реанимации и интенсивной терапии из-за небольшого количества научных доказательств по эффективности и достоверности метода [23, 27].

Алгоритм оценки боли (Pain Assessment and Intervention Notation – PAIN) – инструмент оценки и лечения боли, разработанный для исследований патологии боли в отделении

реанимации и интенсивной терапии. Алгоритм состоит из трёх частей: оценка боли, оценка способности пациента переносить действие опиоидов и рекомендации по принятию решений о лечении анальгетиками. Оценка боли, согласно данному алгоритму, включает шесть поведенческих показателей: выражение лица, движения тела, позы, звуки, бледность кожных покровов и потоотделение, а также три физиологических показателя: частота сердечных сокращений, артериальное давление и частота дыхания. Каждый из перечисленных показателей оценивается от 0 (отсутствие боли) до 10 (сильная боль). Данный алгоритм является полезным инструментом для стандартизации оценки боли. Однако ограничением инструмента служит субъективное измерение поведенческих и физиологических реакций [23].

Также существуют различные виды визуальных аналоговых шкал, болевых анкет, опросников и т.д., которые применяются для пациентов, способных самостоятельно оценить испытываемую боль. Наиболее широко распространёнными являются визуально-аналоговая шкала боли и цифровая рейтинговая шкала.

Визуально-аналоговая шкала (ВАШ) представлена прямой линией, длина которой составляет 10 см, где начало соответствует отсутствию боли, а конец – сильной боли. Пациент ставит отсечку, соответствующую интенсивности боли. Далее рассчитывают расстояние от начала прямой до отсечки, значение округляют до целого. Полученное число – это балл интенсивности боли. Ноль соответствует отсутствию боли, 10 – нестерпимой боли [28, 29].

Цифровая рейтинговая шкала (ЦРШ) в настоящее время является «золотым стандартом», по оценке интенсивности боли. Бесспорным преимуществом данного метода служит то, что не нужно наличие ручки и бумаги либо же хорошего зрения у пациента, что значительно расширяет применение данной методики. ЦРШ – количественная оценка боли, она представлена одиннадцатью пунктами от 0 – «отсутствие боли» до 10 – «очень сильная боль» [28].

Существуют специальные шкалы для оценки боли у детей [30, 31].

Шкала гримас Вонга-Бейкера предназначена для оценки болевых ощущений у детей от 3 до 7 лет, но также применяется и у взрослых пациентов. Шкала гримас состоит из 6 лиц, начиная от смеющегося (нет боли) до плачущего (боль невыносимая). Специалист, оценивающий боль должен объяснить пациенту в доступной форме о необходимости выбрать, какое из представленных лиц описывает уровень его боли.

Шкала рук (Hand scale) для детей старше трех лет показывает колебания боли от отсутствия (сжатая в кулак рука) до очень сильной боли (полностью разжатая рука).

Поведенческая шкала FLACC (Face, Legs, Activity, Cry, Consolability) разработана для использования у детей с 2 месяцев до 7 лет. Этот метод оценивает боль по пяти поведенческим признакам, соответственно - выражению лица, двигательному возбуждению, мышечному тону, психоэмоциональному состоянию, успокаиваемости. Оценивается от 0 до 2 баллов. Общая сумма по пяти категориям может составлять от 0 (боли нет) до 10 баллов (боль невыносимая).

Цветная шкала Эланда для детей от трех до семи лет (можно старше) Помогает оценить интенсивность боли в разных локализациях. Ребенка просят определить боль с помощью цвета, например, нет боли — нет цвета; слабая боль — желтый цвет; умеренная боль — оранжевый; сильная боль — красный. И далее просят ребенка показать места боли, раскрасив изображение человека выбранными цветами в соответствующих местах.

Поведенческая шкала оценки боли новорожденных (Neonatal Infant Pain Scale – NIPS) разработана для использования у новорожденных до года. Каждый из шести показателей этой шкалы (выражение лица, крик/плач, характер дыхания, руки, ноги, состояние возбуждения) оценивается от 0 до 1-2-3 баллов. Общая сумма по шести категориям может составлять от 0 (боли нет) до 7 баллов (результат в 3 балла указывает на боль)

Для оценки хронической боли используются краткая оценка боли (Brief Pain Inventory, BPI) и опросник боли МакГилла (MPQ) [29, 32].

Краткий опросник оценки боли (Brief Pain Inventory, BPI) – это инструмент, используемый для оценки интенсивности боли и ее влияния на повседневные аспекты жизни, например, настроение, сон, коммуникацию с другими людьми, ходьбу, общую активность. BPI – это анкетный опросник, который пациент заполняет самостоятельно. Пациенту предлагается ответить на ряд вопросов и по каждому пункту дать оценку от 0 до 10 баллов в течение суток, также пациент фиксирует локализацию боли на схематичной картинке тела. BPI помогает врачам понять, насколько боль мешает человеку заниматься своими обычными делами, и выбрать наилучший способ ее облегчения.

Опросник боли МакГилла [33, 34] разработан для контроля боли по продолжительности и для определения динамики какого-либо лечения. Опросник представляет собой анкету, включающую три блока по параметрам боли: сенсорный, аффективный и общий компонент боли. Все параметры рассортированы по силе описываемых болей, то есть содержатся 76 слов-дескрипторов (слов, определяющих боль), из которых пациент должен выбрать подходящие, необязательно из каждого блока. Главным минусом данного метода является длительность его заполнения, пациенту, заполняющему его впервые потребуется около сорока минут [32].

Также существуют специализированные методы оценки боли [32], такие, как лидская шкала оценки нейропатических симптомов и знаков нейропатической боли (Leeds assessment of neuropathic symptoms and sign, LANSS) [35, 36], шкалы для оценки боли у пациентов с онкологическими заболеваниями (memorial pain assessment card, memorial symptom assessment scale – MSAS) [37] и шкала определения боли у пожилых пациентов с деменцией (Mobilization observation behavior intensity dementia pain, MOBID) [38].

Возможности объективных методов в исследовании и оценке степени выраженности болевых ощущений.

При исследовании боли и оценки интенсивности болевых ощущений, возможности методов объективизации крайне ограничены. В настоящее время отсутствуют однозначно объективные методы измерения или визуализации, которые могли бы точно отразить интенсивность и характер болевых ощущений.

Нейрофизиологические методы исследования боли. Наиболее распространенным направлением в исследовании нейрофизиологии боли является объективная оценка ноцицептивной чувствительности [39]. В основном методы основаны на первичной стимуляции волокон периферических нервов (тонких слабо миелинизированных А-дельта-волокон или тонких немиелинизированных С-волокон, реже толстых хорошо миелинизированных А-бета-волокон), воспринимающих болевое раздражение, с последующей регистрацией рефлекторных реакций или изменений биоэлектрической активности сенсорной коры головного мозга [40]

Стимуляционная миография (СМГ) оценивает проводимость по периферическим нервным волокнам. Регистрируется и анализируется сенсорный ответ при стимуляции дистальных отделов нервных волокон (антидромная методика регистрации). При нарушении как поверхностной, так и глубокой чувствительности отмечаются изменения сенсорного ответа: при демиелинизирующих поражениях регистрируется увеличение латентности сенсорного ответа, а при аксональных поражениях отмечается уменьшение амплитуды ответа.

Для оценки ноцицептивных путей периферических нервов применяется микро-нейрография (МНГ), которая позволяет зарегистрировать потенциалы действия отдельных аксонов, и является практически единственным методом, позволяющим регистрировать и количественно оценивать положительную сенсорную симптоматику, опосредованную толстыми миелинизированными волокнами (тактильные парестезии и дизестезии) или малыми миелинизированными и немиелинизированными волокнами (спонтанная боль) [41].

Ноцицептивный флексорный рефлекс (НФР) наряду с мигательным и брюшным относится к защитным рефлексам [42]. Однако именно НФР обладает необходимой информативностью. Он позволяет объективно и количественно определить болевой порог у пациентов. Также позволяет оценить состояние ноцицептивных и антиноцицептивных систем,

изучить роль и влияние различных медиаторов, вовлеченных в процесс боли. Более того, данный рефлекс используется в изучении клинических синдромов, характеризующихся хронической болью или изменённым восприятием боли. Регистрацию рефлекса чаще всего проводят на нижних конечностях. Стимулирующие электроды подключают позади лодыжки на некотором расстоянии друг от друга, катод – проксимальнее, анод – дистальнее. Регистрирующий электрод подключают на брюшке *musculus biceps femoris capitis brevis* и на сухожилии данной мышцы. Заземляющий электрод располагают между стимулирующим и регистрирующим. Процедуру начинают с подачи стимулов малой интенсивности, затем её плавно увеличивают и регистрируют мышечные ответы. При появлении ответа фиксируют его порог, то есть величину тока, при которой был зарегистрирован ответ. Вместе с тем фиксируют субъективный порог боли, то есть величину тока, когда пациент впервые указал на появление острой боли в зоне расположения стимулирующих электродов. У здоровых людей приведённые два значения совпадают [6].

Альгометрия применяется для количественного измерения субъективной оценки боли при предъявлении болевых стимулов, возрастающих по интенсивности [42]. Самым используемым типом альгометров является механический. Исследователь с помощью данного прибора надавливает на определённые участки тела с разной силой. При ощущении очень сильной боли пациент нажимает на кнопку, тем самым фиксирует числовое значение давления. Данный метод широко распространён в исследовании миофасциальной боли различной локализации.

В нейрофизиологических исследованиях применяется метод регистрации вызванных потенциалов [43, 44, 45]. *Вызванным потенциалом (ВП)* называется электрическая активность любых структур нервной системы в ответ на стимуляцию периферических отделов сенсорных систем (экзогенные) или возникающая в связи с оценкой поступающей в мозг информации (эндогенные или связанные с событиями).

Метод ВП является высокочувствительным при диагностике поражения сенсорных систем особенно на ранних стадиях и, что особенно важно, является эффективным при обследовании пациентов, контакт с которыми затруднен, например, с маленькими детьми, пациентами с тяжёлыми психическими заболеваниями или находящимися в бессознательном состоянии.

ВП представляет собой продукт сложной обработки афферентного импульса на уровне рецепторов, периферических нервов, специфических реле спинального уровня, неспецифических звеньев ретикулярной формации и лимбической системы. В вызванном ответе определенным образом отображаются влияния каждого из перечисленных уровней на характер болевого восприятия субъекта, а отдельные компоненты вызванных потенциалов отражают преимущественно влияние структур разных отделов нервной системы [46]. Применяются вызванные потенциалы различной модальности: соматосенсорные, зрительные, слуховые.

Наиболее исследованы ВП и описаны достоверные их изменения в диагностике головной боли, особенно мигрени [47]. В большинстве исследований при анализе *зрительных вызванных потенциалов (ЗВП)* указывается на увеличение латентного периода (ЛП) и амплитуды основных компонентов зрительного ответа: [48 - 54].

При исследовании соматосенсорных вызванных потенциалов (ССВП) у пациентов с абузусной головной болью (АГБ) и пациентов с эпизодической мигренью без ауры было показано, что наименьшие значения амплитуды ССВП выявляются у пациентов с наибольшей длительностью заболевания мигренью, а самые высокие — у пациентов с самой длительной хронизацией болезни [47, 55].

С целью исследования активности симпатической нервной системы у пациентов с мигренью изучали фронтальные *вызванные кожные симпатические потенциалы (ВКСП)*. Показано, что во время мигренозного приступа и в интериктальный период наблюдалось увеличение ЛП и уменьшение максимальных амплитуд на стороне боли по сравнению с асимптомной стороной. В постприступный период ВКСП на стороне боли

Секция 8. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ: НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ, НЕВРОЛОГИЯ, НЕЙРОХИРУРГИЯ, НЕЙРОХИМИЯ И НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

характеризовались более высокими амплитудами и более коротким ЛП по сравнению с асимптомной стороной [56, 57].

Исследование болевой чувствительности и объективная оценка интенсивности болевых ощущений основываются прежде всего на оценке реакций вегетативной нервной системы, а именно на изменениях вегетативных, лазерных, тригеминальных и тепловых ВП [42, 45].

Довольно новым методом изучения болевого синдрома является регистрация лазерных и тепловых вызванных потенциалов [42]. При помощи данных методик доказано, что амплитуда потенциала соотносится с интенсивностью болевого ощущения. Механизмом лазерной стимуляции является генерирование в коже тепловых импульсов, что вызывает активацию ноцицепторов. Такое интенсивное термическое воздействие вызывает мощный поток импульсов, достигающих коры головного мозга, которые несложно зарегистрировать. Тепловые вызванные потенциалы позволяют с помощью избирательной стимуляции тепловыми импульсами тонких волокон изучить их функции. Данная методика также называется СHERPS. Её особенность заключается в том, что специальный датчик способен постепенно, но довольно быстро нагреваться и охлаждаться. Такое исследование используется для объективной оценки болевой чувствительности, контроля эффективности лекарственной терапии и исследований динамических изменений в перцепции боли пациентом. Доказано, что при нарушениях структуры проводящих волокон болевой и температурной чувствительности вызванные потенциалы, зарегистрированные на стимуляцию тонких волокон в головном мозге, практически исчезают. Однако у пациентов, страдающих мигренью или фибромиалгией, наоборот, вызванные потенциалы увеличиваются.

В качестве объективного метода исследования реактивных изменений в мозге и поведенческих реакций человека в ответ на болевые ощущения использовались такие электрографические феномены как *потенциалы мозга, связанные с событиями (когнитивные ВП)*, в частности *условная негативная волна (УНВ) (Contingent Negative Variation - CNV) и компонент P300*.

УНВ представляет собой негативное отклонение электрического потенциала мозга, которое регистрируется при нанесении двух сочетанных стимулов, разделенных определенным промежутком времени. В характеристиках условной негативной волны находят отражение такие сложные психофизиологические феномены, как ожидание, внимание, активация, волевое намерение, мотивация, готовность к действию, вероятный прогноз и др. Изменение параметров условной негативной волны, связанное с психологическим состоянием испытуемых, позволило некоторым авторам использовать данный метод для оценки клинической эффективности фармакотерапии [58,59].

При исследовании пациентов с мигренью отмечено удлинение ЛП волны P300, снижение ее амплитуды и уменьшение длительной габитуации в межприступный период, что свидетельствует о некотором снижении когнитивных функций у пациентов с мигренью [60]. В некоторых исследованиях показано, что P300 при мигрени характеризуется удлинением ЛП [61]. Отмечено удлинение ЛП P300 при регистрации слухового ВП у пациентов в отведениях Fz, Cz и Pz по сравнению с контрольной группой.

Электроэнцефалография (ЭЭГ) может быть полезна при оценке болевых ощущений, особенно при головных болях и других неврологических состояниях, связанных с болью. Хотя ЭЭГ сама по себе не позволяет измерить силу боли, она может помочь выявить структурные или функциональные изменения в мозге, которые могут влиять на болевые ощущения и их обработку. В ряде публикаций в качестве объективных показателей интенсивности болевых ощущений предлагается использовать анализ ритмических составляющих ЭЭГ [62 – 68].

