



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

**материалы Международной конференции**

**NT+ME `22**

**Крым, Ялта-Гурзуф, с 29 мая по 8 июня 2022 года**

**ВЕСЕННЯЯ СЕССИЯ**

ISBN 978-5-6044060-2-1



9 785604 406021

Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`22 (Гурзуф, с 29 мая по 8 июня 2022 г.). 2022. Весенняя сессия. 393 с.

**ISBN 978-5-6044060-2-1**

### **ПРЕЗИДЕНТ КОНФЕРЕНЦИИ**

член Президиума РАН академик РАН – *Ю.В. Гуляев*

### **МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОРГКОМИТЕТ**

*Председатель* – Е.Л. Глориозов

### **Сопредседатели:**

*С.К. Ахеджак-Нагузе, Г.Н. Болдырева, В.Г. Никитаев, А.Ф. Топунов,  
В.С. Хорошков, С.В. Шестаков, Н.В. Яглова. В.К. Мазо*

### **Члены Оргкомитета**

*М.М. Асланян, В.З. Журавлев, В.Ю. Иванов, С.С. Обернихин, М.А. Рагульская,  
В.П. Реутов, О.Б. Сазонова, С.Н. Самсонов, Е.М. Трошина, А. Charoval, И.П.  
Шабалова, Е.В. Шарова*

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

*Фамилия И.О.* Название статьи // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`22 (Гурзуф, с 29 мая по 8 июня 2022г.). 2022. Весенняя сессия. С. XX–XX.– ISBN 978-5-6044060-2-1

## СОДЕРЖАНИЕ

### **Секция 1. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЗЕРНИСТОЙ ИКРЫ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КЪЕЛЬДАЛЯ Л. С. Абрамова, А. В. Козин, Е. С. Гусева, А. Ф. Гаврилов	14
ПОЛИФАЗНЫЙ ПОДХОД К ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОМИЦЕТОВ – ПИЩЕВЫХ КОНТАМИНАНТОВ Л.П. Минаева, Ю. М. Маркова, А. Д. Евсюкова	19
ОБОСНОВАНИЕ ТРЕБОВАНИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ НОВОГО ВИДА, ПОЛУЧЕННОЙ ПУТЕМ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА Л.П. Минаева, О. В. Багрянцева, С. А. Шевелева	24
АДАПТАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЖИРОВОЙ ТКАНИ СВИНЕЙ И ПОИСК ГЕНОВ, НАХОДЯЩИХСЯ ПОД ДАВЛЕНИЕМ ОТБОРА, НА ПРИМЕРЕ КОММЕРЧЕСКОЙ ПОРОДЫ ДЮРОК Е. А. Котенкова, В. А. Пчелкина, И. М. Чернуха	30
ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МОЗГА И МЫШЦ СВИНЕЙ-РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ Е. Р. Василевская	39
МОДЕЛЬ АУТОГЕМОМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА IN VIVO: ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОДУКТА ДЛЯ ЭНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ НА МЯСНОЙ ОСНОВЕ Е. Р. Василевская, Г. Г. Молдованов, Н. В. Купаева, В. А. Пчелкина, Л. В. Федулова	46
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ФИКОТОКСИНОВ МИКРОЦИСТИНА И ДОМОЕВОЙ КИСЛОТЫ О. Д. Гендриксон, Е. А. Зверева, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев	52
ВОПРОСЫ АНАЛИЗА РИСКОВ ЗДОРОВЬЮ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ, ПОЛУЧАЕМОЙ МИКРОБНЫМ СИНТЕЗОМ О. В. Багрянцева, З. Г. Гурзу	57
БОРЬБА С САРАНЧОЙ ПЕРЕЛЕТНОЙ С УЧЕТОМ ЕЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ Я. В. Саванина	63
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ БЫСТРОГО ВНЕЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ СОСТАВА МЯСНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ Е. А. Зверева, О. Д. Гендриксон, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев	68
РИСКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ СО СВИНЫМИ СУБПРОДУКТАМИ В. В. Насонова, А. А. Семенова, Ю. К. Юшина, Д. С. Батаева, А. И. Синичкина	73
ПЕПТИДЫ, КОДИРУЕМЫЕ ТРАНСКРИПТАМИ - ПРЕДШЕСТВЕННИКАМИ МИКРО - РНК В РАСТЕНИЯХ Т. Н. Ерохина, С. К. Завриев, Д. Ю. Рязанцев, С. Ю. Морозов	78

### **Секция 2. БИОЛОГИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ**

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОТОПНО-ИЗМЕНЕННОЙ ВОДЫ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ В. И. Лобышев	87
---	----

## СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ ДЕЙТЕРИЯ В ВОДЕ КАК ФАКТОР, МОДУЛИРУЮЩИЙ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ С. С. Обернихин, Н. В. Яглова, Е. П. Тимохина, В. В. Яглов	92
ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО 2H/1H СОСТАВА СРЕДЫ НА ВЕРОЯТНОСТЬ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РАЗРЫВОВ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПАРАМИ ОСНОВАНИЙ В МОЛЕКУЛЕ ДНК С.С. Джимаков, М. И. Дроботенко, А. А. Свидлов, А. А. Елкина	95
РЕАКТИВНЫЕ И КОМПЕНСАТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ГИПОФИЗАРНО-ТИРЕОИДНОЙ ОСИ ПРИ ПОНИЖЕНИИ ПОСТУПЛЕНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМ Е. П. Тимохина, С. С. Обернихин, Н. В. Яглова	101
<b>Секция 3. ГЕНОМИКА. ГЕНЫ И БОЛЕЗНИ</b>	
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК А. И. Судаков, Е. П. Куликов, С. А. Мерцалов, А. А. Никифоров, В. А. Григоренко	105
ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГАПЛОГРУПП Y-ХРОМОСОМЫ В ПОКОЛЕНИЯХ НАСЕЛЕНИЯ МЕГАПОЛИСА ПОД ДЕЙСТВИЕМ МИГРАЦИИ И. Г. Удина, А.С.Грачева, Ю.А.Васильев, Е.Ю Победоносцева, О.Л. Курбатова	110
ПРОБЛЕМЫ КОСМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ М. М. Асланян	113
<b>Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА</b>	
РАЗВИТИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ Н. В. Яглова	119
ВЗАИМОСВЯЗЬ «СТРУКТУРА – АКТИВНОСТЬ» АНТИАРИТМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НИБЕНТАНА И НИФЕРИДИЛА Н. К. Давыдова	123
ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА А. Д. Черкасов, Е. Н. Петрова	127
КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ В ОЦЕНКЕ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ ТЯЖЁЛОЙ СТЕПЕНЬЮ COVID 19 М. Л. Золотавина, Е. А. Гайдабура	137
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОСТАЗА РАНЫ ПОЧКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЕКТИНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ Д. С. Бердыш, С.Г. Павленко, Е. Ю. Марченко	142
СИНТЕЗ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАФИК В-КАТЕНИНА В КЛЕТКАХ В ПРОЦЕССЕ РОСТА КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ В.В. Яглов, С.В. Назимова, Э.С. Цомартова, Т А Ломановская	145
МАКРОФАГИ И ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПОЛИЛАКТИДНОЙ ПЛЕНКИ С КСЕНОФИБРОБЛАСТАМИ В ИШЕМИЗИРОВАННУЮ РАНУ КОЖИ Т. А. Бойко, Е. Ю. Шаповалова, Ю. Г. Барановский, С. В. Харченко, И. А. Лугин, А. Г. Барановский	150



## СОДЕРЖАНИЕ

РОЛЬ ПРЕНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ В ФОРМИРОВАНИИ ОРГАНОВ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ Б. Б. Гагулаева, С. С. Обернихин, Е. П. Тимохина, Н. В. Яглова	155
МЕТОДЫ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА, ОСНОВАННЫЕ НА ОЦЕНКЕ БИОМАРКЕРОВ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ Т.В. Гайворонская, А.А. Зуб, Ф.С. Аюпова	159
ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНОГО МОЗАИЦИЗМА В ЭКО: ФАКТОРЫ ВЛИЯНИЯ А Д Иванова, М А Тофило, И.В. Володяев	163
РОЛЬ КАНОНИЧЕСКОГО WNT-СИГНАЛИНГА В ДИСМОРФОГЕНЕЗЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ЭНДОКРИННЫМ ДИСРАПТОРОМ ДДТ Д. А. Цомартова, Н. В. Яглова, С. С. Обернихин, М. Ю. Иванова, Е. В. Черешнева	170
ВЛИЯНИЕ COVID-19 НА ПРОЦЕСС НЕЙРОГЕНЕЗА ВО ВЗРОСЛОМ МОЗГЕ Д. Ю. Жданова, А. В. Чаплыгина, В. И. Ковалев, Н. В. Бобкова	174
ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕВЗЕИ И ШРОТА КЛЮКВЫ НА СЕРДЦЕ КРЫС Д. А. Халикова, С. В. Аньков, Ю. В. Мешкова, Н. А. Жукова, Т. Г. Толстикова	179
АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕМЕННИКОВ ПОСЛЕ $\gamma$ - ОБЛУЧЕНИЯ М. А. Аль Меселмани, Н. А. Глинская	183
МЕДИКО-СОЦИАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНВАЛИДНОСТИ С. К. Ахеджак-Нагузе, А. А. Нагузе	185
АСПЕКТЫ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНОГО ХАРАКТЕРА, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКИХ ВУЗОВ С. К. Ахеджак-Нагузе, В. В. Романцов, З. С. Попов, А. А. Нагузе	189
ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ НЕОПУХОЛЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ И ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКА А.Е.Карпова, Л.Г.Созаева, И.П.Шабалова	193
<b>Секция 5. ГЕМОГЛОБИНЫ, КРОВЬ, ЖЕЛЕЗО И СТРЕСС</b>	
ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ МОРЯ ИРМИНГЕРА (СЕВЕРНАЯ АТЛАНТИКА) К ГЛУБОКОВОДНОМУ ОБРАЗУ ЖИЗНИ С. А. Мурзина, В. П. Воронин, Д. В. Артеменков, А. М. Орлов	196
ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА ЗАЩИЩАЮТ ГЕМОГЛОБИН ОТ ОКИСЛЕНИЯ О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина, И. С. Пугаченко, К. Б. Шумаев, Н. Н. Новикова, А. Ф. Топунов	203
ВЛИЯНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА РАСПАД N-ЭТИЛТИОМОЧЕВИННОГО НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА О. В. Покидова, В. О. Новикова, И. С. Емельянова, Б. Л. Психа, А. В. Куликов, Н. А. Санина	207
КАРБОНИЛЬНЫЙ СТРЕСС В БАКТЕРИЯХ. АНТИГЛИКИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НИТРОКСИЛА Э. И. Насыбуллина, И. С. Пугаченко, О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов	211

## СОДЕРЖАНИЕ

ВЛИЯНИЕ НИТРОКСИЛА НА МОДИФИКАЦИЮ ГЕМОГЛОБИНА ОКИСЛЕНИЕМ И ГЛИКИРОВАНИЕМ И. С. Пугаченко, Э. И. Насыбуллина, О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов	215
ПОЛИМОРФИЗМ rs652438 ГЕНА MMR-12 И АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК Е. Е. Текуцкая, И. И. Павлюченко, Л. Р. Гусарук	219
ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА СТАБИЛЬНОСТЬ МОЛЕКУЛЫ ДНК М.В. Беженар, М. И. Дроботенко, А. А. Свидлов, О. М. Лясота, В. В. Точеная, А. О.Сулима	224
ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ОКСИДА АЗОТА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ P – ГЛИКОПРОТЕИНА Е. А. Судакова, А. В. Щулькин, Ю. В. Абаленихина, Е. Н. Якушева	230
СВЯЗЬ РАЦИОНА ПИТАНИЯ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ СПОРТСМЕНОВ И. В. Кобелькова, М. М. Коростелева	235
ЭКСПРЕССИРОВАННЫЙ ГЕМОГЛОБИН БОБОВЫХ КАК КОМПОНЕНТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ «РАСТИТЕЛЬНОГО МЯСА» А. Ф. Топунов, О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина	242
ПАНДЕМИЯ COVID-19 ЭПОХИ ГЛОБАЛЬНОГО МИНИМУМА СОЛНЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ: ГЕНОГЕОГРАФИЯ, ЛОКДАУНЫ, ВАКЦИНАЦИЯ М. В. Рагульская	244
ВОЗНИКНОВЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ СИГНАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ОКСИДА АЗОТА К. Б. Шумаев, О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина, А. Ф. Топунов	247
УЧАСТИЕ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА ЭРИТРОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ-2 В РЕГУЛЯЦИИ P-ГЛИКОПРОТЕИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭНДОГЕННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА Ю. В. Абаленихина, А. А. Сеидкулиева, Е. Д. Рокунов, Д. С. Немтинов, А. В. Щулькин, Е. Н. Якушева	251
КООПЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ЛИГАНДОВ С БИОПОЛИМЕРАМИ Ю. Д. Нечипуренко, А. С. Бучельников, И. А. Лавриненко	257
СОПРЯЖЕННАЯ С ГЛОБИНАМИ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ХОНДРОЦИТОВ Ю. М. Александровская, О. И. Баум, А. К. Дмитриев, О.А. Тифлова	262
Na,K-ГОМЕОСТАЗ В ЭПИДЕРМИСЕ КАК ФЕНОМЕН САМООРГАНИЗОВАННОЙ КРИТИЧНОСТИ В. И. Петухов, Е. В. Дмитриев	267
<b>Секция 6. ОКСИД АЗОТА И ПРОДУКТЫ ЕГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ</b>	
ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА В ХИМИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА Н. А. Санина	272
НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА И ДРУГИЕ ПАТОЛОГИИ НА ФОНЕ НАРУШЕНИЯ ЦИКЛОВ ОКСИДА АЗОТА И СУПЕРОКСИДА В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина	276

## СОДЕРЖАНИЕ

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АЛЬБУМИН КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ОКСИДАТИВНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ- ГИПОКСИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ МОЗГА И РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ Е. Г. Сорокина, С. А. Афанасьева, О. В. Карасева, Ж. Б. Семенова, О. В. Глоба, В. П. Реутов, В. Г. Пинелис	301
---	-----

УЧАСТИЕ ENOS В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБРИДОВ ФЕРМЕНТА В. П. Дерягина, Н. И. Рыжова, Л. А. Савлучинская, И. С. Голубева, Л. В. Кривошеева, К. И. Кирсанов	310
---	-----

МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ А. Ф. Иштулин, Н. В. Короткова, И. В. Матвеева, И. В. Минаев, П. М. Полякова	321
--	-----

### **Секция 7. МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ КАТЕТЕРНОГО ВОЛОКОННО- ОПТИЧЕСКОГО ДАТЧИКА ДЛЯ ИНВАЗИВНОГО ИЗМЕРЕНИЯ НИЗКИХ ДАВЛЕНИЙ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА Е. А. Бадеева, Т. И. Мурашкина, С. И. Геращенко, Д. И. Серебряков, В. А. Бадеев, Т. В. Паршикова	325
---	-----

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗМЕРОВ И КОНФИГУРАЦИИ НЁБА ПАЦИЕНТА Т. И. Мурашкина, Е. А. Бадеева, Ф. С. Аюпова Ю. А. Васильев, Т. В. Пономаренко, Т. В. Паршикова	331
--	-----

ОСОБЕННОСТИ ГРУДНОГО И ИСКУССТВЕННОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ НОВОРОЖДЕННЫХ ПЕРИНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА Е.Ю. Плотникова, Е. А. Бадеева, Т. И. Мурашкина, А. Н. Ломтева, А. Г. Фоменко, Е. Л. Шаповалова, Е. Г. Давыденко, Е. С. Кочетова, А. В. Оленская	336
--	-----