В подавляющем большинстве этих публикаций представлены изменения частотных составляющих ЭЭГ при мигрени. В одних исследованиях отмечается дезорганизация биоэлектрической активности, снижение амплитуды альфа-ритма и повышение мощности бета-ритма как в межприступный период, так и непосредственно до, во время и после

пароксизма [62, 63, 64]. В других имеются указания на возрастание медленноволновой активности дельта- и тета-диапазоов в лобно-центральных областях перед и после приступа по сравнению с межприступным периодом [66, 67]. Также у пациентов с мигренью отмечается усиление высокочастотной активности в диапазоне гамма-ритма [68].

Доказано [69], что активация волн гамма-диапазона участвует в восприятии боли. Повышение гамма-волн после быстрой ноцицептивной стимуляции лазером показывает, что гамма-волны напрямую связаны с перцепцией острой боли. Такая гамма-активность особенно выражена в соматосенсорной коре. Она также коррелирует с интенсивностью болевого ощущения у пациентов с хроническими нарушениями сознания. Известно, что гамма-активность головного мозга участвует в сенсорной, эмоциональной и когнитивной составляющей болевого процесса. Так как хроническая боль – это сложный продолжительный процесс, включающий в себя сенсорные, эмоциональные и когнитивные компоненты, можно сделать вывод, что гамма-активность вовлечена в хроническую боль [69].

В отдельных публикациях указывается, что перед мигренозным пароксизмом мощность ритмов ЭЭГ и когерентность возрастали, наряду с этим уменьшалась когерентность между лобными и затылочными областями во всех спектральных диапазонах ЭЭГ. В межприступный период у пациентов по сравнению со здоровыми наблюдали достоверно меньшую спектральную мощность и когерентность ЭЭГ [70].

Достоверным индикатором боли также может быть рефлекс расширения зрачков на болевой стимул. Симпатический и парасимпатический отделы вегетативной нервной системы иннервируют гладкую мускулатуру радужки, то есть рефлекс происходит автономно. Вышеуказанный процесс лежит в основе *метода пупиллометрии*. Рефлекторное расширение зрачков в ответ на болевой импульс коррелирует с интенсивностью ноцицептивного раздражителя, и его реакция является высокочувствительной и сильной. На основе измерений зрачкового рефлекса получили индекс зрачковой боли (pupil pain index) [71]. Наиболее широкое применение данная шкала получила для оценки операционной анальгезии. Показания данного индекса колеблются от 1 (низкий уровень ноцицепции) до 10 (высокий уровень ноцицепции, то есть низкий уровень анальгезии) [72].

Пупиллометрия – надежный инструмент для мониторинга ноцицепции, широко применяемый с пациентами, сложно идущими на контакт, к примеру, в педиатрии, во время хирургических операций и с бессознательными пациентами [73]. Традиционные методы оценки боли (изменение частоты сердечных сокращений, артериального давления и электроэнцефалограмма) несколько уступают методу пупиллометрии, так как они неспецифичны и нечувствительны к боли во время или после операции и зависят от множества побочных факторов, таких как положение и вес пациента, сердечно-сосудистые патологии, кровотечение и дыхание [74]. Также данный неинвазивный метод является быстрым и лёгким в исполнении для медицинского персонала, не требующим высококвалифицированных сотрудников, а также он комфортный для пациентов. Недостатки метода пупиллометрии заключаются в том, что для проведения процедуры требуется помещение определённой освещённости. Метод пупиллометрии также используется для мониторинга количества введённой анестезии исходя из индивидуальных параметров пациента [75, 76].

В настоящее время используют *методы нейровизуализации* на основе определения биомаркеров боли [77]. По определению Согласительной конференции FDA и NIH 1999 года, биомаркер представляет собой характеристику, которая объективно измерена и оценивается в качестве показателя нормального биологического процесса, патологического процесса или ответа на терапевтическое вмешательство. Биомаркер должен обладать такими свойствами как чувствительность и специфичность.

Выявить такие биомаркеры можно с помощью *функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ)*. При фМРТ определяют изменение мозгового кровотока, изменение функциональной активности структур головного мозга и индекс боли. Также при помощи магнитно-резонансной спектроскопии (МРС) возможно выявить некоторые биохимические маркеры боли – нейротрансмиттеры (глицин, глутамат, ГАМК) и метаболиты

головного мозга (холин, N-ацетиласпартат). Перечисленные субстанции отражают тормозную и возбуждающую активность мозга. МРС позволяет дополнить функциональные и морфологические исследования патологий головного мозга. Нейровизуализация помогает лучше понять роль определённых участков мозга в формировании болевого синдрома, однако реализация данного метода сталкивается с практическими трудностями [69].

Сравнительно недавно было показано, что использование показателей *вариабельности сердечного ритма (ВСР)* может служить объективным методом оценки болевого синдрома и инструментом адекватного контроля боли, и средством контроля эффективности обезболивания и терапии особенно у пациентов в бессознательном состоянии [78 - 84].

Вариабельность сердечного ритма (ВСР) представляет собой изменение временных промежутков между сердечными сокращениями. Данное явление является чувствительным и неинвазивным методом измерения ответа автономной нервной системы, не требующим внешней стимуляции. Также вариабельность сердечного ритма способна индексировать сердечный блуждающий тон (cardiac vagal tone), который отражает влияние парасимпатической нервной системы на регуляцию сердечно-сосудистой системы [80]. Анализ ВСР представляет собой метод оценки состояния механизмов регуляции физиологических функций в организме человека, общей активности регуляторных механизмов, нейрогуморальной регуляции сердца, соотношения между симпатическим и парасимпатическим отделами вегетативной нервной системы и уровнем стресса [81, 82].

ВСР считается достоверным методом оценки ответа вегетативной нервной системы на ноцицептивный импульс. Более того, ВСР может служить показателем активности барорефлекса, который обеспечивает регуляцию кардиовагального контроля и взаимодействие сердечно-сосудистого симпатико-парасимпатического баланса. Пациенты, страдающие хронической болью, имеют сниженный уровень ВСР и чувствительности барорефлекса из-за изменений сердечной деятельности, которая нарушает баланс в сторону преобладания симпатических эффектов. Доказано, что симпатическая активность является ответом автономной нервной системы на боль, не зависимо от природы происхождения болевого стимула. Однако парасимпатический отдел автономной нервной системы также имеет связь с болевым ощущением [83]. Когда парасимпатическое влияние на вариабельность сердечного ритма высоко, происходит снижение уровня боли. Полагают, что ВСР является результатом влияния различных регуляторных механизмов (нервных, гуморальных, гормональных) на систему кровообращения [84].

Метод ВСР основан на распознавании и измерении временных интервалов между R-зубцами электрокардиограммы, построении динамических рядов кардиоинтервалов и анализа полученных числовых рядов статистическими методами. Динамический ряд кардиоинтервалов принято называть кардиоинтервалограммой (КИГ). При анализе КИГ выделяют кратковременные и долговременные записи. Долговременные могут быть получены при 24-х и 48-часовом мониторингировании ЭКГ. Кратковременные в свою очередь получают при исследовании, длящимся минуты, десятки минут или несколько часов [84].

Главный недостаток метода ВСР заключается в том, что в настоящее время много разногласий по поводу нормальных значений ВСР, что делает оценку патологических значений сложной задачей [85].

Заключение.

Проблема боли и обезболивания занимает одно из центральных мест в современной медицине. Боль возникает при самых разных патологиях, в структуре известных симптомов и синдромов боль является наиболее частым проявлением. Наличие болевого синдрома негативно влияет как на эффективность лечения основного заболевания, так и на качество жизни человека. Существующие в настоящее время «инструменты» оценки боли - субъективные и объективные методы по отдельности имеют определенные достоинства и недостатки, но при комплексном их применении при различных заболеваниях оказываются достаточно эффективными. Однако, в настоящее время весьма актуальным остается поиск объективных методов количественной оценки степени выраженности боли, что особенно

значимо для пациентов в бессознательном состоянии, поскольку наличие боли у таких пациентов очень затрудняет процесс лечения и выздоровления.

Литературные источники.

1. IASP Subcommittee on Taxonomy. Pain terms: a list with definitions and notes on usage // *Pain*. - 1979. - Vol. 6. - P. 249–252.
2. Melzack R. Phantom limbs, the self and the brain (the D. O. Hebb Memorial Lecture) // *Canadian Psychology / Psychologie canadienne*. - 1989. - 30(1) - P. 1–16. <https://doi.org/10.1037/h0079793>
3. Melzack R. Phantom limbs and the concept of a neuromatrix // *Trends in Neurosciences*. - 1990. - Volume 13. - Issue 3. - p.88-92. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90179-E](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90179-E).
4. Кассиль Г.Н. Наука о боли. — М.: Медицина, 1975. — 151 с
5. Филатов Е.Г., Вейн А.М. Фармакология боли // *Русский медицинский журнал*. - 1999. - 9: 3.
6. Вейн А.М., Данилов А.Д. Болевые синдромы в неврологической практике. - Издательство: МЕДпресс-информ. - 2001. - 368 с.
7. Магжанов Р.В., Ибатуллин Р.А. Болевые синдромы в неврологии: учебное пособие // Уфа: ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. - 2021.
8. Merskey H., Bogduk N. IASP Task Force on Taxonomy / 2nd ed. IASP Press, 1994, p. 209.
9. Кукушкин М.Л., Решетняк В.К. Механизмы возникновения острой боли и хронических болевых синдромов // *Materia Medica*, 1997. - С 5 –21.
10. Опросники и шкалы для оценки боли / Российское межрегиональное общество по изучению боли (РОИБ) - <https://painrussia.ru/publications/the-questionnaires-and-scales-to-assess-pain>
11. Калюжный Л.В. Физиологические механизмы регуляции болевой чувствительности. — М.: Медицина, 1984. — 215 с.
12. Лиманский Ю.П. Основные принципы функциональной организации ноцицептивных и антиноцицептивных систем мозга // *Физиол. журнал*. — 1989. — № 2. — С. 110-121.
13. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы. — М.: Медицина, 1997. — 350 с.
14. Кукушкин М.Л., Хитров Н.К. Общая патология боли. — М.: Медицина, 2004. — 144 с.
15. Корнюшенков Е.А. Современный взгляд на теорию боли. Методы лечения боли // *Анестезиологическое ветеринарное общество «Институт развития ветеринарной интенсивной терапии, анестезиологии и реаниматологии – ВИТАР»*. - <https://www.biovitar.ru/sovremennyiy-vzglyad-na-teoriyu-boli-metodyi-lecheniya-boli/>
16. Овсянников В.Г., Бойченко А.Е. и др. Антиноцицептивная система // *Медицинский вестник Юга России*. - 2014. - № 3. - С. 46–54.
17. Овсянников В.Г., Бойченко А.Е., Алексеев В.В., Каплиев А.В., Шумарин А.Е., Котиева И.М., Алексеева Н.С., Вартамян Э.Э., Кутузова А.А., Гулян М.В. Антиноцицептивная система. Эндогенные механизмы обезболивания // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. - 2019. - Т. 63, № 4. - С. 131–132.
18. Daroff R.B., Fenichel G.M., Jankovic J., Mazziotta J.C. Principles of Pain Management // *Bradley's Neurology in Clinical Practice*. - 6th ed. - 2012. - Chapter 44. - С. 783-801.
19. Jones H.R., Burns T.M., Aminoff M.J., Pomeroy S.L. Pain pathways anatomy ascending pathways endorphin system // *The Netter collection of medical illustrations: spinal cord and peripheral motor and sensory systems*. - 2nd ed. - 2013. - Section 8. - С. 201-24.
20. Карелов А.Е., Рязанкина А.А., Семкичев В.А., Карелов Д.А., Заболотский Д.В., Кулева С.А. Оценка интенсивности боли: инструменты и их клиническое применение // *Обзорная статья, Медицинский Совет*. - 2023. - № 11. - С. 108-118.
21. Мохов Е.М., Кадыков В.А., Сергеев А.Н., Аскеров Э.М., Любский И.В., Морозов А.М., Радайкина И.М. Оценочные шкалы боли и особенности их применения в медицине // *Обзор литературы, Верхневолжский медицинский журнал*. - 2019. - Т. 18, вып. 2. - С. 34-37.
22. Бахтадзе М.А., Шевченко Э.И. Шкала оценки боли в отделении интенсивной терапии: краткое знакомство // *Российский журнал боли*. - 2024. - Т. 22, № 1. - С. 84-86.

23. Li D., Puntillo K., Miaskowski C. A Review of Objective Pain Measures for Use With Critical Care Adult Patients Unable to Self-Report // *The Journal of Pain*. - 2008. - Vol. 9, № 1. - С. 2-10.
24. Webb M.R., Kennedy M.G. Behavioral responses and self-reported pain in postoperative patients // *J Post Anesth Nurs*. - 1994. - С. 91-95.
25. Спасова А.П., Третьякова О.Г. Оценка боли у пациентов в отделении интенсивной терапии // *Российский журнал боли*. — 2011. — № 2 (31). — С. 25—26.
26. Zhai Y., Cai S., Zhang Y. The Diagnostic Accuracy of Critical Care Pain Observation Tool (CPOT) in ICU Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis // *J Pain Symptom Manage*. - 2020. - С. 847-856.
27. Ghayem H., Heidari M.R., Aghaei B., Norouzadeh R. The Effect of Training the Nonverbal Pain Scale (NVPS) on the Ability of Nurses to Monitor the Pain of Patients in the Intensive Care Unit // *Indian J Crit Care Med*. - 2023. - С. 195-200.
28. Илюкевич Г.В., Жудро А.А., Жуковец О.В. Боль и методы ее оценки // *Emergency Medicine*. - 2015. - № 4. - С. 92-102.
29. Osterweis M., Kleinman A., Mechanic D. Pain and Disability: Clinical, Behavioral and Public Policy Perspectives // *Institute of Medicine (US) Committee on Pain, Disability, and Chronic Illness Behavior*. - 1987.
30. Савва Н. Н. Алгоритмы оценки и лечения боли у детей. - М., 2015. - 92 с.
31. Клинические рекомендации. Болевой синдром (БС) у детей, нуждающихся в паллиативной медицинской помощи. - 2016.- 58 с.
32. Анисимова Е.Н., Зорян Е.В., Дзгоева О.В. Анализ современных методов оценки ноцицептивной боли и эффективности обезболивания // *Стоматология детского возраста и профилактика*. - 2012. - С. 101-104
33. Жудро А.А. Острая боль в хирургической практике и её количественная оценка // *Медицинские новости*. — 2007. — № 7. — С. 12—18.
34. Морган-мл. Дж. Эдвард, Мэгид М.С. Клиническая анестезиология: книга 1-я / Пер. с англ. — М. — СПб.: Издательство БИНОМ — Невский Диалект, 2001. — 396 с.
35. Bennett M. The LANSS Pain Scale: the Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs. *Pain*. 2001 May;92(1-2):147-57. doi: 10.1016/s0304-3959(00)00482-6. PMID: 11323136.
36. Юсупова Д.Г., Супонева Н.А., Зимин А.А. и др. Валидация Лидской шкалы оценки нейропатической боли (LANSS) в России // *Нервно-мышечные болезни*.- 2018;8(3): 43–50.
37. РК Портеной, НТ Талер, АВ Корнблит, J. McCarthy Lepore, H. Friedlander-Klar, E. Kiyasu, K. Sobel, N. Coyle, H. Кемени, Л. Нортон, X. Шер The Memorial Symptom Assessment Scale: an instrument for the evaluation of symptom prevalence, characteristics and distress // *European Journal of cancer*/ – 1994. - Volume 30, Issue 9, P. 1326-1336
38. Husebo BS, Strand LI, Moe-Nilssen R, Husebo SB, Snow AL, Ljunggren AE. Mobilization-Observation-Behavior-Intensity-Dementia Pain Scale (MOBID): development and validation of a nurse-administered pain assessment tool for use in dementia. *J Pain Symptom Manage*. 2007 Jul; 34(1):67-80. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2006.10.016. Epub 2007 May 23. PMID: 17509814.
39. Хабиров Ф.А., Гранатов Е.В., Ахмедова Г.М. и др. Нейрофизиологические методы оценки болевой чувствительности и ноцицептивных проводящих путей нервной системы // *Российский журнал боли*. 2015;(2):41–45.
40. Cruccu G., Aminoff M.J., Curio G., et al. Recommendations for the clinical use of somatosensory-evoked potentials. *Clin Neurophysiol*. 2008;119:1705–19.
41. Jorum E., Schmelz M. Microneurography in the assessment of neuropathic pain // *Handb Clin Neurol*. 2006;81:427–38.
42. Данилов А.Н., Данилов А.Л. Управление болью: карманные рекомендации по диагностике и фармакотерапии / 2018, с. 47–66.
43. Гнездицкий В.В. Вызванные потенциалы мозга в клинической практике // *Таганрогского государственного радиотехнического университета*. - 1997. - 263 с.
44. Нейрофизиологические исследования в клинике (под ред. Трошиной Е.М.) // *Москва*. - 2019.- 306 с.
45. Торопина Г.Г. Вызванные потенциалы: руководство для врачей / М.: МЕДпресс-информ, 2016, 286 с.