НАДСТРОЙКИ EXCEL В УЧЕБНЫХ КУРСАХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ ИНФОРМАТИКЕ В. Я. Зобенко, А. В. Оленская, Ю.А. Васильев	341
--	-----

ПРОЕКТ ЦЕНТРА ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ В НИЦ «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ», МОСКВА М. С. Булатов, Д. А. Жидков, Г. И. Кленов, В. С. Хорошков, А. Н. Черных	343
---	-----

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ ПРИ НЕИНВАЗИВНОЙ ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ С ПОМОЩЬЮ ПРЕЦИЗИОННЫХ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИХ ДАТЧИКОВ МИКРОПЕРЕМЕЩЕНИЙ Т. И. Мурашкина, С. И. Геращенко, Е. А. Бадеева, А. В. Бадеев, М. С. Геращенко	352
---	-----

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛАЗЕРОИНДУЦИРОВАННОЙ КОАГУЛЯЦИИ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ А К Дмитриев, В Н Картунов, В А Ульянов	358
--	-----

### **Секция 8. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ**

ПОЛУШАРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАТТЕРНОВ ЭЭГ ПРИ ПОРАЖЕНИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ СТРУКТУР МОЗГА ЧЕЛОВЕКА Г. Н. Болдырева	363
--	-----

ОТРАЖЕНИЕ В ЭЭГ НАРУШЕНИЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У ДЕТЕЙ О. Б. Сазонова, Е. М. Трошина	368
--	-----

## СОДЕРЖАНИЕ

ЭЛЕКТРОГРАФИЧЕСКИЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ ПРИ РЕАЛЬНОМ И ВООБРАЖАЕМОМ ДВИЖЕНИИ	375
Е. М. Трошина, О. Б. Сазонова, Е. Л. Машеров, О. А. Кроткова, М. Ю. Каверина, А. Ю. Кулева, А. В. Суханова	
СРАВНЕНИЕ АМПЛИТУДЫ ТРЕМОРА У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА	383
Н. Д. Чанов, И. С. Антонов, А. В. Ли	
ВЛИЯНИЕ ВЕЩЕСТВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ТЕРМОЛИПОФУСЦИНА	384
В. И. Ковалев, Д. Ю. Жданова, Н. В. Бобкова, А. В. Чаплыгина	
ХИМИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ СТАРЫХ ПЕРВИЧНЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КУЛЬТУР	389
А. В. Чаплыгина, В. И. Ковалев, Д. Ю. Жданова, Н. В. Бобкова	

## CONTENT

### **Section 1. PROBLEMS, METHODS AND PRODUCTS OF MODERN BIOTECHNOLOGY**

IDENTIFICATION OF GRANULAR SALMON CAVIAR USING THE KJELDAHL METHOD L. S. Abramova, A. V. Kozin, E. S. Guseva, A. F. Gavrilov	14
POLYPHASIC APPROACH FOR SPECIES IDENTIFICATION OF MICROMYCETES - FOOD CONTAMINANTS L. P. Minaeva, Y. M. Markova, A. D. Evsjukova	19
SUBSTANTIATION OF MICROBIOLOGICAL SAFETY REQUIREMENTS FOR A NEW FOOD PRODUCTS OBTAINED BY MICROBIAL SYNTHESIS L. P. Minaeva, O. V. Bagryantseva, S. A. Sheveleva	24
ADAPTIVE FEATURES OF ADIPOSE TISSUE FORMATION in PIGS OF THE COMMERCIAL DUROC BREED AND THE SEARCH FOR GENES UNDER SELECTION PRESSURE E. A. Kotenkova, V. A. Pchelkina, I. M. Chernukha	30
PROTEOMIC ANALYSIS OF THE BRAIN AND MUSCLES OF RECONVALESCENT PIGS E. R. Vasilevskaya	39
IN VIVO MODEL OF AUTOHEMORRHAGIC STROKE: EFFECTIVENESS OF A MEAT-BASED ENTERAL NUTRITION PRODUCT E. R. Vasilevskaya, G. G. Moldovanov, N. V. Kupaeva, V. A. Pchelkina, L. V. Fedulova	46
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEM FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF PHYCOTOXINS MICROCYSTIN-LR AND DOMOIC ACID O. D. Hendrickson, E. A. Zvereva, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev	52
ISSUES OF HEALTH RISK ANALYSIS OF FOOD OBTAINED BY MICROBIAL SYNTHESIS Olga V. Bagryantseva, Zinaida G. Gureu	57
FIGHT AGAINST THE MIPATIENT LOCUST WITH TAKING INTO ACCOUNT ITS BIOLOGICAL CHARACTERISTICS Y. V. Savanina	63
IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR RAPID OUT-OF-LABORATORY CONTROL OF THE COMPOSITION OF MEAT FOODS E. A. Zvereva, O. D. Hendrickson, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev	68
RISKS OF THE SPREAD OF MICROORGANISMS WITH PORK BY-PRODUCTS V. V. Nasonova, A. A. Semenova, Y. K. Yushina, D. S. Bataeva, A. I. Sinichkina	73
PEPTIDES ENCODED BY PRECURSOR TRANSCRIPTS OF MICRO-RNAS IN PLANTS T. N. Erokhina, S. K. Zavriev, D. Y. Ryazantsev, S. Y. Morozov	78
<b>Section 2. BIOLOGY OF STABLE ISOTOPES</b>	
PROSPECTS FOR THE USE OF ISOTOPE-MODIFIED WATER IN BIOLOGY AND MEDICINE V. I. Lobyshev	87
CHANGES IN THE DEUTERIUM WATER CONTENT AS A FACTOR MODULATING HOMEOSTATIC PROCESSES S. S. Obernikhin, N. V. Yaglova, E. P. Timokhina, V. V. Yaglov	92
INFLUENCE OF THE 2H/1H ISOTOPE COMPOSITION OF A MEDIUM ON THE PROBABILITY OF BROKENING OF HYDROGEN BONDS BETWEEN BASE PAIRS IN A DNA MOLECULE S. S. Dzhimak, M. I. Drobotenko, A. A. Svidlov, A. A. Elkina	95

## CONTENT

REACTIVE AND COMPENSATORY CHANGES IN PITUITARY-THYROID AXIS INDUCED BY REDUCED INTAKE OF DEUTERIUM E. P. Timokhina, S. S. Obernikhin, N. V. Yaglova	101
--	-----

### Section 3. GENOMICS. GENES AND DISEASES

GENETIC POLYMORPHISM AND COLORECTAL CANCER A. I. Sudakov, E. P. Kulikov, S. A. Mertsalov, A. A. Nikiforov, V. A. Grigorenko	105
--	-----

PECULIARITIES OF DISTRIBUTION OF Y-CHROMOSOME HAPLOGROUPS IN GENERATIONS OF MEGAPOLIS POPULATION UNDER ACTION OF MIGRATION I.G. Udina, I.A.S. Gracheva, Yu.A. Vasiliev, E.Yu. Pobedonosteva, O.L. Kurbatova	110
--	-----

PROBLEMS OF SPACE BIOLOGY AND GENETICS M.M. Aslanyan	113
---	-----

### Section 4. EXPERIMENTAL BIOLOGY AND CLINICAL MEDICINE

DEVELOPMENT AND FUNCTION OF THE ADRENAL MEDULLA IN EXPOSED TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT ORGANISMS N. V. Yaglova	119
--	-----

«STRUCTURE – ACTIVITY» RELATIONSHIP OF ANTIARRHYTHMIC DRUGS NIBENTAN AND NIFERIDYL N.K. Davydova	123
---	-----

PATHOPHYSIOLOGICAL FACTORS OF PREMATURE HUMAN AGING D. Cherkasov, E. N. Petrova	127
--	-----

CORRELATION ANALYSIS OF THE MAIN BIOCHEMICAL MARKERS OF INFLAMMATION IN <i>COVID-19</i> M. L. Zolotavina, E. A. Gaidabura	137
--	-----

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF KIDNEY WOUND HEMOSTASIS WHEN USING PECTINS IN AN EXPERIMENT D. S. Berdysh, S. G. Pavlenko, E. Marchenko	142
---	-----

SYNTHESIS AND INTRACELLULAR TRAFFIC OF $\beta$ -CATENIN DURING GROWTH OF THE ADRENAL COTREX V.V. Yaglov, S.V. Nazimova, E.S. Tsomartova, T. A. Lomanovskaya	145
--	-----

MACROPHAGES AND TRANSPLANTATION OF POLYLACTIDE FILM WITH XENOFIBROBLASTS INTO ISCHEMIC CUTANEOUS WOUND T. A. Boyko, Y. Y. Shapovalova, Y. G. Baranovskiy, S. V. Harchenko, I. A. Lugin, A. G. Baranovskiy	150
--	-----

INTERFERENCE OF PRENATAL EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT WITH DEVELOPMENT OF IMMUNE ORGANS B. B. Gagulaeva, S. S. Obernikhin, E. P. Timokhina, N. V. Yaglova	155
---	-----

NONINVASIVE DIAGNOSTIC METHODS FOR CHRONIC PERIODONTITIS BASED ON ORAL FLUID BIOMARKER ASSESSMENT: A REVIEW T.V. Gayvoronskaya, A.A. Zub, F.S. Ayupova	159
---	-----

FALSE POSITIVE DIAGNOSIS OF CHROMOSOMAL MOSAICISM IN IVF: FACTORS OF INFLUENCE A.D. Ivanova, M. A. Tofilo, I. V. Volodyaev	163
---	-----

## CONTENT

IMPACT OF IMPAIRED CANONICAL WNT SIGNALING TO DISMORPHOGENESIS OF THE ADRENALS INDUCED BY ENDOCRINE DISRUPTOR DDT D. A. Tsomartova, N. V. Yaglova, S. S. Obernikhin, M. Y. Ivanova, E. V. Cheresheva	170
IMPACT OF COVID-19 OF ON NEUROGENESIS IN THE ADULT BRAIN D. Y. Zhdanova, A. V. Chaplygina, V. I. Kovalev, N. V. Bobkova	174
EFFECT OF RHAPONTICUM CARTHAMOIDES AND CRANBERRY MEAL EXTRACTS COMPOSITION ON RATS HEART D. A. Khalikova, S. V. Ankov, J. V. Meshkova, N. A. Zhukova, T. G. Tolstikova	179
ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL CHANGES OF TESTES AFTER $\gamma$ - IRRADIATION M.A. Al Meselmani, N.A. Glinskaya	183
MEDICAL AND SOCIAL PROBLEMS OF DISABILITY S. K. Akhedzhak-Naguze, A. A. Naguze	185
MEDICAL AND SOCIAL ASPECTS AFFECTING THE MORBIDITY OF MEDICAL UNIVERSITY STUDENTS S. K. Akhedzhak-Naguze, V V Romantsov, Z S Popov, A. A. Naguze	189
THE CYTOLOGICAL EXAMINATION IN THE DIAGNOSTICS OF NON-TUMOR LESIONS AND OVARIAN TUMORS A.E.Karpova, L.G.Sozaeva, I.P.Shabalova	193
<b>Section 5. HEMOGLOBINS, BLOOD, IRON AND STRESS</b>	
ECOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ADAPTATIONS OF LIPIDS AND FATTY ACIDS CERTAIN FISH SPECIES FROM THE IRMINGER SEA TO DEEPWATER HABBIT S. A. Murzina, V. P. Voronin D. V. Artemenkov, A M Orlov	196
DINITROSYL IRON COMPLEXES PROTECT HEMOGLOBIN FROM OXIDATION O. V. Kosmachevskaya, E. I. Nasybullina, I. S. Pugachenko, K. B. Shumaev, N. N. Novikova, A. F. Topunov	203
EFFECT OF HEMOGLOBIN AND SOLVENTS ON THE DECOMPOSITION OF N-ETHYLTHIOUREA NITROSYL IRON COMPLEX O. V. Pokidova, V. O. Novikova, N. S. Emel'yanova, B. L. Psikha, A. V. Kulikov, N. A. Sanina	207
CARBONYL STRESS IN BACTERIA. ANTI-GLYCATION EFFECT OF NITROXYL ON ESCHERICHIA COLI CELLS E. I. Nasybullina, I. S. Pugachenko, O. V. Kosmachevskaya, A. F. Topunov	211
EFFECT OF NITROXYL ON MODIFICATION OF HEMOGLOBIN BY OXIDATION AND GLYCATION I. S. Pugachenko, E. I. Nasybullina, O. V. Kosmachevskaya, A. F. Topunov	215
rs652438 POLYMORPHISM OF THE MMP-12 GENE AND ANALYSIS OF DEGREE OF OXIDATIVE DAMAGE TO GENOMIC DNA Elena Evgenievna Tekutskaya, Ivan Ivanovich Pavlyuchenko, Lyubov Ramazanovna Gusaruk	219
INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS ON THE STABILITY OF THE DNA MOLECULE M. V. Bezhenar, M. I. Drobotenko, A. A. Svidlov, O. M. Lyasota, V. V. Tochenaya, A. O. Sulima	224
STUDY OF THE EFFECTS OF NITRIC OXIDE ON FUNCTIONING P - GLYCOPROTEIN E. A. Sudakova, A. V. Shchulkin, Y. V. Abalenikhina, E. N. Yakusheva	230

## CONTENT

RELATIONSHIP OF DIET WITH IRON DEFICIENCY IN ATHLETES V. Kobelkova, M. M. Korosteleva	235
EXPRESSED PLANT HEMOGLOBIN AS AN INGREDIENT FOR PRODUCTION OF «PLANT-BASED MEAT» A. F. Topunov, O. V. Kosmachevskaya, E. I. Nasybullina	242
COVID-19 PANDEMIC DURING THE GLOBAL SOLAR MINIMUM: GENO GEOGRAPHY, LOCKDOWNS, VACCINATION M. Ragulskaya	244
THE ORIGIN AND EVOLUTION OF THE SIGNAL FUNCTION OF NITRIC OXIDE K. B. Shumaev, O. V. Kosmachevskaya, E. I. Nasybullina, A. F. Topunov	247
PARTICIPATION OF NUCLEAR FACTOR OF ERYTHROID ORIGIN-2 IN REGULATION P-GLYCOPROTEIN IN MODELING ENDOGENOUS OXIDATIVE STRESS Y. V. Abalenikhina, A.A. Seidkuliyeva, E. D. Rokunov, D.S. Nemtinov, A. V. Shchulkin, E. N. Yakusheva	251
COOPERATIVE EFFECTS IN BINDING OF LIGANDS TO BIOPOLYMERS Y. D. Nechipurenko, A. S. Buchelnikov, I. A. Lavrinenko	257
GLOBIN COUPLED PHOTOBIO MODYLATION OF CHONDROCYTE SURFACE Y. M. Alexandrovskaya, O. I. Baum, A. K. Dmitriev, O. A. Tiflova	262
Na,K-HOMEOSTASIS IN THE EPIDERMIS AS A PHENOMENON OF SELF-ORGANIZED CRITICALITY Valery I. Petukhov, Egor V. Dmitriev	267
<b>Section 6. NITRIC OXIDE AND ITS METABOLIC PRODUCTS IN BIOLOGICAL SYSTEMS</b>	
NITRIC OXIDE DONORS IN CHEMOTHERAPY OF BRAIN TUMORS Nataliya A. Sanina	272
NEUROLOGICAL DISORDERS AND OTHER KNOWN PATHOLOGIES DUE TO NITRIC OXIDE AND SUPEROXIDE CYCLING DISTURBANCES V. P. Reutov, E. G. Sorokina	276
MODIFIED ALBUMIN AS AN INDICATOR OF OXIDATIVE STRESS IN ISCHEMIC-HYPOXIC INJURIES OF THE BRAIN AND VARIOUS ORGANS E G Sorokina, O V Karaseva, S A Afanasyeva, O V Globa, Z B Semenova, V P Reutov, V G Pinelis	301
eNOS INVOLVEMENT IN CARCINOGENESIS AND PROSPECTS FOR THE USE OF ENZYME INHIBITORS V. P. Deryagina, N. I. Ryzhova, L. A. Savluchinskaya, I. S. Golubeva, L. V. Krivosheeva, K. I. Kirsanov	310
METABOLITES OF NITROGEN OXIDE AMONG PATIENTS WITH DISTURBANCE OF REPRODUCTIVE FUNCTION Artem F. Ishtulin, Natalya V. Korotkova, Irina V. Matveeva, Ivan V. Minaev, Polina M. Polyakova	321
<b>Section 7. MEDICAL PHYSICS</b>	
INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF CREATING F CATHETER FIBER-OPTIC SENSOR FOR INVASIVE MEASUREMENT OF LOW PRESSURES IN THE DIAGNOSIS OF THE PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL STATE OF THE HUMAN BODY E. A. Badeeva, T. I. Murashkina, S. I. Gerashchenko, D. I. Serebryakov, V. A. Badeev, T. V. Parshikova	325