46. Зенков Л.Р., Мельничук П.В. Центральные механизмы афферентации у человека. Москва. - 1985. - 271 с.
47. Сорокина Н.Д., Жердева А.С., Селицкий Г.В., Цагашек А.В. Нейрофизиологические методы оценки различных форм мигрени. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2021;121(4):121–126. <https://doi.org/10.17116/jnevro2021121041121>
48. Aurora SK, Wilkinson F. The brain is hyperexcitable in migraine. Cephalalgia. 2007;27(12):1442–1453. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2007.01502.x>
49. Coppola G, Pierelli F, Schoenen J. Is the cerebral cortex hyperexcitable or hyperresponsive in migraine? Cephalalgia. 2007;27(12):1427–1439. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2007.01500.x>
50. Deen M, Christensen CE, Hougaard A, et al. Serotonergic mechanisms in the migraine brain — a systematic review. Cephalalgia. 2017;37(3):251–264. <https://doi.org/10.1177/0333102416640501>
51. Sand T, Zhitniy N, White LR, Stovner LJ. Visual evoked potential latency, amplitude and habituation in migraine: a longitudinal study. Clin Neurophysiol. 2008;119(5):1020–1027. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2008.01.009>
52. Sand T, White LR, Hagen K, Stovner LJ. Visual evoked potential and spatial frequency in migraine: a longitudinal study. Acta Neurol Scand Suppl. 2009;(189):33–37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2009.01211.x>
53. Ambrosini A, Coppola G, Gerardy PY, et al. Intensity dependence of auditory evoked potentials during light interference in migraine. Neurosci Lett. 2011;492(2):80–83. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.01.060>
54. Sand T, Zhitniy N, White LR, Stovner LJ. Visual evoked potential latency, amplitude and habituation in migraine: a longitudinal study. Clin Neurophysiol. 2008;119(5):1020–1027. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2008.01.009>
55. Coppola G, Schoenen J. Cortical excitability in chronic migraine. Curr Pain Headache Rep. 2012;16(1):93–100. <https://doi.org/10.1007/s11916-011-0231-1>
56. Табеева Г.Р., Яхно Н.Н. Мигрень. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. Tabeeva G.R., Yakhno N.N. Migren'. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (In Russ.).
57. Yildiz SK, Yildiz N, Korkmaz B, et al. Sympathetic skin responses from frontal region in migraine headache: a pilot study. Cephalalgia. 2008;28(7):696–704. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2008.01574.x>
58. Кануников И.Е. Условная негативная волна (CNV) как электрофизиологический показатель ВЕСТНИК ВГМУ, 2002, ТОМ 1, № 2 97 психической деятельности человека: Сообщение 1: Феноменология CNV // Физиология человека - 1980.- Т. 6, № 3.- С. 505-519
59. Вейн А.М., Вознесенская Т.Г., Данилов А.Б. Влияние аспирина на УНВ у здоровых испытуемых // Журн. невропатол. и психиатр. - 1995. - № 4. - С. 45 – 46.
60. de Tommaso M, Ambrosini A, Brighina F, et al. Altered processing of sensory stimuli in patients with migraine. Nat Rev Neurol. 2014;10(3):144–155. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.14>
61. Singh A, Joshi D, Yadav R, et al. Central cognitive processing assessed by P300 in migraine, tension-type headache, and cluster headache. Int J Clin Exp Physiol. 2015;2(4):220–223.
62. Magisa D, Lisicki M, Coppola G. Highlights in migraine electrophysiology: are controversies just reflecting disease heterogeneity? Curr Opin Neurol. 2016;29(3):320–330. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000335>
63. Сорокина Н.Д., Перцов С.С., Селицкий Г.В. Нейробиологические механизмы головной боли напряжения и мигрени: сходства и различия. Российский журнал боли. 2018;(3):96–108. <https://doi.org/10.25731/RASP.2018.03.024>
64. de Tommaso M, Stramaglia S, Marinazzo D, et al. Functional and effective connectivity in EEG alpha and beta bands during intermittent flash stimulation in migraine with and without aura. Cephalalgia. 2013;33(11):938–947. <https://doi.org/10.1177/0333102413477741>
65. Nyrke T, Kangasniemi P, Lang H. Alpha rhythm in classical migraine (migraine with aura): abnormalities in the headache-free interval. Cephalalgia. 1990;10(4):177–182. <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.1990.1004177.x>
66. Bjork M, Sand T. Quantitative EEG power and asymmetry increase 36 h before a migraine attack. Cephalalgia. 2008;28(9):960–968. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2008.01638.x>

67. Bjork MH, Stovner LJ, Engstrøm M, et al. Interictal quantitative EEG in migraine: a blinded controlled study. *J Headache Pain*. 2009;10(5):331–339. <https://doi.org/10.1007/s10194-009-0140-4>
68. Restuccia D, Vollono C, Del Piero I, et al. Somatosensory High Frequency Oscillations reflect clinical fluctuations in migraine. *Clin Neurophysiol*. 2012;123(10):2050-6. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.03.009>
69. Zhao Z., Wan Y. Electrophysiological signature of pain // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. - 2018. - C. 167-175.
70. Cao Z, Lin Ch, Chuang Ch-H, et al. Resting-state EEG power and coherence vary between migraine phases. *J Headache Pain*. 2016;17(1):102. <https://doi.org/10.1186/s10194-016-0697-7>
71. Vincclair M., Schilte C., Roudaud F., et al. Using pupillary pain index to assess nociception in sedated critically ill patients // *Anesth Analg*. - 2019. - Vol. 129. - C. 1540-1546.
72. Kegels N., Vera S., Guy H., Davina W. A feasibility study of the pupillary pain index measurement in anesthetized children // *Anesth Crit Care*. - 2021. - Vol. 3. - C. 10-20.
73. Lopez de Audicana-Jimenez de Aberasturi Y. и др. Pupillary dilation reflex and behavioural pain scale: Study of diagnostic test // 2023.
74. Singh A., Akhileshwar, Kumar N., Rana De R., Bahadur R., Shekhar S. The Role of Pupillometry in the Assessment of Pain in Children Under General Anesthesia: A Prospective Single-Blinded Observational Study // 2023.
75. Wildemeersch D., Baeten M., Peeters N., Saldien V., Vercauteren M., Hans G. Pupillary dilation reflex and pupillary pain index evaluation during general anaesthesia: a pilot study // *Rom J Anaesth Intensive Care*. - 2018. - Vol. 25. - C. 19-23.
76. Wildemeersch D., Peeters N., Saldien V., Vercauteren M., Hans G. Pain assessment by pupil dilation reflex in response to noxious stimulation in anaesthetized adults // 2018. – C.1050-1056.
77. Илюкевич Г.В., Жудро А.А., Жуковец О.В. Боль и методы ее оценки // *Emergency Medicine*. - 2015. - № 4. – C. 92-102.
78. Ценципер Л. М., Кондратьева Е. А., Денисова А. А., Айбазова М. И., Кондратьев С. А., Кутырева И. А., Кондратьев А. Н., Вострикова С. А., Ширяев Д. С., Смирнова И. Г. Возможности и перспективы оценки болевой ноцицепции у пациентов с хроническими нарушениями сознания // *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. – 2023. – Т. 20, № 4. – С. 19–26. DOI: 10.24884/2078-5658-2022-20-4-19-26.
79. Черняев С.А., Новиков Е.М., Наговицын А.В., Казанцева И.В., Ардашев В.Н., Журавлев С.В., Бояринцев В.В. Анализ вариабельности сердечного ритма в оценке болевого синдрома. // *ж. Кремлевская медицина. Клинический вестник*. – 2025.- №1. – С. 56-59.
80. Laborde S., Mosley E., Thayer J.F. Heart Rate Variability and Cardiac Vagal Tone in Psychophysiological Research: Recommendations for Experiment Planning, Data Analysis, and Data Reporting // 2017. – C.213.
81. Peabody J.E., Ryznar R., Ziesmann M.T., et al. A Systematic Review of Heart Rate Variability as a Measure of Stress in Medical Professionals // *Cureus*. - 2023. - Vol. 15, № 1.
82. Kim H.-G., Cheon E.-J., Bai D.-S., Lee Y.H., Koo B.-H. Stress and Heart Rate Variability: A Meta-Analysis and Review of the Literature // 2018. – C.235-245.
83. Forte G., Troisi G., Pazzaglia M., De Pascalis V., Casagrande M. Heart Rate Variability and Pain: A Systematic Review // 2022. – C.153.
84. Баевский Р.М., и др. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем // *Вестник аритмологии*. - 2001. - № 24. - С. 69–85.
85. Nunan D., Sandercock G.R.H., Brodie D.A. A quantitative systematic review of normal values for short-term heart rate variability in healthy adults // *Pacing Clin Electrophysiol*. - 2010. – C.1407-1417.

Сведения об авторах

Елена Михайловна Трошина

К.б.н., вед.н.с. ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия

Эл. почта: ETroshina@nsi.ru

Information about author

Elena Michailovna Troshina

PhD (Biol.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

E-mail: ETroshina@nsi.ru

Секция 8. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ: НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ, НЕВРОЛОГИЯ, НЕЙРОХИРУРГИЯ, НЕЙРОХИМИЯ И НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

Стефания Олеговна Болтнева

студентка ФГАОУ ВО «Российский Национальный
Исследовательский Медицинский Университет
имени Н.Н.Пирогова» МЗ РФ, Москва, Россия
Эл. почта: boltneva.stefania@gmail.com

Елена Васильевна Шарова

Д.б.н., главный н.с. ФГБУН «Институт высшей
нервной деятельности и нейрофизиологии РАН»
Москва, Москва
Эл. почта: ESharova@nsi.ru

Александровна Воронина Ирина

Д.м.н., с.н.с, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бур-
денко» МЗ РФ, Москва, Россия
Эл. почта: IVoronina@nsi.ru

Ольга Борисовна Сазонова

К.м.н., в.н.с., ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бур-
денко» МЗ РФ, Москва, Россия
Эл. почта: OSazonova@nsi.ru

Stefania Olegovna Boltneva

Student of Federal State Budgetary Educational Institu-
tion of Higher Education "Pirogov Russian National
Research Medical University" of the Ministry of Health
of the Russian Federation, Moscow, Russia
E-mail: boltneva.stefania@gmail.com

Elena Vasilyevna Sharova

Doctor of Science (Biol.), Chief Researcher,
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiol-
ogy of the Russian Academy of Sciences", Moscow
E-mail: ESharova@nsi.ru

Irina Alexandrovna Voronina

Doctor of Science (Med.), Senior Scientist, Burdenko
National Medical Research Center of Neurosurgery of
the Ministry of Health of the Russian Federation, Mos-
cow, Russia, E-mail: IVoronina@nsi.ru

Olga Borisovna Sazonova

PhD (Med.), Leading Researcher, Burdenko National
Medical Research Center of Neurosurgery of the Minis-
try of Health of the Russian Federation, Moscow, Rus-
sia, E-mail: OSazonova@nsi.ru

УДК 159.953

ГРНТИ 15.21.41

DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.313-318

Е.Г. Чибисова, О.Н. Усатенко

Институт психологии ФГБОУ ВО «Херсонский государ-
ственный педагогический университет»

ЦИФРОВАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И КОГНИТИВНАЯ СФЕРА ПСИХИКИ

*В статье дан обзор и углубленный анализ научных исследований последних лет, посвящен-
ных изучению влияния цифровой трансформации на когнитивную сферу психики человека.
Целью данной статьи является обзор, анализ и систематизация исследований, раскрыва-
ющих когнитивные аспекты цифровой трансформации и определение возможных послед-
ствий адаптации человека к новым условиям.*

Ключевые слова: цифровая трансформация, когнитивные нарушения, клиповое мышление,
цифровая деменция, когнитивные функции, цифровая зависимость.

E.G. Chibisova, O.N. Usatenko

Institute of Psychology, Federal State Budgetary Educational Institution
of Higher Education
"Kherson State Pedagogical University"

DIGITAL TRANSFORMATION AND THE COGNITIVE SPHERE OF THE PSYCHE

*The article provides an overview and in-depth analysis of recent scientific research devoted to the
study of the impact of digital transformation on the cognitive sphere of the human psyche.
The purpose of this article is to review, analyze and systematize studies that reveal the cognitive
aspects of digital transformation and determine the possible consequences of human adaptation
to new conditions.*

Key words: digital transformation, cognitive impairment, clip thinking, digital dementia, cognitive
functions, digital addiction.

Введение

Цифровая трансформация в XXI веке привела к кардинальным изменениям во всех
сферах жизни человека, от профессиональной деятельности до межличностного общения.

Интеграция цифровых технологий в повседневность формирует новую когнитивную среду, влияние которой на психические функции человека неоднозначно и требует изучения. С одной стороны, цифровизация открыла новые возможности для развития пространственного мышления и повышения скорости обработки информации, для профилактики возрастных когнитивных нарушений у пожилых людей с помощью тренировки мозга путем освоения новых цифровых инструментов, но с другой стороны, исследования показывают, что чрезмерное использование цифровых устройств может негативно сказываться на когнитивных функциях, таких как внимание, память, аналитическое и критическое мышление, а также способствовать поверхностному восприятию информации без ее глубокого осмысления и понимания [2].