## CONTENT

PROBLEMATIC ISSUES OF THE USE OF FIBER-OPTIC PRESSURE SENSORS IN MEDICAL PRACTICE T. I. Murashkina, E. A. Badaeva, F. S. Ayupova, Y. A. Vasiliev, T. V. Ponomarenko, T.V. Parshikova	331
FEATURES OF BREASTFEEDING AND ARTIFICIAL FEEDING OF NEWBORNS OF THE PERINATAL PERIOD E Y Plotnikova, E A Badaeva, T I Murashkina, A.N. Lomteva, A. G. Fomenko, E.L. Shapovalova, E.G. Davydenko, E.S. Kochetova, A.B. Olenskay	336
EXCEL ADD-INS IN MEDICAL INFORMATICS TRAINING COURSES V. Y. Zobenko, A. V. Olenskaya, Y. A. Vasiliev	341
PROTON BEAM THERAPY CENTER AT NRC "KURCHATOV INSTITUTE", MOSCOW M. S. Bulatov, D. A. Zhidkov, G. I. Klenov, V. S. Khoroshkov, A. N. Chernykh	343
DETERMINATION OF THE PULSE WAVE PROPAGATION VELOCITY DURING NONINVASIVE ASSESSMENT OF THE STATE OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM USING PRECISION FIBER-OPTIC MICRO-DISPLACEMENT SENSORS T. I. Murashkina, S. I. Gerashchenko, E. A. Badaeva, A.V. Badeev, M. S. Gerashchenko	352
SIMULATION OF LASER-INDUCED COAGULATION OF TUMOR TISSUE A K Dmitriev, V N Kortunov, V A Ulyanov	358
<b>Section 8. CLINICAL NEUROSCIENCES</b>	
HEMISPHERIC FEATURES OF EEG PATHOLOGICAL PATTERNS IN CASE OF DAMAGE TO THE REGULATORY STRUCTURES OF THE HUMAN BRAIN G.N. Boldyreva	363
REFLECTION IN THE EEG OF DISORDERS OF CEREBRAL HEMODYNAMICS IN CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA IN CHILDREN O. B. Sazonova, E. M. Troshina	368
ELECTROGRAPHIC EQUIVALENTS OF THE MOTOR PROGRAM FORMATION PROCESS IN REAL AND IMAGINARY MOTION E. M. Troshina, O. B. Sazonova, E. L. Masherov, O. A. Krotkova, M. Y. Kaverina, A. Y. Kuleva, A. V. Sukhanova	375
COMPARISON OF TREMOR AMPLITUDE IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE BY SEX N. D. Chanov, I. S. Antonov, A. V. Li	383
INFLUENCE OF SUBSTANCES ON FORMATION OF THERMOLIPOFUSCIN V. I. Kovalev, D. Y. Zhdanova, N. V. Bobkova, A. V. Chaplygina	384
CHEMICAL CONVERSION OF PRIMARY NEURONAL CULTURES A. V. Chaplygina V. I. Kovalev, D. Y. Zhdanova, N. V. Bobkova	389

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЗЕРНИСТОЙ ИКРЫ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КЪЕЛЬДАЛЯ

*В статье обсуждается проблема определения подлинности икры зернистой лососевых рыб путем обоснования методических подходов количественной оценки качества и использование результатов для сличения признаков исследуемого объекта с регламентированными характеристиками показателей натуральной икры горбуши, кеты, нерки и кижуча.*

**Ключевые слова:** натуральная икра, белок, имитированная продукция, показатели качества.

L. S. Abramova, A. V. Kozin, E. S. Guseva, A. F. Gavrillov  
Russian Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography

## IDENTIFICATION OF GRANULAR SALMON CAVIAR USING THE KJELDAHL METHOD

*The paper discusses the problem of determining the authenticity of granular salmon caviar by substantiating methodological approaches to quantifying the quality and using the results to compare the characteristics of the object under study with the regulated characteristics of the indicators of natural salmon caviar, chum salmon, sockeye salmon and coho salmon.*

**Keywords:** natural caviar, protein, imitated products, quality indicators.

### Введение

Обеспечение потребителя качественной и безопасной продукцией является важной задачей, которую решают изготовители, а также контролирующие органы для гарантии ее соответствия требованиям нормативных документов [1, с.3]. Достоверная и достаточная информация о продукте, которая наносится при маркировке, позволяет покупателю сделать правильный выбор и служит одним из методов ее идентификации. Однако проблема фальсификации, когда продуктам придаются отдельные наиболее типичные признаки, например, внешний вид при общем ухудшении или утрате остальных наиболее значимых свойств пищевой ценности, а зачастую и безопасности, приводит не только к заблуждению покупателя, но может нанести вред жизни и здоровью.

Согласно литературным данным фальсификация рыбной продукции носит глобальный характер, так как подмене подвергается каждая пятая рыба, предлагаемая в ресторанах и рыбных магазинах [2, с.2]. Даже в развитых странах, таких как Великобритания и Канада, очень высок показатель недостоверной маркировки. Примером фальсификации могут быть комбинированные рыбные продукты, например, креветочные шарики, которые на сингапурских рынках подменяют в 38,5% случаев. Исследователи выяснили, что образцы при проверке не содержали креветок, а были изготовлены из свинины, что подтверждено генетическими анализами. Незаконно пойманная рыба, подмена названий наносит удар по легальному промыслу и честным изготовителям в таких условиях приходится нелегко.

Объективных причин, которые побуждают изготовителя заменять один вид продукции другим видом, как правило, две. Первая связана с чисто экономическими вопросами. Более дешевую пикшу или минтай легко выдать за треску, так как эти виды рыб незначительно отличаются по внешнему виду и вкусу, при этом разница в себестоимости продукта будет существенной. Кроме того, может быть подмена отечественной продукции более дешевой импортной, а также реализация браконьерской продукции под видом аквакультуры. Вторая – это нехватка сырья. Факт подмены рассматривается как нарушение прав потребителей на достоверную информацию о продукте.

В последнее время наблюдается тенденция фальсификации зернистой икры лососевых видов рыб путем замены ее имитированной продукцией. С целью обеспечения подлинности пищевых продуктов используются различные методологические подходы [3, с.405; 4, с.754; 5, с.8]. Однако для идентификации икорной продукции используются, как правило, дорогостоящие генетические исследования, поэтому разработка простых в исполнении и доступных методов определения подлинности икры является важной практической задачей.

Современная технология производства искусственной икры позволяет выпускать продукцию очень близкую по внешнему виду к натуральной икре. Особенности технологии заключаются в создании водно-жировой эмульсии, которая даже при использовании рыбных бульонов содержит не более 1% белка, в то время как в зернистой икре горбуши, кеты, нерки или кижуча, согласно литературным данным, содержится от 27 до 34% белка [6, с.59] (таблица 1).

Наименование икорной продукции	Содержание, г/100 г			Энергетическая ценность 100 г, ккал
	углеводы	белок	жир	
Зернистая икра кеты	не определяются	27-33	13	230-250
Зернистая икра горбуши	не определяются	28-33	11-12	210-225
Зернистая икра нерки	не определяются	28-30	11	210-220
Зернистая икра кижуча	не определяются	28-34	10	200-225
Имитированная лососевая икра	1,5-2,5	1	2-5	40-50

Таблица 1 – Показатели зернистой икры лососевых рыб и имитированной лососевой икры.

Исходя из приведенных данных, сделан вывод, что содержание белка можно рассматривать как основной количественный маркер идентификации зернистой икры лососевых видов рыб.

### Цель работы.

Разработка методических подходов количественной оценки показателей качества икры зернистой лососевых рыб для идентификации заявленных свойств.

### Материалы и методы.

Отбор проб проводили в соответствии с ГОСТ 31339 [7, с.194], подготовку средней пробы осуществляли по ГОСТ 7636 [8, с.37]. Для обеспечения однородности образец гомогенизировали в течение 5 мин при 10000 об/мин на гомогенизаторе «*Ace Homogenizer model AM-11*» (*Nihonseiki Kaisha Ltd, Япония*).

Определение содержания белка проводили по МИ 002–2020 [9, с.1]. В каждую пробирку для минерализации помещали рассчитанную навеску исследуемого образца (с точностью до 0,01 г), 1 таблетку катализатора, а также 10 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. Образцы подвергали минерализации в деминерализаторе *Digestor 2020 (Foss Analytical AB, Sweden)*, после чего охлаждали. Окончание процесса минерализации определяли по отсутствию темных включений и изменению цвета жидкости в пробирке до прозрачного бесцветного (или зеленовато-голубого). Одновременно аналогичным образом проводили контрольный (холостой) анализ без навески. Для определения содержания азота использовали анализатор азота *Kjeltec System 2300 (Foss Analytical AB, Sweden)*. Пробирку с образцом устанавливали в дистилляционный блок и закрывали защитную дверцу. Введение щелочи, а также циклы дистилляции и титрования прибор контролировал автоматически. Результат содержания азота в образце выводился на дисплей после завершения титрования.

Проверку правильности работы анализатора азота осуществляли по стандартному образцу утвержденного типа, который был разработан, утвержден и предоставлен для исследований УНИИМ – филиалом ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева». Стандартный образец ГСО 10272-2013 представлял собой аминокислоту с массовой

долей основного вещества не менее 99,0% и содержанием массовой доли азота 18,50% [10, с.23].

Для исследований содержания белка были использованы образцы икорной продукции различных производителей, в соответствии с информацией, указанной на маркировке. Перечень образцов приведен в таблице 2.

### Полученные результаты.

В образцах икорной продукции определили содержание белка, результаты приведены в таблице 2. Из представленных данных видно, что имитированная продукция содержит незначительное количество белка в интервале от 0 до 0,4 %, в то время как в икре зернистых лососевых рыб (натуральной) значения варьировались от 27 до 34 %.

Проведена оценка внутрилабораторной прецизионности результатов анализа, выраженная относительным среднеквадратичным отклонением (СКО), которая показала, что значения содержания белка в имитированной икре варьируются в более широком интервале, по сравнению данными для натуральной икры. Это объясняется низким содержанием белка в имитированной продукции, что вносит большой вклад на размах результатов измерений и обуславливает неравномерность его распределения в анализируемой пробе. Для снижения вклада от неоднородности пробы рекомендуется обеспечить тщательную гомогенизацию образца перед отбором навески, а также увеличить ее массу.

На основании проведенных исследований и с учетом литературных данных сделано заключение, что содержание белка не менее 27% является количественным маркером для идентификации подлинности зернистой икры лососевых видов рыб.

При идентификации икры важным этапом является органолептическая характеристика продукции, включающая оценку внешнего вида, консистенции, вкуса, запаха. Для характеристики показателей, их определений и значений в целях идентификации икры лососевой зернистой за основу взяты требования ГОСТ 18173-2004 [11, с.3]. Кроме того, предложено внести показатель «проба на варку», который является показателем наличия белка в продукции и определяется путем выдерживания икры в горячей воде с температурой около 60°C в течение 2-3 минут. Характеристика показателей, их определений и значений для идентификации икры лососевой зернистой приведены в таблице 3.

Процедура идентификации будет заключаться в сличении признаков исследуемого объекта с характеристиками показателей, приведенных в определительной таблице 3.

Рекомендованные показатели и методические подходы к идентификации рекомендовано внести в разрабатываемую «Методику определения белка в зернистой икре лососевых рыб и использование этих значений для идентификации заявленных свойств», которая будет аттестована в установленном порядке.

Таблица 2 – Результаты определения содержания белка в образцах икорной продукции

№ п/п	Объект исследований. Производитель. Дата изготовления (при наличии)	n	Минимальное значение, %	Максимальное значение, %	Размах, %	Медиана, %	$\bar{X}_i$ , среднее значение, %	Относительное среднеквадратичное отклонение, $s_r$ , %
1а	Икра имитированная. Конфискованная без маркировки	10	0,33	0,42	0,09	0,38	0,38	7,24
1б		10	0,26	0,33	0,06	0,30	0,30	7,89
1-2а	Икра имитированная. Конфискованная без маркировки	8	0,32	0,37	0,05	0,34	0,34	4,52
1-2б		10	0,23	0,29	0,05	0,26	0,26	5,86
2	Икра горбуши зернистая пастеризованная. ООО «Юкра», изг. 18.12.2021	29	31,70	32,87	1,17	32,36	32,31	0,85
3	Икра нерки зернистая пастеризованная. ООО «Юкра», изг. 18.12.2021	20	27,39	29,02	1,63	28,66	28,43	2,04

## Секция 1. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

№ п/п	Объект исследований. Производитель. Дата изготовления (при наличии)	n	Минимальное значение, %	Максимальное значение, %	Размах, %	Медиана, %	$\bar{X}_i$ , среднее значение, %	Относительное среднеквадратичное отклонение, $s_r$ , %
4	Икра кеты зернистая пастеризованная. ООО «Юкра», изг. 18.12.2021	20	32,05	32,80	0,75	32,37	32,42	0,65
5	Икра кеты. ООО «Камчатские деликатесы», изг. 27.09.2021	4	>LOD*	0,08	0,08	0,03	0,04	-
6	Икра лососевая. ООО «Муссон», изг. 07.09.2021	2	>LOD	>LOD	-	-	-	-
7	Икра кеты зернистая. Развесная	3	30,20	30,33	0,14	30,22	30,25	0,24
8	Икра лососевая. ООО «Персей»	3	>LOD	0,09	0,09	0,01	0,03	-
9	Икра лососевая. ООО «Жемчужина Камчатки».	4	>LOD	>LOD	-	-	-	-
10	Икра горбуши зернистая. ООО «Витязь». Развесная	4	33,28	33,65	0,36	33,50	33,48	0,49
11	Икра кеты зернистая. Развесная	4	32,44	32,64	0,20	32,58	32,56	0,29
12	Икра кеты зернистая. ООО «Континент», изг. 10.09.2021	4	33,81	34,07	0,26	33,96	33,95	0,33

\* LOD – предел обнаружения; n – число определений

**Таблица 3 - Характеристика показателей, их определений и значений для идентификации икры лососевой зернистой**

Наименование показателя	Характеристика показателя и его значение для икры лососевой зернистой
Внешний вид	Икра одного вида рыб. Икринки чистые, целые, однородные по цвету, без сгустков крови и пленок. Допускаются икринки неоднородного цвета; незначительное количество оболочек икринок-лопанца и отстоя.
Консистенция	Икринки упругие, с влажной поверхностью, отделяющиеся одна от другой. Допускаются слабые икринки, вязкость икры в пределах сохранения зернистой структуры. Отсутствие вкраплений во внутреннем содержании икринки.
Вкус и запах	Свойственные данному виду продукта, без посторонних привкуса и запаха. Допускается слабый привкус горечи для икры нерки (красной) и кижуча.
Проба на варку	Денатурация белка на поверхности икринок с образованием белого налета на поверхности. Отсутствие окрашивания воды, в которой выдерживалась икра.
Содержание белка, %, не менее	27,0
Наличие посторонних примесей	Не допускается

### Заключение

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

- содержание белка является основным количественным маркером идентификации зернистой икры лососевых видов рыб;
- для идентификации икры необходимо учитывать органолептические показатели продукции, включающие оценку особенностей внешнего вида, консистенции, вкуса, запаха, а также пробы на варку.