Актуальность исследования обусловлена стремительной интеграцией цифровых технологий во все сферы жизни и необходимостью понимания как позитивных аспектов этого влияния, так и возможных рисков, а также долгосрочных последствий цифровизации для когнитивного здоровья человека.

Изучение влияния цифровых технологий на когнитивные функции критически важно для Российской Федерации в контексте активной цифровизации экономики и социальной сферы. Хотя цифровизация повышает эффективность, она несет риски для психического и когнитивного благополучия населения. Разработка научно обоснованных рекомендаций по минимизации негативных эффектов необходима для повышения эффективности социальной политики в области психического здоровья и профилактики зависимостей.

Важность темы подчеркивается также необходимостью адаптации граждан к условиям интенсивно развивающегося цифрового общества (ИИ, автоматизация). Успешная адаптация требует развития устойчивости к цифровому стрессу, оптимизации использования устройств и формирования критико-аналитических навыков. Таким образом, исследование влияния цифровизации на когнитивную сферу психики имеет стратегическое значение, так как понимание этих механизмов позволит предложить практические меры для укрепления когнитивных способностей и повышения глобальной конкурентоспособности населения России, а также разработать эффективные стратегии адаптации, минимизировать риски деградации когнитивных функций и сохранить психическое здоровье человека в условиях цифровой эпохи.

Задачей данного исследования является теоретико-методологический анализ существующих исследований влияния цифровой трансформации на когнитивную сферу психики; изучение характера и механизмов данного влияния на когнитивные процессы; определение возможных положительных и отрицательных последствий адаптации когнитивной сферы человека к требованиям новых цифровых технологий.

Цифровая трансформация и изменение когнитивных функций человека

Цифровая трансформация – это процесс интеграции и массового внедрения современных цифровых технологий (интернет, искусственный интеллект, машинное обучение, включая автоматизацию процессов), во все сферы человеческой деятельности, приводящий к революционным изменениям в бизнесе, экономике, политике и социальной жизни (авторское определение).

Широкое использование смартфонов, социальных сетей, мобильных приложений, мессенджеров и др. новых технологий, возникших в следствии цифровой трансформации, характеризуется резким увеличением информационных потоков, воздействующих на человека, что ведёт к изменению традиционных моделей коммуникаций, управления и повседневной жизни общества и личности. Стираются границы между физическим и цифровым миром, где виртуальное заменяет действительность. Человек живет в двух параллельных реальностях физической и цифровой, причем последняя часто доминирует и заменяет традиционные ценности и времяпровождение. Цифровые технологии меняют социальную реальность ускоренными темпами и создают предпосылки для ускоренной адаптации человека к вызовам цифровой трансформации [3]. При этом человек становится не только потребителем информации, но и объектом её применения, в том числе в области

биотехнологий и разработки искусственного интеллекта.

Новые условия требуют адаптации человека, оказывая влияние на такие когнитивные функции, как внимание, память, мышление и принятие решений, а также ставят перед человеком новые вызовы и требования. Высокий темп цифровых преобразований и необходимость быстрой адаптации при этом зачастую вызывает у людей повышенную тревожность, способствует развитию стресса и цифровой зависимости, а также негативно влияет на когнитивные функции, способствуя возникновению симптомов цифровой деменции и феномена клипового мышления.

С одной стороны, многочисленные исследования последних лет подчеркивают позитивные эффекты цифровых технологий, которые способствуют повышению скорости и эффективности обработки информации, развитию мультизадачности и гибкости мышления. Современные информационные платформы позволяют пользователям оперативно находить и быстро использовать значительные объёмы данных, что развивает у человека способность быстро переключаться между задачами и адаптироваться к меняющимся условиям деятельности. Цифровые технологии оказывают значительное влияние на формирование новых когнитивных стратегий человека, обеспечивая более быстрый доступ к информации, расширяя когнитивные возможности и стимулируя развитие навыков, необходимых для эффективного функционирования в условиях современной информационно-насыщенной среды.

Однако, с другой стороны, имеется значительное количество данных о негативных последствиях, таких как снижение способности к концентрации внимания, ухудшение памяти и аналитического мышления, что может привести к другим когнитивным нарушениям психики.

Несмотря на очевидные преимущества цифровых технологий, необходимо учитывать и существенные негативные последствия, которые сопровождают их активное использование. Так на пример, как показывают результаты многочисленных исследований, цифровая среда оказывает значительное влияние на нейро-пластичность мозга подрастающего поколения, но это влияние может быть как положительным (развитие новых навыков), так и отрицательным, ведущим к изменениям в различных областях мозга. Результаты исследования российских и зарубежных научных источников, проведенных Авдеевой Е.А. и Корниловой О.А., говорят о том, что частое использования интернета детьми до трех лет вызывает у них задержку созревания серого и белого вещества мозга, что может приводить в последствии к снижению их интеллекта. Другим подтверждением влияния цифровой среды на мозг пользователей, являются результаты исследования участников ролевой онлайн-игры, выявившие у респондентов через 6 недель значимое сокращение серого вещества в орбито-фронтальной коре мозга, участвующей в управлении и принятии решений [1]. Для понимания долгосрочных последствий таких изменений мозга необходимы дальнейшие исследования.

Одним из наиболее тревожных аспектов влияния цифровой среды на человека, является снижение его когнитивных способностей, возникающее вследствие чрезмерного и неконтролируемого применения электронных устройств и цифровых ресурсов. В научной литературе это явление получило название «цифровая деменция» (digital dementia) [9, p.290], введенное в широкий оборот немецким психиатром Манфредом Шпитцером. Под цифровой деменцией понимается ухудшение таких когнитивных функций, как память, внимание и мышление, вызванное чрезмерным использованием цифровых устройств, особенно в развлекательных целях и социальных медиа.

Согласно ряду исследований, когнитивные нарушения формируются в результате того, что цифровые устройства постоянно перегружают человеческий мозг огромным объемом информации, которую мозг не всегда способен эффективно обрабатывать. Возникает состояние информационной перегрузки, приводящее к снижению способности к концентрации, ухудшению рабочей памяти и снижению навыков глубокого анализа и синтеза информации. Так одним из важных аспектов когнитивных нарушений, связанных с

цифровизацией, является феномен «клипового мышления». Это понятие характеризует фрагментарность и поверхностность восприятия информации, затруднение в удержании внимания на длительных текстах или сложных задачах и потерей способности к глубокому анализу получаемой информации. Клиповое мышление увеличивает объем обрабатываемой информации, но снижает способность к критическому анализу, логике, запоминанию и концентрации, что приводит к поверхностному восприятию и быстрой утомляемости при обучении [4]. Вследствие этого происходит снижение критического и аналитического подходов к изучению информации, ослабление рефлексивных процессов, импульсивность и неспособность сосредотачиваться на одной задаче в течение длительного времени. И если одной стороной этой адаптационной трансформации является повышение многозадачности и гибкости, то обратной стороной этого эффекта оказывается неспособность человека обдумывать и перерабатывать получаемую информацию, что приводит к потере способности к глубокому анализу, заменяя его поверхностным восприятием. Вместо рационального осмысления человек начинает опираться на эмоционально-образные реакции, а это в свою очередь приводит к фатальному снижению критического осмысления получаемой информации, из-за чего у современного поколения формируется импульсивное, поверхностное мышление, вера в правдивость контента, получаемого из сети и подверженность манипуляциям [6].

Также, доказано, что чрезмерное и пассивное использование интернета, скроллинга и социальных сетей связано с появлением и ростом симптомов зависимости. Причиной этого является в том числе синдром FOMO («Fear of Missing Out») [11, p. 145], который характеризуется страхом упустить важную информацию или события, что заставляет пользователей непрерывно проверять социальные сети и мессенджеры, усиливая тревожность и снижая общее качество жизни. Исследования демонстрируют, что данный феномен ассоциируется с хроническим чувством скуки и одиночества, снижает общий эмоциональный фон, уменьшает удовлетворенность жизнью, подрывает самооценку и значительно ухудшает способность к осознанной, рефлексивной деятельности. [9, p.292].

Показательным примером того, как повышенная тревожность влияет на способность к концентрации внимания, являются результаты исследований, подтверждающих феномен так называемой утечки мозга «brain drain» [7, p. 140], при котором простое присутствие смартфона рядом с человеком значительно снижает доступный ему в это время когнитивный ресурс. Это явление связано с автоматической активацией внимания к устройству, что требует значительных усилий для его подавления и перераспределения когнитивных ресурсов.

Помимо когнитивных изменений, цифровая трансформация оказывает значительное влияние на эмоциональную регуляцию и социальные навыки человека. Современные исследования показывают, что длительное пребывание в цифровой среде может приводить к снижению способности к эмоциональной саморегуляции, что особенно заметно у подростков и молодых людей [12, p.279]. Это связано с тем, что виртуальное общение часто лишено эмоциональной глубины и не требует развития навыков эмпатии, что может в свою очередь приводить к снижению способности к сопереживанию и изменениям в развитии эмоционального интеллекта у молодых людей.

Негативные последствия эмоционального плана тесно связаны с ухудшением социальных коммуникаций. Пользователи, проводящие значительное количество времени в цифровой среде, часто испытывают затруднения в поддержании реальных межличностных отношений, в том числе игнорируя собеседника и предпочитая живому общению взаимодействие с телефоном. Виртуальные коммуникации начинают вытеснять непосредственное личное взаимодействие, что приводит к социальной изоляции, проблемам в установлении эмоционального контакта с окружающими, ослаблению навыков эмпатии и межличностного взаимодействия [9, p.292].

Важным аспектом проблемы негативного влияния цифровой среды является связь между активным использованием гаджетов и возникновением агрессивных форм

поведения. Согласно исследованиям, у подростков, постоянно играющих в агрессивные видеоигры, повышается вероятность проявления агрессивного поведения в реальной жизни. Это связано с тем, что видеоигры формируют устойчивые модели агрессивного поведения, которые подростки переносят в социальную среду, зачастую не осознавая отличий между реальной жизнью и виртуальной реальностью, они сталкиваются с трудностями в реальном взаимодействии. Ухудшаются их социальные навыки, развиваются замкнутость, появляются трудности в общении, занижается самооценка.

Кроме того, постоянное сидение за играми нарушает нормальный режим дня, человек поздно ложится, плохо спит, а наутро чувствует себя разбитым. Получается замкнутый круг – усталость мешает учёбе и общению, а это в свою очередь подталкивает снова уходить в виртуальный мир [10]. При этом активное использование смартфонов и других цифровых устройств тесно связано с нарушением сна. Это проявляется в трудностях засыпания, ухудшении качества и продолжительности сна, что, в свою очередь, негативно сказывается на общем психическом состоянии, повышая уровень тревожности и раздражительности. Нарушения сна связаны с постоянной стимуляцией мозга цифровым контентом и неспособностью эффективно переключиться на отдых, что приводит к хроническому истощению когнитивных и эмоциональных ресурсов. [12, р. 281]

Важно отметить, что влияние цифровых технологий обрушивается не только на подростков, но и на детей дошкольного возраста. Так в сегодняшних реалиях дети впервые сталкиваются с цифровыми гаджетами раньше, чем начинают говорить, читать и общаться со сверстниками. И как показывают результаты опросов, на сегодняшний день сохраняется противоречие между желаемым и реальным использованием гаджетов детьми дошкольного возраста. Если родители стремятся к использованию развивающего цифрового контента, то на практике преобладает пассивный просмотр мультфильмов и развлекательных видео детьми, что негативно влияет на их когнитивные функции [5].

Одним из менее изученных аспектов влияния цифровой трансформации является её воздействие на креативность. С одной стороны, цифровые технологии предоставляют новые инструменты для творчества, такие как графические редакторы, музыкальные программы и платформы для создания контента. Это позволяет людям реализовывать свои творческие идеи и делиться ими с широкой аудиторией [8, р.570]. Однако, с другой стороны, чрезмерная зависимость от готовых шаблонов и алгоритмов, а также нацеленность человека на перекладывание своего умственного труда «на плечи» искусственного интеллекта» [3], может ограничивать развитие оригинального мышления, также как привычка использовать готовые решения, может ухудшить когнитивные навыки и снизить способность к самостоятельному творческому мышлению, так как кроме дивергентного мышления и способности генерировать множество идей для успешного творческого процесса требуются конвергентное мышление, позволяющее анализировать имеющуюся информацию и выбрать для реализации лучшие идеи и решения, что проблематично осуществить при доминировании клипового мышления.

Выводы

Цифровая трансформация – это сложный процесс, выходящий за рамки технологий и затрагивающий все уровни жизни, вызывающий кардинальное изменение взаимодействия человека с растущим потоком информации, приводящее к адаптации когнитивных процессов (внимание, память, мышление, социальное познание) к новым требованиям цифровых технологий. Влияние цифровой среды на когнитивную сферу имеет двойственный характер.

Позитивные аспекты включают в себя развитие многозадачности; увеличение скорости обработки информации; повышение уровня оперативной памяти и зрительного внимания; стимуляцию познавательной активности (в т.ч. через визуализацию и VR) и создание новых возможностей для обучения.

Негативные аспекты влияния цифровой трансформации: фрагментация внимания и формирование «клипового мышления»; снижение концентрации внимания; ухудшение

уровня долговременной памяти; снижение способности к критическому и мышлению и анализу; импульсивность в принятии решений; риски возникновения цифровой деменции (особенно у детей и подростков); проявление симптомов социальной дезадаптации и технологической зависимости; рост уровня тревожности, стресса и депрессий, оказывающих влияние на когнитивную сферу.

Заключение Таким образом, цифровая трансформация оказывает двойное влияние на когнитивную сферу, сочетая риски деградации функций с возможностями развития новых навыков. Успешная адаптация психики человека к новым вызовам цифровых технологий требует сбалансированного подхода и разработки научно обоснованных превентивных мер для сохранения когнитивного здоровья.

Список литературы

1. Авдеева Е.А., Корнилова О.А. Влияние цифровой электронной среды на когнитивные функции школьников и студентов // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022. Т. 21. № S3. С. 43-44. DOI: 10.15829/1728-8800-2022-3331.
2. Влияние цифровых технологий на когнитивные способности человека (обзор) / Ю.П. Игнатова [и др.] // *Психология. Психофизиология*. 2022. Т. 15. № 4. С. 72-83. DOI: 10.14529/jpps220407.
3. Лазинина Е.В. Цифровые технологии как фактор влияния на социальную реальность современного человека // *Вестник Самарского государственного технического университета*. Серия: Философия. 2020. № 2(4). С. 78-84.
4. Минатуллаева Н.М., Кольцова И.В. Диагностика проявлений клипового мышления у детей старшего дошкольного возраста: теоретическое обоснование // *Инсайт*. 2020. № 2(2). С. 59-70.
5. Путимцева К.Р. Использование гаджетов в дошкольном детстве: риски цифровой деменции // *Общество: социология, психология, педагогика*. – 2023. № 5. С. 31-35.
6. Цветков В.Л., Павлова А.А. Клиповое мышление как актуальная психологическая проблема // *Вестник Московского университета МВД России*. 2023. № 3. С. 317-322.
7. Brain Drain: The Mere Presence of One's Own Smartphone Reduces Available Cognitive Capacity / A.F. Ward [et al.] // *Journal of the Association for Consumer Research*. 2017. Vol. 2. № 2. P. 141-154. DOI: 10.1086/691462.
8. Hennessey B.A., Amabile T.M. Creativity. *Annual Review of Psychology*. 2010. Vol. 61. P. 569-598. DOI: 10.1146/annurev.psych.093008.100416
9. Horoszkiewicz B. Digital Dementia and Its Impact on Human Cognitive and Emotional Functioning // *Journal of Education, Health and Sport*. 2022. Vol. 12. N 11. P. 290-296.
10. Internet and Video Games: Causes of Behavioral Disorders in Children and Teenagers / V. Léri-da-Ayala [et al.] // *Children*. 2023. Vol. 10. N86. P.1-18. DOI: 10.3390/children10010086
11. Problematic Social Media Use: Results from a Large-Scale Nationally Representative Adolescent Sample / F. Bányai [et al.] // *PLoS One*. 2017. N 12 (1), Article e0169839. DOI: 10.1371/journal.pone.0169839
12. Twenge J.M., Campbell W.K. Associations between Screen Time and Lower Psychological Well-Being among Children and Adolescents: Evidence from a Population-Based Study // *Preventive Medicine Reports*. 2018. T. 12. P. 271-283. DOI: 10.1016/j.pmedr.2018.10.003.