Совершенствование системы контроля качества пищевой рыбной продукции для выявления фальсификации и обеспечения ее соответствия целям приобретения и заявленным потребительским свойствам внесет вклад в решение проблемы фальсификации.

## Список литературы

1. Федеральный закон от 1 марта 2020 г. N 47-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «О качестве и безопасности пищевых продуктов» и статью 37 Федерального закона «Об образовании в Российской Федерации». Оpubл. 01.03.2020 г. 32 с. (URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202003010004>).
2. FAO. Overview of Food Fraud in the Fisheries Sector. Fisheries and Aquaculture Circular No. 1165. Food and Agriculture Organization of the United Nations (UNFAO). Rome. Italy. 2018. (URL: <https://www.fao.org/documents/card/ru/c/I8791EN/>).
3. Farag M.A., Abib B., Tawfik S., Shafik N., Khattab A.R. Caviar and fish roe substitutes: Current status of their nutritive value, bio-chemical diversity, authenticity and quality control methods with future perspectives // Trends in Food Science & Technology. 2021. Vol. 110. P. 405-417.
4. Tavakoli, S.; Luo, Y.; Regenstein, J.M.; Daneshvar, E.; Bhatnagar, A.; Tan, Y.; Hong, H. Sturgeon, Caviar, and Caviar Substitutes: From Production, Gastronomy, Nutrition, and Quality Change to Trade and Commercial Mimicry // Rev. Fish. Sci. Aquac. 2021. Vol. 29 (4). P. 753-768.
5. Fiorino, G.M.; Garino, C.; Arlorio, M.; Logrieco, A.F.; Losito, I.; Monaci, L. Overview on Untargeted Methods to Combat Food Frauds: A Focus on Fishery Products // J. Food Qual. 2018. Vol.3. P. 1–13.
6. Вафина Л.Х., Бахитанский Э.Л., Копыленко Л.Р., Рубцова Т.Е. Качество, безопасность и методы анализа продуктов из гидробионтов. Информационные сведения о пищевой ценности рыбы и рыбной продукции // Москва. Издательство ВНИРО. 2013. С. 97.
7. ГОСТ 31339-2006 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб // М.: Стандартинформ. 2007. С. 12.
8. ГОСТ 7636-85 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа, маркировка, упаковка.//М.: Стандартинформ. 2010. С. 139.
9. МИ 002 – 2020 «Методика измерения массовой доли белка методом Кьельдаля». //(ФР.1.31.2020.38483). 2020. С. 11.
10. М.П. Крашенинина [и др.] Создание стандартного образца состава глицина (СГ СО УНИИМ) // Стандартные образцы. 2015. № 1. С. 23–33.
11. ГОСТ 18173-2004 Икра лососевая зернистая баночная. Технические условия (с Изменением N 1). // М.: Стандартинформ. 2012. С. 41.

## Сведения об авторах

**Любовь Сергеевна Абрамова,**  
д.т.н., профессор, заместитель руководителя Департамента по вопросам качества пищевой рыбной продукции, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»  
Москва, Россия

Эл. почта: [abramova@vniro.ru](mailto:abramova@vniro.ru)

**Андрей Валерьевич Козин,**  
к.х.н., старший научный сотрудник  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»  
Москва, Россия

Эл. почта: [kozin82a@gmail.com](mailto:kozin82a@gmail.com)

**Елена Сергеевна Гусева,**  
специалист  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»  
Москва, Россия

Эл. почта: [quality@vniro.ru](mailto:quality@vniro.ru)

## Information about authors

**Liubov Sergeevna Abramova,**  
doctor of Technical Science, professor  
Russian Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography  
Moscow, Russia  
E-mail: [abramova@vniro.ru](mailto:abramova@vniro.ru)

**Andrey Valerievich Kozin,**  
PhD in Chemical sciences, Senior Researcher  
Russian Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography  
Moscow, Russia  
E-mail: [kozin82a@gmail.com](mailto:kozin82a@gmail.com)

**Elena Sergeevna Guseva,**  
Specialist  
Russian Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography  
Moscow, Russia  
E-mail: [quality@vniro.ru](mailto:quality@vniro.ru)

**Гаврилов Александр Федорович,**  
специалист  
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский  
институт рыбного хозяйства и океанографии»  
Москва, Россия  
Эл. почта: [gavrilov.alexandr.666@gmail.com](mailto:gavrilov.alexandr.666@gmail.com)

**Alexander Fedorovich Gavrilov,**  
specialist  
Russian Federal Research Institute of Fisheries  
& Oceanography  
Moscow, Russia  
E-mail: [gavrilov.alexandr.666@gmail.com](mailto:gavrilov.alexandr.666@gmail.com)

УДК 579.672, 579.674, 579.678  
ГРНТИ 34.27.49  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.19-24

**Л.П. Минаева, Ю. М. Маркова, А. Д. Евсюкова**  
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр  
питания, биотехнологии и безопасности пищи»

## **ПОЛИФАЗНЫЙ ПОДХОД К ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОМИЦЕТОВ – ПИЩЕВЫХ КОНТАМИНАНТОВ**

*В статье представлен комплексный подход на основе полифазной таксономии, включающие изучение фенотипических, молекулярно-генетических и хемотаксономических характеристик микромицетов, позволяющий получить надежные результаты видовой идентификации плесневых контаминантов пищевой продукции, расширить знания о метаболитных профилях конкретных видов грибов и их хемотипах. Показан потенциал образования микотоксинов (МТ) у плесневых контаминантов рода *Aspergillus*, выделенных из кофейного сырья, в благоприятных условиях и способных к накоплению одновременно нескольких опасных МТ (ОТА, АФЛ В1, ФВ2), а также ЭМТ (СТЦ). Наличие токсигенной активности у плесневых грибов, выделенных из зелёного кофе, показано в России впервые.*

**Ключевые слова:** полифазная таксономия, *Aspergillus*, ПЦР, токсинообразование *in vitro*, фенотипическая идентификация.

**L. P. Minaeva, Y. Markova, A. D. Evsjukova**  
Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology

## **POLYPHASE APPROACH FOR SPECIES IDENTIFICATION OF MICROMY- CETES - FOOD CONTAMINANTS**

*The article presents an integrated approach based on polyphasic taxonomy, which includes the study of phenotypic, molecular genetic and chemotaxonomic characteristics of micromycetes. This approach makes it possible to obtain reliable results of species identification of mold contaminants in food products, to expand knowledge about the metabolite profiles of specific fungal species and their chemotypes. The potential for the formation of mycotoxins (MT) by mold contaminants of the genus *Aspergillus* isolated from coffee raw materials has been shown. It was shown that, under favorable conditions, they are able to simultaneously accumulate several dangerous MTs (OTA, AFL B1, FB2), as well as emergent MT (STC).*

**Keywords:** polyphasic taxonomy, *Aspergillus*, PCR, toxin production *in vitro*, phenotypic identification.

### **Введение**

Идентификация плесневых контаминантов до уровня вида является сложной задачей в силу высокого сходства морфологических структур, неоднородности подходов к таксономии грибов, накоплением новых данных молекулярно-генетических исследований, отражающих сложность эволюционных процессов в формировании видов, поэтому не существует простых стратегий для однозначной идентификации микромицетов [1, 2]. Надежные данные могут быть получены только при использовании комплексного подхода на основе полифазной таксономии, включающего изучение фенотипических,

молекулярно-генетических и хемотаксономических характеристик микромицетов.