Сведения об авторах

Чибисова Елена Геннадьевна

магистрант, ФГБОУ ВО «Херсонский государственный педагогический университет», Херсон, Российская Федерация;
e-mail: 3795567@mail.ru

Усатенко Оксана Николаевна кандидат психологических наук, доцент, доцент кафедры общей и социальной психологии Института психологии ФГБОУ ВО «Херсонский государственный педагогический университет», Херсон, Российская Федерация; e-mail: usatekoxana@mail.ru

Information about author

Chibisova Elena Gennadievna

Master's student, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kherson State Pedagogical University", Kherson, Russian Federation; e-mail: 3795567@mail.ru

Usatenko Oksana Nikolaevna

PhD in Psychology, Associate Professor, Associate Professor of the Department of General and Social Psychology, Institute of Psychology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kherson State Pedagogical University", Kherson, Russian Federation; e-mail: usatekoxana@mail.ru

УДК 57.045, 57.033
ГРНТИ 34.17.23
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.319-322

**А.П. Григорян¹, М.А. Овчинников², А.П. Евсеев²,
Д.А. Блескин³, О.М. Марченко², Е.Ю. Симоненко¹**

¹ Физический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова
² Научно-исследовательский институт ядерной физики им.
Д.В. Скобельцына МГУ им. М.В. Ломоносова
³ Центр теоретических проблем физико-химической
фармакологии Российской академии наук

СНИЖЕНИЕ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА В РЕЗУЛЬТАТЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ

В статье обсуждается влияние гамма-излучения на состояние мембраны митохондрий сперматозоидов человека и на степень окислительного стресса в клетках после действия гамма-излучения. Представлены результаты, полученные методом флуоресцентной микроскопии. Эксперименты показали, что после облучения с поглощенной дозой 0,2 Гр уровень мембранного потенциала митохондрий сперматозоидов снижается в 1,9 раза, а концентрация активных форм кислорода увеличивается в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой клеток.

Ключевые слова: гамма-излучение, сперматозоид, потенциал мембраны митохондрий, активные формы кислорода, окислительный стресс.

**A.P. Grigorian¹, M.A. Ovchinnikov², A.P. Evseev²,
D.A. Bleskin³, O.M. Marchenko², E.Yu. Simonenko¹**

¹—Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University

² Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics
Lomonosov Moscow State University

³ Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology,
Russian Academy of Sciences

REDUCTION OF THE MEMBRANE POTENTIAL OF MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS OF HUMAN SPERM DUE TO EXPOSURE TO GAMMA RADIATION

The article discusses the influence of gamma radiation on the state of human sperm mitochondrial membranes and on the degree of oxidative stress in cells after gamma radiation. Fluorescent microscopy results are presented. The experiments showed that after exposure to an absorbed dose of 0.2 Gy of gamma-radiation, the level of the membrane potential of the sperm mitochondria is reduced by 1.9 times, and the concentration of active oxygen increases by 1.6 times compared with the control group of cells.

Keywords: gamma radiation, sperm cell, mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, oxidative stress.

Введение

В связи с возрастающим интересом к реализации длительных космических миссий, встает вопрос о возможности транспортировки биологического материала на далекие межпланетные расстояния. Одним из ключевых аспектов в данной области является обеспечение сохранности и функциональной активности половых клеток, в частности сперматозоидов, в условиях космического полета. Радиационное воздействие, включающее гамма-излучение, протонные и электронные потоки, а также потоки других высокоэнергетических частиц, представляет собой одну из основных угроз для клеток.

Поглощенная доза космического излучения составляет около 0,5 мГр в день на МКС и на поверхности Марса, а на Луне может достигать до 1,4 мГр в день. [1]. Если массовые частицы можно экранировать, то гамма-излучение отличается высокой проникающей способностью и от него особенно сложно защитить биологический материал.

Под влиянием гамма-излучения в клетках может развиваться окислительный стресс, характеризующийся дисбалансом между образованием активных форм кислорода (АФК) и способностью антиоксидантных систем нейтрализовать их воздействие. [2]. АФК способны влиять на метаболические пути, окисляя белки или выполняя роль сигнальных молекул, кроме того, АФК окисляют ненасыщенные жирные кислоты в мембранах клетки, и продуктами этого окисления являются элементы, вызывающие повреждение в молекуле ДНК [3]. Не последнюю роль в прогрессировании окислительного стресса играют митохондрии [4]. В космическом полете происходит повреждение данных органелл, вызванное ионизирующим излучением. Показано, что митохондрии играют важную роль в процессах повреждения ДНК в клетках млекопитающих, вызванного радиацией [5]. Анализ биоматериалов астронавтов показал, что в различных типах клеток митохондриальная активность была нарушена, это же подтвердили исследования на мышах [6].

Сперматозоиды крайне подвержены окислительному стрессу, ведь если в соматических клетках, существуют системы антиоксидантной защиты, поддерживающие баланс АФК, цитоплазма сперматозоидов бедна на ферменты антиоксидантной защиты [7]. Так, в сперматозоидах человека отсутствует каталаза, а глутатион-пероксидаза неактивна [8]. Фрагментация ДНК в сперматозоидах отрицательно сказывается на оплодотворяющей способности клеток, а также на качестве развития эмбриона, поэтому необходимо минимизировать риски возникновения и развития окислительного стресса [9].

Цель работы

Исследование влияния гамма-излучения на функциональное состояние митохондрий и на развитие окислительного стресса в сперматозоидах человека.

Материалы и методы

В работе использовались образцы спермы 8 здоровых доноров. Сперматозоиды предварительно отмывали от семенной жидкости методом градиентной отмывки.

В качестве источника излучения использовали радиоактивный препарат ^{137}Cs с энергией гамма-излучения 0,668 МэВ.

Анализ потенциала мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$) клеток и оценка концентрации АФК проводились методом флуоресцентной микроскопии. Покровные стекла покрывали 0,1% раствором поли-L-лизина гидробромида для иммобилизации клеток. В проточную камеру с покровным стеклом, покрытым полилизинном, с помощью насоса загружали сперматозоиды человека, окрашенные DiOC₆ (конечная концентрация 50 нМ, инкубация 5 минут при 25°C) для анализа $\Delta\Psi_m$ или CellROX Green (конечная концентрация 1 мкМ, инкубация 30 минут при 37°C) для оценки концентрации АФК. После этого сперматозоиды выдерживали в камере 5 минут. Возбуждение флуоресценции проводили лазером на длине волны 474 нм.

Полученные результаты

В образцах сперматозоидов человека, подвергшихся облучению с поглощенной дозой 0,2 Гр, зафиксированы значительные изменения в функциональном состоянии митохондрий. Согласно полученным данным, уровень мембранного потенциала митохондрий достоверно снижается в 1,9 раза по сравнению с контрольной группой необлученных клеток ($p\text{-value} < 0,0001$), что отражает развитие выраженной митохондриальной дисфункции. Падение мембранного потенциала свидетельствует о нарушении работы электрон-транспортной цепи и, как следствие, снижении способности митохондрий к генерации АТФ, а также возможной утрате структурной целостности мембраны. Эти процессы нарушают нормальную работу клеток и повышают риск их гибели.

Одновременно в тех же образцах наблюдается значительное повышение уровня активных форм кислорода (АФК): их концентрация увеличивается в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой клеток ($p\text{-value} < 0,0001$), что подтверждает наличие выраженного окислительного стресса. Повышение продукции АФК может быть следствием нарушений в работе митохондрий и накоплению продуктов радиолиза вода, а также быть

одной из причин дальнейшего повреждения клеточных структур, включая ДНК, белки и липиды мембран.

Выводы

В работе зафиксированы повреждения сперматозоидов человека под воздействием гамма-излучения, отражающихся в нарушении работы митохондрий и развитии окислительного стресса. С учетом данных нарушений возникает объективная необходимость в разработке и внедрении эффективных стратегий защиты биоматериала, особенно в условиях хранения и транспортировки, сопряженных с риском радиационного облучения, таких как космические полеты.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: облучение сперматозоидов человека дозой 0,2 Гр вызывает достоверное снижение мембранного потенциала митохондрий и увеличение продукции активных форм кислорода, что указывает на развитие митохондриальной дисфункции и окислительного стресса. Эти изменения могут приводить к нарушению энергетического обмена, повреждению клеточных структур и снижению жизнеспособности сперматозоидов, что имеет важное значение для оценки влияния радиации на репродуктивное здоровье.

Литература

1. Самойлов А.С., Ушаков И.Б., Шуришаков В.А. Радиационное воздействие в орбитальных и межпланетных космических полётах: мониторинг и защита // *Экология человека*. 2019. Т. 26(1). С. 4–9.
2. Reisz, J.A. et al. Effects of ionizing radiation on biological molecules-mechanisms of damage and emerging methods of detection // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2014. – Т. 21. – № 2. – С. 260-292.
3. Wright, C., Milne, S., Leeson, H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility // *Reproductive BioMedicine Online*. – 2014. – No. 28. – С. 684-703.
4. Саенко Ю. В., Шутков А. М., Напалкова С. М., Распоргуева Е. В., Маслакова А. Г., Серова Д. В. Радиационное излучение индуцирует отсроченный, митохондриально-зависимый окислительный стресс в клетках лейкоциты K562 // *Известия вузов. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2012. № 2.
5. Jain M. R., Li M., Chen W., Liu T., de Toledo S. M., Pandey B. N., Li H., Rabin B. M., Azzam E. I. In vivo space radiation-induced non-targeted responses: late effects on molecular signaling in mitochondria // *Curr. Mol. Pharmacol*. 2011. Т. 4, № 2. С. 106-114.
6. Da Silveira, W. A., и др. Comprehensive multi-omics analysis reveals mitochondrial stress as a central biological hub for spaceflight impact // *Cell*. 2020. Т. 183, № 5. С. 1185-1201.e20.
7. Aitken R.J., Gibb Z., Baker M.A., Drevet J., Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa // *Reproduction, Fertility and Development*. 2016. V. 28(1-2). P. 1–10.
8. O'Flaherty, C. The Enzymatic Antioxidant System of Human Spermatozoa. – *Advances in Andrology*. – 2014. – 626374. – 15 p.
9. Fuller, N., Smith, J.T., Ford, A.T. Impacts of ionising radiation on sperm quality, DNA integrity and post-fertilisation development in marine and freshwater crustaceans // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2019. – Vol. 186.

Сведения об авторах

Анна Павловна Григорян

физик 2 категории, Физический факультет
МГУ им. М.В.Ломоносова
Москва, Россия
Эл. почта: athinktoo@gmail.com

Information about author

Anna Pavlovna Grigorian

2nd category physicist, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University
Moscow, Russian Federation
E-mail: athinktoo@gmail.com

Секция 9. ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА И КОСМИЧЕСКАЯ ПОГОДА

Михаил Александрович Овчинников

к.ф.-м.н., н.с., Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В.Скобелевца МГУ им. М.В.Ломоносова
Эл. почта: ov.mikhail@gmail.com

Mikhail Aleksandrovich Ovchinnikov

PhD, Researcher, Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics Lomonosov Moscow State University
e-mail: ov.mikhail@gmail.com

Александр Павлович Евсеев

к.ф.-м.н., с.н.с., Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В.Скобелевца МГУ им. М.В.Ломоносова
Эл. почта: ap.evseev@physics.msu.ru

Aleksandr Pavlovich Evseev

PhD, Senior Researcher, Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics Lomonosov Moscow State University
e-mail: ap.evseev@physics.msu.ru

Блескин Дмитрий Алексеевич

М.н.с., Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук
Эл. Почта: dmitrybleskin@gmail.com

Dmitriy Alekseevich Bleskin

Junior Researcher, Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences
e-mail: dmitrybleskin@gmail.com

Олег Михайлович Марченко

инженер 1 категории, Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В.Скобелевца МГУ им. М.В.Ломоносова
Эл. почта: oleg.marchenko.99@bk.ru

Oleg Mikhailovich Marchenko

1st category engineer, Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics Lomonosov Moscow State University
e-mail: oleg.marchenko.99@bk.ru

Екатерина Юрьевна Симоненко

к.ф.-м.н., доцент, Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова
Москва, Россия
Эл. Почта: ksimonenko@inbox.ru

Ekaterina Yurievna Simonenko

PhD, Associate Professor, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University
Moscow, Russian Federation
E-mail: ksimonenko@inbox.ru

УДК 611.4
ГРНТИ 76.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.323-330

Козин С.В., Кравцов А.А., Лясота О.М., Дорохова А.А.,
Джимак С.С.
Южный научный центр Российской академии наук

ПОТРЕБЛЕНИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИМИ ВОДЫ, АНАЛОГИЧНОЙ МАРСИАНСКОЙ ПО СОДЕРЖАНИЮ ДЕЙТЕРИЯ ПРИВОДИТ К РАЗВИТИЮ АДАПТАЦИОННОГО СИНДРОМА

В статье представлены результаты исследования влияния питьевого рациона с повышенным содержанием дейтерия на антиоксидантную систему лабораторных животных. Установлено, что увеличение содержания дейтерия в 8 раз в первые две недели вызывает нарушение редокс равновесия в крови и тканях головного мозга в сторону усиления продукции свободных радикалов. При длительном потреблении увеличение содержания дейтерия в питьевом рационе до 1200 ppm приводит к развитию адаптационного синдрома и активации защитных механизмов к действию стресса иной природы.

Ключевые слова: дейтерий, протий, изотопы водорода, метаболизм, головной мозг.

S.V. Kozin, A.A. Kravtsov, O.M. Lyasota, A.A. Dorohova, S.S. Dzhimak
Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences

AS A RESULT OF THE CONSUMPTION OF WATER WITH A DEUTERIUM CONTENT SIMILAR TO THAT ON MARS, MAMMALS DEVELOP AN ADAPTATION SYNDROME

The article presents the results of a study of the effect of a drinking ration with an increased content of deuterium on the antioxidant system of laboratory animals. It was found that an 8-fold increase in the deuterium content in the first two weeks causes a violation of the redox balance in the blood and brain tissues towards increased production of free radicals. With prolonged consumption, an increase in the deuterium content in the drinking ration to 1200 ppm leads to the development of an adaptation syndrome and activation of protective mechanisms to the action of stress of a different nature.

Key words: deuterium, protium, hydrogen isotopes, metabolism, brain.

Введение

Изотопный состав природных вод неравномерно распределен по поверхности нашей планеты [1]. Так, содержание дейтерия колеблется в диапазоне: 89 – ~162 ppm, причем основной стандарт по содержанию дейтерия в природной воде – Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) составляет 155,76 ppm [2]. На Марсе содержание дейтерия в ледниках на полюсах, на вершинах гор и экваторе имеют гораздо большую разницу: ~155 – ~1246 ppm [3].

На сегодняшний день известно, что колебания концентрации дейтерия в питьевой воде в небольшом диапазоне могут приводить к активационным (за счет реализации реакций адаптации организма) и ингибирующим эффектам [4,5]. Причем это касается как снижения содержания дейтерия в воде, так и повышения [6-9]. Относительно небольшое снижение уровня дейтерия в организме вызывает изменения в функционировании нервной системы [2]. При длительном снижении содержания дейтерия в питьевом рационе наблюдается постепенное снижение его концентрации в плазме крови и тканях органов [2]. Это приводит к избирательной $^2\text{H}/^1\text{H}$ -замене в атомных группировках со свободной не поделённой парой электронов, способных создавать водородные связи [10]. Такими атомными группировками в биологических системах являются гидроксильные, сульфгидрильные и аминокгруппы макромолекул в белках и нуклеиновых кислотах, а также в низкомолекулярных биологически активных соединениях [11]. Замещение

дейтерия на протий может происходить в гидратной оболочке белковых молекул – ферментов, транспортёров, белков, участвующих в образовании пор и каналов и т.д. [2]. Все это обуславливает изменение термодинамических и кинетических параметров макромолекул. Предположительно, изотопный $^2\text{H}/^1\text{H}$ -обмен может затрагивать некоторые участки электрон-транспортной цепи митохондрий, приводя к конформационным изменениям транспортных белковых структур. Эффекты дейтерия при повышении его концентрации в воде в несколько раз больше природного земного уровня практически не изучены. Известны работы Зубарева Р.А., в которых исследованы эффекты увеличения скорости набора биомассы микроорганизмами при содержании дейтерия в среде 350–370 ppm [12]. Эти эффекты объясняются упрощением системы за счет возникновения изотопного резонанса. В нашей работе установлено повышение содержания дейтерия в плазме крови лабораторных животных со 150 до 487 ppm при потреблении воды 750 ppm в течение двух месяцев [7]. Это приводит к увеличению антиоксидантного потенциала в тканях печени, в том числе за счет увеличения содержания низкомолекулярных тиоловых антиоксидантов, а также к снижению интенсивности свободнорадикальных процессов в крови и гепатоцитах. Происходит возрастание функциональной активности прооксидантно-антиоксидантного звена системы неспецифической защиты организма.

Таким образом, существует необходимость получения научных данных о влиянии содержания дейтерия, соответствующего марсианскому, в питьевом рационе на организм млекопитающих.

Целью работы являлось изучение влияния потребления воды с повышенным содержанием дейтерия 1200 ppm на динамику концентрации дейтерия в крови и тканях головного мозга, динамику окислительных процессов и особенности функционирования антиоксидантной системы в головном мозге.

Материалы и методы

Эксперименты были выполнены на 3 – х месячных самцах крыс линии Вистар массой 280 – 310 грамм.

Для исследований на культуре ткани использовали 7 – 9 – ти дневных крысят, родившихся от самок 5 – 6 месяцев.

В клетке (294 мм × 190 мм × 125 мм) находилось по 6 животных в помещении с ламинарным потоком воздуха, в котором поддерживалась температура $22 \pm 1^\circ\text{C}$ и относительная влажность $55\% \pm 10\%$ при естественном освещении. Пища и вода были доступны *ad libitum*. Все манипуляции проводили между 09:00 и 16:00 ч, ни одно животное не использовали более одного раза.

Исследование реакции организма на поступление дейтерия было выполнено на 65 крысах. Животных разделили на две группы:

1 группа (n=30) – крысы, которые получали воду с природным содержанием дейтерия (150 ppm);

2 группа (n=30) – крысы, которые получали утяжеленную по дейтерию воду (1200 ppm).

Из каждой группы животных выводили по 5 крыс на 5, 8, 11, 16, 23 и 31 сутки эксперимента для забора кала, крови и извлечения головного мозга путем декапитации. Кал использовали для исследования качественного и количественного состава микробиома кишечника. Из крови готовили плазму и сыворотку. В сыворотке крови определяли концентрацию дейтерия, а плазму использовали для исследования интенсивности окислительных процессов, лейкоцитарной формулы, метаболического профиля и для изучения собственной триптофановой и тиразиновой флуоресценции. На холоде из головного мозга извлекали кору для дальнейшего изучения интенсивности окислительных процессов, антиоксидантной активности, экспрессии генов.

Содержание дейтерия в сыворотке крови определяли на ЯМР-спектрометре Bruker Avance NEO 700 МГц по методике, описанной в [13].

Метаболический профиль регистрировали на спектрометре ЯМР Bruker Avance NEO

700 оснащенном криодатчиком Prodigy.

Флуоресценцию сыворотки крови проводили на спектрофлуориметре F-2700 (Hitachi, Япония). Собственную совместную триптофановую и тирозиновую флуоресценцию возбуждали светом длиной волны 280 нм.

Интенсивность свободнорадикальных процессов в плазме крови определяли методом хемилюминесцентного анализа на приборе Lum-100 (Россия) по светосумме – интегральному показателю свечения, выраженному в условных единицах.

Сразу после умерщвления проводили вскрытие экспериментальных животных для изъятия тимуса, надпочечников и селезенки. Полученные органы промывали холодным физиологическим раствором, высушивали с помощью фильтровальной бумаги, после чего на аналитических весах Ohaus pioneer (China) измеряли массу.

Изотопный состав по водороду определяли в лиофилизированных тканях головного мозга методом масс-спектрометрии изотопных отношений легких элементов с использованием изотопного масс-спектрометра DELTA V Advantage.

Интенсивность окислительных процессов в тканях головного мозга: Супернатант получали из навески ткани головного мозга, растёртой в ступке, охлаждённой жидким азотом и помещенной в холодный фосфатный буфер с pH 7,4 в расчёте 100 мг ткани на 1 мл. Гомогенизировали встряхиванием в течение 15 мин, затем центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин [7]. Интенсивность свободнорадикальных процессов в супернатанте коры головного мозга оценивали методом хемилюминесцентного анализа и по числу продуктов, образующихся в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК - метод), одним из которых является продукт перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид (МДА). Хемилюминесцентный анализ проводили на приборе Lum-100 (Россия), интенсивность окислительных процессов оценивали по светосумме – интегральному показателю свечения, выраженному в условных единицах [14]. Инициацию свечения тканей супернатанта вызывали добавлением 35 мМ ионов Fe^{2+} в виде раствора сульфата железа (II).

Содержание МДА в супернатанте определяли по концентрации окрашенного комплекса, образующегося при взаимодействии МДА с тиобарбитуровой кислотой, при длине волны 532 нм. Данный показатель измеряли в мкМ на 1 г белка. Все результаты были представлены в процентах от контрольного образца.

Антиоксидантный статус тканей головного мозга: Супернатант получали из навески ткани головного мозга, растёртой в ступке, охлаждённой жидким азотом и помещенной в холодный фосфатный буфер с pH 7,4 в расчёте 100 мг ткани на 1 мл. Гомогенизировали встряхиванием в течение 15 мин, затем центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин. Антиоксидантный статус определяли по активности каталазы и концентрации восстановленного глутатиона (GSH) в супернатанте, приготовленном из тканей коры головного мозга. Производилась оценка экспрессии генов, ответственных за синтез антиоксидантных белков.

Об активности каталазы судили по скорости убывания перекиси водорода в среде инкубации. Перекись водорода способна образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при 410 нм. Активность каталазы была пропорциональна разности оптической плотности холостой и опытной пробы и выражалась мКат/грамм белка.

Содержание восстановленного глутатиона определяли спектрофотометрически с помощью реактива Элмана (5,5'- дитиобис-(2-нитробензойной кислоты)) при длине волны 512 нм, данные выражали в мкмольях на 1 г белка.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы Statistica 7.0 (Statsoft, Inc.). Количественные данные, имеющие нормальное распределение, описывали средним значением и ошибкой среднего ($M \pm m$). Для сравнения групп использовали тест Манна-Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Полученные результаты

Методом ЯМР – спектрометрии был проведен анализ изменения содержания ^2H в сыворотке крови лабораторных животных на фоне применения питьевого рациона с повышенным содержанием дейтерия (1200 ppm). На рисунке 1 видно, что в контрольной группе животных (0 день) до начала воздействия уровень ^2H в крови составил $152 \pm 1,9$ ppm. У животных, которые потребляли воду с повышенным содержанием дейтерия, наблюдалось ежедневное повышение уровня ^2H в крови. На пятый день эксперимента содержание тяжёлого стабильного водорода в плазме крови повысилось в 3,15 раз и составило 480 ± 30 ppm.

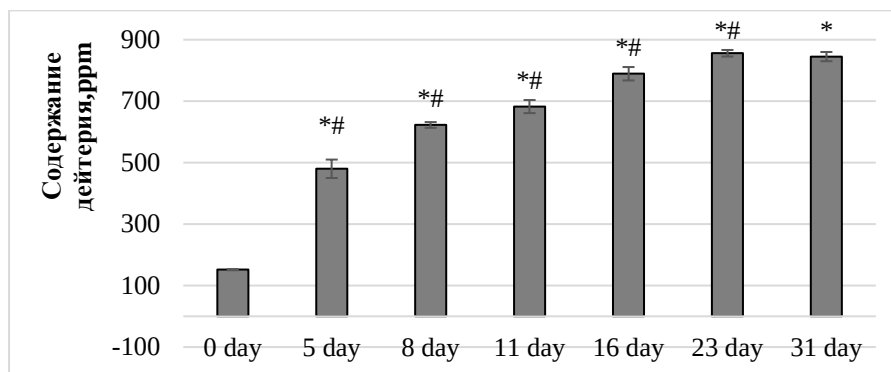


Рисунок 1 – Изменение содержания дейтерия в плазме лабораторных животных на фоне потребления ими воды с изменённым изотопным составом ($^2\text{H}/^1\text{H} = 1200$ ppm)

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем (0 день), # - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим экспериментальным днем.

Через 8, 11 и 16 суток после начала эксперимента, содержание дейтерия составило $623 \pm 9,4$; $682 \pm 21,3$ и $789 \pm 21,8$ соответственно. Следует отметить, что скорость изменения изотопного соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в жидкой фазе крови имела максимальное значение в первые сутки от начала эксперимента и постепенно снижалась и к концу эксперимента. Через пять суток скорость составила 66 ppm/day. Через 8 и 11 суток скорость изменения содержания дейтерия в крови составила 59 и 48 ppm/day. Скорость изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмена на 23, 31 день самые низкие значения (30 и 22 ppm/day), а концентрация дейтерия в эти дни эксперимента составила $856 \pm 10,7$; $845 \pm 15,0$ ppm и не имела достоверного отличия между собой. Таким образом, можно сделать вывод, что скорость изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмена в плазме крови лабораторных животных максимальна в первую неделю применения утяжеленной воды и замедляется при более продолжительном воздействии, приводя к насыщению ее макромолекул атомами дейтерия.

Хемилюминесцентный анализ.

При повышении содержания дейтерия в плазме крови лабораторных животных на фоне потребления ими питьевого рациона с повышенным содержанием дейтерия (1200 ppm) происходило смещение ее антиоксидантного/прооксидантного равновесия (рисунок 2).

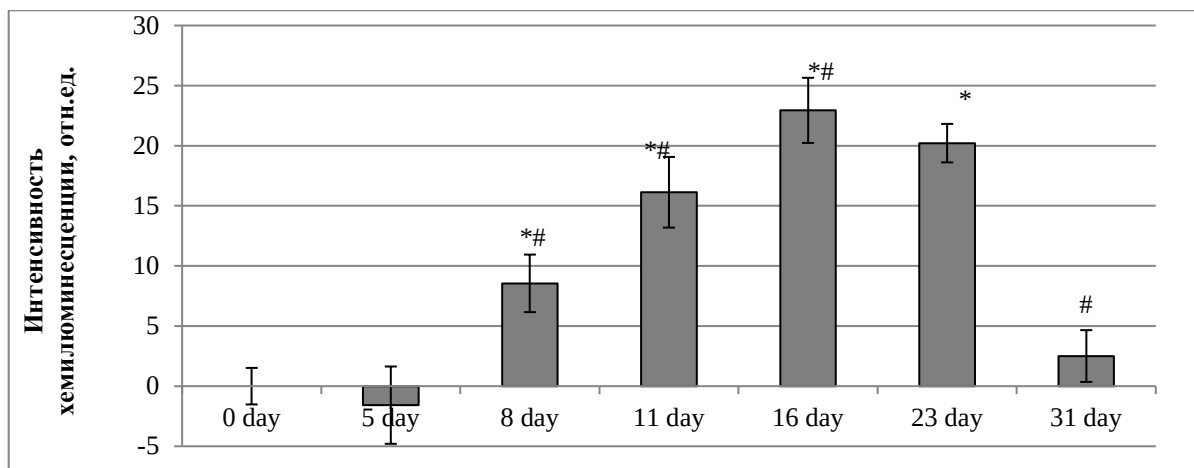


Рисунок 2 – Интенсивность хемилюминесценции плазмы крови лабораторных животных на фоне потребления ими воды с изменённым изотопным составом ($^2\text{H}/^1\text{H} = 1200 \text{ ppm}$). * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем (0 день), # - $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим экспериментальным днем.

Интенсивность хемилюминесценции (светосумма) пропорциональна скорости образования свободных радикалов в модельной системе. Повышение светосуммы свечения плазмы крови может быть следствием как изменения ее антиоксидантного потенциала, так и активацией свободнорадикальных процессов.

Заметное усиление редокс процессов в плазме крови лабораторных животных наблюдается после пятых суток эксперимента. На восьмой день эксперимента интенсивность ХЛ статистически значимо возрастает на 9% по сравнению с контрольными животными. Максимальный эффект достигается на 16 и 23 сутки и составляет 23 и 20% относительно плазмы крови контрольных животных. Интенсивность свечения плазмы крови животных уменьшалась после 23 суток потребления воды 1200 ppm и на 31 день эксперимента достоверно не отличалась от показателей животных, в рационе которых была вода с природным содержанием дейтерия.

Таким образом, повышение содержания дейтерия в плазме крови крыс в начале эксперимента приводило к разбалансировке антиоксидантных/прооксидантных процессов в сторону последних и их восстановлению при более продолжительном воздействии.

Питевой рацион с повышенным содержанием дейтерия (1200 ppm) относительного природного вызывает незначительные изменения в лейкоцитарном профиле экспериментальных животных.

Повышение содержания дейтерия в крови лабораторных животных на фоне потребления ими воды с измененным изотопным составом приводило к изменению спектров собственной флуоресценции белков ее плазмы.

динамика изменения аминокислотного профиля имеет определенную закономерность. На начальных этапах воздействия наблюдается выраженное повышение концентрации аминокислот в крови и их снижение до контрольных показателей в более поздние сроки эксперимента. Данная тенденция отмечается для триптофана, аланина, глицина, изолейцина, аргинина и метионина. Содержание триптофана и метионина возрастает в первые сутки эксперимента и сохраняется таким до 23 дня. Уровень изолейцина, аланина и глицина характерно повышается на 8 и 11 сутки поступления в организм тяжелых атомов водорода. Исключение составляют валин и аргинин, их концентрация имеет достоверно высокие относительно контроля показатели на 11 сутки эксперимента. Количественный профиль исследуемого перечня соединений, участвующих в катаболизме, также перестраивается с течением времени в зависимости от продолжительности эксперимента. Для таких молекул, как глюкоза, сукцинат, формиат, креатин, креатинин, бетаин и изобутират характерна определенная зависимость на фоне изменения изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмена. Концентрация данных метаболитов повышается в организме опытных животных к пятым суткам эксперимента и имеет высокие значения до 16-23 суток с

момента начала эксперимента. Концентрация глюкозы в крови повышается на 8 и 11 день эксперимента в среднем на 30% по сравнению с кровью контрольных животных, на 16 сутки воздействия ее концентрация выравнивается. Содержание сукцината, участника цикла Кребса, повышается на 54% на пятые сутки и наблюдается высоким на 23 сутки, и только на 31 день эксперимента его концентрация не отличается от контрольных параметров. Уровень азотсодержащей карбоновой кислоты – креатина увеличивается на 22% ($p>0,05$) на 5 день эксперимента, на 8 сутки также есть не достоверное повышение ее концентрации. Максимальное увеличение концентрации данного метаболита происходит на 11 день эксперимента и составляет 44 % относительно контроля ($p<0,05$), на 16 и 23 день увеличение составляет 33 %. Полное восстановление уровня креатина в крови экспериментальных животных происходит к 31 суткам. В отношении метаболитов - бетаина и N – оксида триметиламина, производных фосфатидилхолина, было установлено, что их концентрации изменяются с разными тенденциями. Для бетаина характерно увеличение его концентрации в плазме вплоть до 16 суток эксперимента с дальнейшей его нормализацией на фоне изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмена, тогда как для N – оксида триметиламина происходит характерное понижение его концентрации в течение всего времени воздействия. Для микробиомного кишечного метаболита – изобутирата происходит разнонаправленное изменение его концентрации в плазме крови на фоне изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмена, происходящего в организме лабораторных животных. На начальных этапах воздействия концентрация данного метаболита повышается и достигает латентного на 30 % на 8-16 сутки (повышение составляет 30 %), на более поздних этапах с 23-31 сутки эксперимента его концентрация снижается на 50 % относительно контроля. В отношении энергетического метаболита – креатинина наблюдается тенденция, аналогичная для бетаина и креатина. Для гистамина и ацетоацетата характерна более сложная временная зависимость, проявляющаяся колебаниями их концентраций на протяжении всего времени эксперимента.

Выводы

Интерес к распределению по планете и свойствам марсианской воды увеличивается в связи с возможной экспедицией на Марс в недалеком. Установленный в нашем исследовании стресс-протекторный эффект воды, аналогичной марсианской по содержанию дейтерия, является результатом развития перекрестной адаптации. Активация антиоксидантной системы, является компенсаторным эффектом на дейтериевый стресс, способствовала снижению интенсивности окислительного стресса и нормализации поведенческих реакции у стрессированных крыс, в рационе которых был питьевой рацион с повышенным содержанием дейтерия. Следует отметить, что несмотря на то, что продолжительное потребление воды с повышенным содержанием дейтерия вызвало выработку стресс защитных механизмов, изменение массы надпочечников и тимуса было более выражено именно в этой группе. Этот эффект связан с тем, что стрессированные животные, в рационе которых была вода с повышенным содержанием дейтерия, в отличие стрессированных животных с естественным питьевым рационом подверглись двойному стрессу. Первый стресс связан с изменением дейтериевого гомеостаза, а второй с воздействием иммобилизационного стресса.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: повышение концентрации дейтерия в организме приводит к развитию стрессовой реакции и включению компенсаторных механизмов, направленных на адаптацию к данным условиям. В результате происходит активация антиоксидантной системы и увеличение защитных свойств организма к действию иммобилизационного стресса.

Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ЮНЦ РАН на 2025 г., № гос. рег. 125011700394-5.

Литература

1. Bowen, G.J., Wassenaar, L.I. & Hobson, K.A. Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia* 143, 337–348 (2005). <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1813-y>
2. Basov, A.; Fedulova, L.; Baryshev, M.; Dzhimak, S. Deuterium-Depleted Water Influence on the Isotope $2\text{H}/1\text{H}$ Regulation in Body and Individual Adaptation. *Nutrients* 2019, 11, 1903. doi: 10.3390/nu11081903. ;
3. Villanueva, G. L., Mumma, M. J., Novak, R. E., Kaufl, H. U., Hartogh, P., Encrenaz, T., Smith, M. D. (2015). Strong water isotopic anomalies in the martian atmosphere: Probing current and ancient reservoirs. *Science*, 348(6231), 218–221. doi:10.1126/science.aaa3630
4. Yaglova, N.V.; Obernikhin, S.S.; Timokhina, E.P.; Yaglov, V.V.; Tsomartova, D.A.; Nazimova, S.V.; Tsomartova, E.S.; Ivanova, M.Y.; Cheresheva, E.V.; Lomanovskaya, T.A. Bilateral Shifts in Deuterium Supply Similarly Change Physiology of the Pituitary–Thyroid Axis, but Differentially Influence Na^+/I^- Symporter Production. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6803.
5. Kravtsov, A.; Kozin, S.; Basov, A.; Butina, E.; Baryshev, M.; Malysheko, V.; Moiseev, A.; Elkina, A.; Dzhimak, S. Reduction of Deuterium Level Supports Resistance of Neurons to Glucose Deprivation and Hypoxia: Study in Cultures of Neurons and on Animals. *Molecules* 2022, 27, 243. doi: 10.3390/molecules27010243;
6. Барышев М.Г., Басов А.А., Болотин С.Н., Джимаков С.С., Кашаев Д.В., Федосов С.Р., Фролов В.Ю., Малышко В.В., Власов Р.В. ЯМР и ЭПР исследование влияния воды с пониженным содержанием дейтерия на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы у лабораторных животных // *Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества*. 2011. Т. 8. № 3. С. 16-20.
7. Kozin S.V., Lyasota O.M., Kravtsov A.A., Chikhirzhina E.V., Ivlev V.A., Popov K.A., Dorohova A.A., Malysheko V.V., Moiseev A.V., Drozdov A.V., Dzhimak S.S. Shift of Prooxidant–Antioxidant Balance in Laboratory Animals at Five Times Higher Deuterium Content in Drinking Water // *Biophysics*. 2023. V. 68. N2, P. 289–294. DOI: 10.31857/S0006302923020163;
8. Yaglova, N.V.; Timokhina, E.P.; Obernikhin, S.S.; Yaglov, V.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3107.;
9. Барышев М.Г., Джимаков С.С., Долгов М.А., Дыдыкин А.С., Касьянов Г.И. Применение воды с модифицированным изотопным составом и pH в мясной промышленности // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2012. № 2-3 (326-327). С. 42-44.
10. Dzhimak, S.S., Basov, A.A., Fedulova, L.V., Naumov, G.N., Baryshev, M.G. Correction of metabolic processes in rats during chronic endotoxemia using isotope (D/H) exchange reactions // *Biology Bulletin*, 2015, 42(5), pp. 440–448 ;
11. Schmidt H.L., Robins R.J., Werner R.A. Multi-factorial in vivo stable isotope fractionation: causes, correlations, consequences and applications // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 2015. Vol. 51, No. 1, 155–199.;
12. Xie X., Zubarev R.A. Isotopic Resonance Hypothesis: Experimental Verification by *Escherichia coli* Growth Measurements // *Scientific reports*. 2015. 5, 9215. DOI: 10.1038/srep09215;
13. Dzhimak, S.S., Basov, A.A., Kopytov, G.F., ...Sharapov, K.S., Baryshev, M.G. Application of NMR spectroscopy to the determination of low concentrations of nonradioactive isotopes in liquid media // *Russian Physics Journal*, 2015, 58(7), pp. 923–929
14. Basov, A.A., Kozin, S.V., Bikov, I.M., ...Elkina, A.A., Dzhimak, S.S. Changes in Prooxidant–Antioxidant System Indices in the Blood and Brain of Rats with Modelled Acute Hypoxia which Consumed a Deuterium-Depleted Drinking Diet // *Biology Bulletin*, 2019, 46(6), pp. 531–535

Сведения об авторах

Козин Станислав Владимирович

кандидат биол. наук, с.н.с. лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах ФГБУН "Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук", Ростов-на-Дону, Россия
Эл. почта: kozinsv85@mail.ru

Кравцов Александр Анатольевич

кандидат биол. наук, с.н.с. лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах ФГБУН "Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук", Ростов-на-Дону, Россия
Эл. почта: aakravtsov@mail.ru

Лясота Оксана Михайловна

н.с. лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах ФГБУН "Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук", Ростов-на-Дону, Россия
Эл. почта: 4098789@mail.ru

Дорохова Анна Анатольевна

кандидат физ.-мат. наук, с.н.с. лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах ФГБУН "Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук", Ростов-на-Дону, Россия
Эл. почта: 013194@mail.ru

Джимак Степан Сергеевич

доктор физ.-мат. наук, доцент, в.н.с. лаборатории проблем распределения стабильных изотопов в живых системах ФГБУН "Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук", Ростов-на-Дону, Россия
Эл. почта: jimack@mail.ru

Information about author

Kozin Stanislav Vladimirovich

PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Problems of Distribution of Stable Isotopes in Living Systems, Federal Research Center Southern Research Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russia
E-mail: kozinsv85@mail.ru

Kravtsov Alexander Anatolyevich

PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Problems of Distribution of Stable Isotopes in Living Systems, Federal Research Center, Southern Research Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russia
E-mail: aakravtsov@mail.ru

Lyasota Oksana Mikhailovna

Researcher, Laboratory of Problems of Distribution of Stable Isotopes in Living Systems, Federal Research Center Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russia
E-mail: 4098789@mail.ru

Dorokhova Anna Anatolyevna

PhD (Physical and Mathematical Sciences), Senior Researcher of the Laboratory of Problems of Distribution of Stable Isotopes in Living Systems, Federal Research Center Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russia
E-mail: 013194@mail.ru

Dzhimak Stepan Sergeevich

Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Associate Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Problems of Distribution of Stable Isotopes in Living Systems, Federal Research Center Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russia
E-mail: jimack@mail.ru

УДК: 616.453 616.441 591.139 574.24
612.681 636.978
ГРНТИ 76.29
DOI 10.47501/978-5-6044060-5-2.331-335

**Н.Д. Гончарова, О.А. Чигарова, А.М. Ермолаева,
Т.Э. Оганян, Н.В. Тимошенко, Д.М. Карасева**
Курчатовский комплекс медицинской приматологии НИЦ
«Курчатовский институт»

НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ СИСТЕМЫ ПРИ СТАРЕНИИ В УСЛОВИЯХ ПОСТОЯННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Представлены новые данные о негативном влиянии постоянного освещения (330-400 лк) с помощью светодиодных ламп, предназначенных для использования в офисных и жилых помещениях (модель 71302 NLL-G-T8-18-230-4K-G13, Navigator), на функционирование эндокринных систем в разные возрастные периоды с учетом психофизиологических особенностей на трансляционной модели лабораторных приматов.

Ключевые слова: гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система, гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная система, пинеальная железа, островковый аппарат поджелудочной железы, липидный и углеводный обмен, поведение, старение, самки макак-резусов.

**N.D. Goncharova, O.A. Chigarova, A.M. Ermolaeva,
T.E. Oganyan, N.V. Timoshenko, D.M. Karaseva**
Kurchatov Complex of Medical Primatology National Research Centre "Kurchatov institute"

NEUROENDOCRINE SYSTEMS DURING AGING UNDER CONSTANT LIGHTING

New data on the negative impact of constant lighting (330-400 lx) using LED lamps intended for use in office and residential premises (model 71302 NLL-G-T8-18-230-4K-G13, Navigator) on the functioning of endocrine systems at different age periods are presented, taking into account psychophysiological characteristics on the translational model of laboratory primates.

Keywords: hypothalamic-pituitary-adrenal axis, hypothalamic-pituitary-thyroid axis, pineal gland, islet apparatus of the pancreas, lipid and carbohydrate metabolism, behavior, aging, female rhesus monkeys.

Проблема связи возрастных эндокринных дисфункций с негативными факторами окружающей среды актуальна вследствие резкого увеличения заболеваемости возрастной патологией (сердечно-сосудистой, психиатрической, метаболической, нейродегенеративной и др.) из-за расширения диапазона стрессовых факторов, среди которых значительная роль отводится световым загрязнениям окружающей среды с увеличением освещенности в ночное время [1-4]. Целью исследования явилось изучение возрастных и индивидуальных особенностей функционирования основных адаптивных нейроэндокринных систем (гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, ГГАС, гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы, ГГТС), а также пинеальной железы и показателей углеводного и липидного обмена в условиях хронического круглосуточного освещения (ХКО) на модели лабораторных приматов. В силу своего генетического, физиологического и поведенческого сходства с человеком лабораторные приматы, в первую очередь, макаки резусы (*Macaca mulatta*) и павианы гамадрилы (*Papio hamadryas*) широко используются в качестве трансляционной модели в экспериментальных исследованиях в области эндокринологии стресса, поведения, репродукции, старения [5-9].

Материалы и методы

В экспериментах использовали 40 физически здоровых молодых (5-9 лет) и 30 старых (20-30 лет) самок макак-резусов из питомника Курчатовского комплекса медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт» (ранее ФГБНУ НИИ медицинской приматологии (г. Сочи-Адлер). Исследование проводили в летне-осеннее время (июнь-сентябрь), когда для этого вида приматов не характерны овариальные циклы. До начала опытов животных адаптировали к условиям раздельного содержания,

процедурам инъекций и взятия образцов крови в течение 4 нед. Поведение животных оценивали в период адаптации и во время эксперимента по методике, описанной ранее [8]. Выделяли молодых и старых животных с контрольным стандартным поведением (SB), беспокойным (тревожным) и депрессивноподобным (DAB).

При проведении эксперимента различали базальный период (контрольный, до начала ХКО) и собственно экспериментальный период. В собственно экспериментальном периоде – период ХКО – в течение 8 нед в комнате с молодыми и старыми животными включали искусственное освещение (330-400 лк) с помощью светодиодных ламп, предназначенных для использования в офисах и жилых помещениях (модель 71302 NLL-G-T8-18-230-4K-G13, Navigator). В то же самое время, в комнате с контрольными животными освещение оставалось обычным, с естественным чередованием дня и ночи (стандартное освещение, СО).

В базальный период и на фоне ХКО (или СО) опытных и контрольных животных подвергали тесту с тиреолиберином (ТРГ, Sigma, 100 мкг/кг массы, внутривенно в физиологическом растворе, в 09:00; 4 нед ХКО), тиреотропина (ТТГ, Sigma, 1,6 мкг/кг массы, внутривенно в физиологическом растворе, в 09:00; 5 нед ХКО), глюкозы (300 мг/кг массы, внутривенно в 09:00; 4,5 нед ХКО), острому стрессовому воздействию (ОСВ, нежесткая иммобилизация в течение 2-х ч с началом в 15:00; 7 нед ХКО). Образцы крови брали до введения препаратов (0 мин) и через 30, 60, 120, 240, 360, 480 мин и 24 ч (1440 мин) после его введения в случае ТРГ; через 60, 120, 240, 360, 480 и 24 ч (1440 мин) в случае ТТГ; через 5, 15, 30, 60 мин в случае глюкозы. При проведении ОСВ образцы крови брали до начала стрессового воздействия (0 мин) и через 15, 30, 60, 120, 240 мин после начала воздействия. Кроме того, взятие образцов крови проводили трижды в сутки (09:00, 15:00, 22:00) для оценки циркадианного ритма секреции гормонов.

Образцы крови брали из локтевой или бедренной вены в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Кровь немедленно центрифугировали при 2000g и 4°C. Плазму хранили при -70°C не более 2 мес до проведения анализа. В плазме крови определяли концентрацию ТТГ, свободных тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3), кортикотропина (АКТГ), кортизола, инсулина и мелатонина с помощью специфических коммерческих наборов для иммуноферментного анализа. Концентрацию глюкозы, триглицеридов и общего холестерина определяли энзиматическими колориметрическими методами. Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 10.0 (StatSoft, Inc) с использованием дисперсионного анализа (ANOVA), включающего апостериорный тест Тьюки для парных сравнений.

Полученные результаты

Как показали результаты изучения влияния ХКО на стресс-реактивность ГГАС, ХКО оказывает ингибирующее действие на величину подъема секреции КОРТ в ответ на нежесткую иммобилизацию в течение 2-х ч., которое носило зависимый от возраста характер: сопровождалось аналогичными изменениям и в секреции АКТГ у молодых животных, но не оказывало существенного влияния на гипоталамическую секрецию у старых индивидов [3].

При изучении ГГТС мы столкнулись с ранее неизвестным феноменом: в базальных условиях отмечались существенные различия в направленности возрастных изменений секреции тиреоидных гормонов в зависимости от поведения. При старении у животных с DAB статистически значимо снижалась секреция свободного Т4 (в 9:00, 15:00 и 22:00), в то время как у животных с SB – концентрация свободного Т3 в плазме крови (в 15:00, 22:00, 3:00).

Выявлено, что ХКО (4-5 нед) оказывает выраженное ингибирующее действие на величину подъема концентрации свободного Т4, но не оказывает существенного влияния на реакцию свободного Т3 у старых животных, объединенных по поведению, в ответ на введение специфических активаторов функции щитовидной железы (ТРГ и ТТГ).

В то же время, у молодых животных, объединенных по поведению, ХКО оказывало менее выраженное, чем у старых обезьян, ингибирующее действие на величину подъема концентрации свободного Т4 и не оказывало влияния на величину подъема уровня свободного Т3 в тесте с ТРГ, а в тесте с ТТГ индуцировало преимущественно тенденцию к снижению величины подъема концентрации Т4 и выраженное снижение величины подъема уровня свободного Т3, которое сохранялось и через 1 год после отмены ХКО [4]. Снижение концентрации Т3 у молодых животных в ответ на введение ТТГ может быть вызвано в первую очередь ингибирующим действием ХКО на активность йодотирониндейодиназы, в первую очередь йодотирониндейодиназы-2, отвечающей за быстрое увеличение уровня Т3 в сыворотке крови. Возможна также активация процесса дейодирования Т4 инактивирующим ферментом йодотирониндейодиназа-3 с образованием неактивного реверсивного Т3. Выявленное снижение уровня свободного Т3 в условиях ХКО может носить накопительный характер при продолжении пребывания в условиях постоянного освещения и способствовать развитию признаков гипотиреоза, метаболических и сердечно-сосудистых нарушений уже в молодом возрасте.

В отличие от опытных животных, динамика концентраций свободных Т4 и Т3 в плазме периферической крови у контрольных молодых и старых животных, объединенных по поведению, в ответ на введение как ТРГ, так и ТТГ на фоне СО (4 нед) не претерпевала существенных изменений. Реакция ТТГ в условиях ХКО также, как и контрольного стандартного освещения (4-5 нед), в ответ на введение ТРГ, в отличие от тиреоидных гомонов, не подвергалась существенным изменениям [4].

Таким образом, проведенные исследования указывают на ингибирующее влияние ХКО на функции коры надпочечников и щитовидной железы. Поскольку гормоны коры надпочечников и щитовидной железы участвуют в регуляции метаболизма углеводов и липидов, можно было полагать, что ХКО и индуцированные им нарушения функции ГГТС и ГГАС могут оказывать выраженное негативное влияние на углеводный и липидный обмен.

Действительно, исследования показали, что индуцированные ХКО нарушения в функционировании ГГАС и ГГТС играют важную роль в формировании метаболических нарушений и инсулинорезистентности. Так, практически у всех возрастных и поведенческих групп животных на фоне ХКО (5 нед) отмечалось повышение базальных уровней глюкозы, триглицеридов, а также глюкозо-триглицеридного индекса ($TyG, \ln [TG \text{ натошак (мг/100 мл)} \times \text{глюкоза (мг/100мл)} / 2]$). Последний рассматривается в качестве важного маркера резистентности к инсулину и метаболических нарушений, тесно связан с прогнозом различных заболеваний (серечно-сосудистых, цереброваскулярных, депрессии) и худшего исхода при повышении этого индекса [10, 11].

Проведение глюкозотолерантного теста позволило выявить у старых животных с ДАВ с избыточной массой тела (ИМТ) наряду с более выраженными признаками инсулинорезистентности по сравнению со старыми животными со СВ и ИМТ (более высокий уровень глюкозы в интервале 5-60 мин и площадь ответа после введения стандартной дозы глюкозы, снижение скорости «исчезновения» экзогенной глюкозы из циркуляции) еще и снижение секреции инсулина, а не ее компенсаторное повышение как в случае животных со СВ и ИМТ.

В отличие от вышеназванных систем, существенных изменений в функционировании пинеальной железы не наблюдалось.

Таким образом, исследование позволило выявить негативное влияние постоянного освещения в течение 4-7 нед на функционирование большинства адаптивных эндокринных систем, проявляемое в условиях их повышенной активности и сопровождаемое формированием выраженного гормонального и метаболического дисбаланса, ускоряющего процессы старения и способствующего развитию возрастной патологии. Наиболее уязвимыми являются индивиды старших возрастных групп с ИМТ и депрессивноподобным и тревожным поведением.

Выводы

(1) ХКО в течение 4-5 нед ингибирует функцию щитовидной железы преимущественно на фоне ее активации, носящее зависимый от возраста характер. Для старых индивидов характерно выраженное снижение реакции свободного Т4 на тесты с введением ТРГ и ТТГ, а для молодых индивидов — снижение реакции свободного Т3 на тест с ТТГ. Последнее сохранялось и через 1 год после прекращения ХКО.

(2) В основе механизма действия ХКО на функцию щитовидной железы, по-видимому, лежит ингибирующее действие ХКО на чувствительность тироцитов щитовидной железы к ТТГ у старых животных, а также на активность йодтирониндейодиназ, трансформирующих Т4 в Т3 и активацию процессов трансформации Т3 в реверсивный Т3 в периферических тканях у молодых животных.

(3) ХКО в течение 7 нед оказывает ингибирующее действие на реакцию коры надпочечников на острое психоэмоциональное стрессовое воздействие у всех индивидов, независимо от поведения, механизм которого носил зависимый от возраста характер: путем ослабления секреции АКТГ у молодых животных и преимущественно не затрагивая гипофизарную секрецию АКТГ у старых животных.

(4) Индуцированные ХКО нарушения в функционировании ГГАС и ГГТС играют важную роль в формировании метаболических нарушений и инсулинорезистентности, носящие зависимый от возраста и особенностей поведения характер. Наиболее уязвимы к ХКО старые индивиды с ДАВ и ИМТ. Индуцируемые ХКО метаболические нарушения способствуют ускоренному старению и возрастной патологии.

**Работа выполнена в рамках проекта НИЦ «Курчатовский институт»
№123011300084-1.**

Литература

1. Fleury G., Masís-Vargas A., Kalsbeek A. *Metabolic implications of exposure to light at night: lessons from animal and human studies* // *Obesity (Silver Spring)*. 2020. V. 28. (Suppl. 1): S18-S28.
2. Münzel T., Hahad O., Daiber A. *The dark side of nocturnal light pollution. Outdoor light at night increases risk of coronary heart disease* // *European Heart Journal*. 2021. No. 42(8): 831-834.
3. Goncharova N.D., Chigarova O.A., Oganyan T.E. *Age-related and individual features of the HPA axis stress responsiveness under constant light in nonhuman primates* // *Frontiers in Endocrinology*. 2023. V. 13: 1051882.
4. Goncharova N.D., Ermolaeva A.M., Chigarova O.A., Oganyan T.E., Timoshenko N.V. *Age-Related Features of the Function of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis in Non-human Primates under Constant Lighting* // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2024. V. 177(5). P. 592-597.
5. Гончарова Н.Д. *Гормональная регуляция надпочечных желез у человека и обезьян при гемобластозах и в процессе старения* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1997. Т. 124. № 8. С. 207-210.
6. Colman R.J. *Non-human primates as a model for aging* // *Biochimica et biophysica acta*. 2018. V. 1864 (9 Pt A). P. 2733-2741.
7. Schneider M.L., Moore C.F., Ahlers E.O., Barnhart T.E., Christian B.T., DeJesus O.T., Engle J.W., Holden J.E., Larson J.A., Moirano J.M., Murali D., Nickles R.J., Resch L.M., Converse A.K. *PET Measures of D1, D2, and DAT Binding Are Associated with Heightened Tactile Responsivity in Rhesus Macaques: Implications for Sensory Processing Disorder* // *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2019. V. 13: 29.
8. Goncharova N.D., Chigarova O.A., Rudenko N.S., Oganyan T.E. *Glucocorticoid negative feedback in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rhesus monkeys with various types of adaptive behavior: individual and age-related differences* // *Frontiers in Endocrinology*. 2019. V. 10: 24.
9. Goncharova N.D. *The HPA axis under stress and aging: individual vulnerability is associated with behavioral patterns and exposure time* // *BioEssays*. 2020. V. 42 (9). P. 2000007.

10. Groothof D., Flores-Guerrero J.L., Nolte I.M., Bouma H.R., Gruppen E.G., Bano A., Post A., Kootstra-Ros J.E., Hak E., Bos J.H.J., de Borst M.H., Gans R.O.B., Links T.P., Dullaart R.P.F., Bakker S.J.L. Thyroid function and risk of all-cause and cardiovascular mortality: a prospective population-based cohort study // *Endocrine*. 2021. No. 71(2): 385-96.
11. Zhong L., Liu S., Yang Y., Xie T., Liu J., Zhao H. and Tan G. Metabolic syndrome and risk of subclinical hypothyroidism: a systematic review and meta-analysis // *Frontiers in Endocrinology*. 2024. V. 15: 1399236.

Сведения об авторах

Гончарова Надежда Дмитриевна

з.д.н. РФ, доктор биол. наук, профессор,
начальник лаборатории экспериментальной
эндокринологии

Курчатовский комплекс медицинской при-
матологии НИЦ «Курчатовский инсти-
тут»

Сочи, Россия

Эл. почта: Goncharova_ND@nrcki.ru;
ndgoncharova@mail.ru

Чигарова Ольга Александровна

старший научный сотрудник лаборатории
экспериментальной эндокринологии

Курчатовский комплекс медицинской при-
матологии НИЦ «Курчатовский инсти-
тут»

Сочи, Россия

Эл. почта: Chigarova_OA@nrcki.ru;
olga21111987@mail.ru

Ермолаева Александра Михайловна

Научный сотрудник лаборатории экспери-
ментальной эндокринологии

Курчатовский комплекс медицинской при-
матологии НИЦ «Курчатовский инсти-
тут»

Сочи, Россия

Эл. почта: a.m.ermolaeva@bk.ru

Оганян Тамара Эдуардовна

научный сотрудник лаборатории экспери-
ментальной эндокринологии

Курчатовский комплекс медицинской при-
матологии НИЦ «Курчатовский инсти-
тут»

Сочи, Россия

Эл. почта: ogan.tam@yandex.ru

Тимошенко Наталья Витальевна

Младший научный сотрудник лаборатории
экспериментальной эндокринологии

Курчатовский комплекс медицинской при-
матологии НИЦ «Курчатовский инсти-
тут»

Сочи, Россия

Эл. почта: nata90021987@mail.ru

Карасева Даяна Мураткалиевна

Старший лаборант лаборатории экспери-
ментальной эндокринологии

Курчатовский комплекс медицинской при-
матологии НИЦ «Курчатовский инсти-
тут»

Сочи, Россия

Эл. почта: b.dayanam@mail.ru

Information about author

Goncharova Nadezhda Dmitrievna Honored Scientist
of the Russian Federation, Doctor of Biological Sci-
ences, Professor, Head of the Laboratory of Experi-
mental Endocrinology

Kurchatov Complex of Medical Primatology National
Research Centre "Kurchatov institute"

Sochi, Russian Federation

E-mail: Goncharova_ND@nrcki.ru; ndgoncha-
rova@mail.ru

Chigarova Olga Alexandrovna

Senior researcher of the Laboratory of Experimental
Endocrinology

Kurchatov Complex of Medical Primatology National
Research Centre "Kurchatov institute"

Sochi, Russian Federation

E-mail: Chigarova_OA@nrcki.ru;
olga21111987@mail.ru

Ermolaeva Alexandra Mihailovna

Scientific researcher of the Laboratory of Experimental
Endocrinology

Kurchatov Complex of Medical Primatology National
Research Centre "Kurchatov institute"

Sochi, Russian Federation

E-mail: a.m.ermolaeva@bk.ru

Oganyan Tamara Eduardovna

Scientific researcher of the Laboratory of Experimental
Endocrinology

Kurchatov Complex of Medical Primatology National
Research Centre "Kurchatov institute"

Sochi, Russian Federation

E-mail: ogan.tam@yandex.ru

Timoshenko Natalia Vitalievna

Junior researcher of the Laboratory of Experimental
Endocrinology

Kurchatov Complex of Medical Primatology National
Research Centre "Kurchatov institute"

Sochi, Russian Federation

E-mail: nata90021987@mail.ru

Karaseva Dayana Muratkalievna

Senior Laboratory Assistant of the Laboratory of Ex-
perimental Endocrinology

Kurchatov Complex of Medical Primatology National
Research Centre "Kurchatov institute"

Sochi, Russian Federation

E-mail: b.dayanam@mail.ru