Созданная ранее и используемая на протяжении многих десятилетий таксономическая система плесневых грибов, основанная на морфологических характеристиках, в настоящее время претерпевает кардинальные, а для некоторых видов революционные изменения, обусловленные развитием и применением новых методов исследований: на основе молекулярно-генетического анализа (ПЦР, секвенирование), анализа спектра продуцируемых вторичных метаболитов, включая МТ, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) в формате мультidetекции. Объем накопленных данных позволил провести более глубокую видовую и родовую дифференциацию, в результате чего многие морфологически схожие изоляты грибов, в частности рода *Aspergillus*, рассматриваемые ранее как представители одного вида были ре-классифицированы и отнесены к группе или комплексу видов, так понятие вида *A.niger* было расширено до комплекса *Aspergillus section Nigri* (*A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*, *A. carbonarius* и др., всего 19 видов) [3], а вида *A. flavus* – до комплекса *Aspergillus section Flavi* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. pseudotamarii*, *A. togoensis*, *A. aflatoxiformans* и др., всего 33 вида) [4]. Идентификация указанных видов может быть проведена только на основе полифазной таксономии.

Видовой состав обнаруживаемых грибов динамичен и зависит от множества факторов: природных, агротехнических, устойчивости растений к фитопатогенам. Это существенно образом отражаются на структуре фитопатогенных комплексов и изменяет соотношение фитопатогенных видов. В свою очередь меняется и набор токсичных метаболитов в возделываемых культурах; повышается опасность микотоксинообразования не только на этапе созревания в поле, но также при переработке и хранении.

Для объективной оценки контаминации продуктов как регламентируемыми, так новыми - эмерджентными МТ и научного обоснования эффективных путей минимизации их негативного воздействия на организм человека необходимы данные о видовом составе и токсигенном потенциале микромицетов в продукции, характеризующейся высокой степенью риска поражения плесенью. Одним из таких видов продукции является кофе, при производстве которого наиболее важным с точки зрения безопасности являются этапы сушки и ферментации собранных плодов в естественных климатических условиях за счёт собственной микрофлоры, включающей в том числе плесневые грибы – потенциальные продуценты МТ. Проблема контаминации кофе опасным охратоксином (ОТА) побудила Научный комитет Европейской комиссии по пищевым продуктам провести оценку риска и признать необходимость контроля ОТА в такой продукции. Было отмечено, что кофе входит в группу продуктов питания, являющихся основными источниками поступления ОТА в организм человека с пищей [5]. Актуальность изучения определяется и тем, что в объеме импортируемого в РФ кофе 85% приходится на сырье - необработанный зелёный кофе.

### **Цель работы**

Изучение видового состава микофлоры из зеленого кофе с применением подхода полифазной таксономии.

### **Материалы и методы**

Зеленый кофе 20 образцов, выращенных в регионах Центральной и Южной Америки, Африки и Юго-Восточной Азии, полученных из розничной сети Московского региона. Изучение внутренней микофлоры зелёного кофе проводили посевом зерен в чашках Петри на питательную среду, после термостатирования (7 суток при 24 °С) определяли процент зараженных зерен, из которых выделяли плесневые грибы и проводили расчистку до получения моноспоровых изолятов (МСИ) [6]. Фенотипическую идентификацию грибных МСИ проводили по микро- и макроморфологическим признакам характеристикам в соответствии с Samson и соавт. [3, 7], для морфологически схожих видов указывали принадлежность к секции видов. ПЦР-идентификацию моноспоровых изолятов (МСИ) *Aspergillus sp.* проводили с использованием подобранных видоспецифичных



праймеров. Изоляты, отнесенные к секции *Aspergillus Nigri* по фенотипическим признакам, тестировали с праймерами, специфичными к видам *A.niger* (*An*), *A.carbonarius* (*Ac*), *A.tubingensis* (*At*) и *A.welwitschiae* (*Aw*) [8, 9]; изоляты, отнесенные к секции *Aspergillus Flavi* - с праймерами, специфичными к *A.flavus* (*FLA*) и *A.flavus* /*A.parasiticus* (*aflP* (1)) [9]. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе «LightCycler® 96» (*Roche*) в соответствии с методиками [8, 9]. Статистическая обработка по трем повторностям проводилась автоматически с расчетом стандартного отклонения от среднего. Экстракцию ДНК из мицелия грибов проводили с набором «Проба-ГС» (ООО «ДНК технология»). Исследование токсинообразования в условиях *in vitro* и определение 18 микотоксинов в субстратном мицелии проводили методом УВЭЖХ-МС/МС в формате мультидетекции по ранее описанным методикам [6].

### Полученные результаты

Накопление МТ в пищевых продуктах обусловлено токсигенными видами плесневых грибов вегетирующих во внутренней части зёрен, поэтому определение их видовой принадлежности и их токсигенных свойств дает понимание об источниках происхождения МТ в конечной продукции. По результатам проведенных ранее исследования внутренней микофлоры зараженность кофейных зерен составляла от 87,5 до 100% в зависимости от региона происхождения [6]. По видовому составу больше всего было обнаружено грибов рода *Aspergillus*. Из внутренней микофлоры были выделены 32 изолята (МСИ), которые изучены с применением полифазного подхода, включающего идентификацию: по фенотипическим признакам (микро- и макроморфология); на основе молекулярно-генетического анализа (методом ПЦР в реальном времени) и анализ вторичных метаболитов – МТ (методом УВЭЖХ-МС/МС в формате мультидетекции). Валидацию видоспецифических праймеров проводили с типовыми штаммами, полученными из отечественных коллекций микроорганизмов: ВКПМ1 - *A. carbonarius* F- 40 и *A. parasiticus* F-1267; ВКМ2 - *A. niger* F-3883 и *A. flavus* F-25. Полученные данные представлены в таблице.

Таблица. Определение видовой принадлежности штаммов *Aspergillus* sp. на основе полифазного подхода.

Число штаммов	Видовая принадлежность установленная:		Результаты ПЦР анализа с видоспецифическими праймерами						Микотоксины <i>in vitro</i> (мгк/кг субстрата)	Видовая принадлежность на основе полифазного подхода
	Фенотипическим методом	Методом ПЦР	<i>A. niger</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus/A. parasiticus</i>		
10	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	+	-	-	-	-	-	ФВ2	<i>A. niger</i>
1	<i>A. brasiliensis</i>	<i>A. niger</i>	+	-	-	-	-	-	ФВ2	<i>A. niger</i>
2	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i> / <i>A. welwitschiae</i>	+	-	-	+	-	-	ФВ2	<i>A. niger</i> / <i>A. welwitschiae</i> <sup>3</sup>
1	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	+	-	-	-	-	-	ОТА	<i>A. niger</i>
4	<i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	+	-	-	-	-	-	н/о	<i>A. niger</i>
1	<i>A. niger</i> / <i>A. carbonarius</i>	<i>A. carbonarius</i>	-	+	-	-	-	-	н/о	<i>A. carbonarius</i>
1	<i>A. niger</i>	<i>A. tubingensis</i>	-	-	+	-	-	-	н/о	<i>A. tubingensis</i>
2	<i>A. niger</i>	- <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	н/о	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>
2	<i>A. sclerotia-carbonarius</i>	- <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	н/о	<i>Aspergillus</i> секции <i>Nigri</i>
4	<i>A. niger</i> / <i>A. carbonarius</i>	не исследовали	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	ОТА	<i>A. carbonarius</i> <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Национальный биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (ВКПМ).

<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (ИБФМ РАН) – Обособленное подразделение ФГБУН «ФИЦ биологических исследований РАН» Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ)

## Секция 1. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Число штаммов	Видовая принадлежность установленная:		Результаты ПЦР анализа с видоспецифическими праймерами						Микотоксины <i>in vitro</i> (мгк/кг субстрата)	Видовая принадлежность на основе полифазного подхода
	Фенотипическим методом	Методом ПЦР	<i>A. niger</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. welwitschiae</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus/A. parasiticus</i>		
1	<i>A. секции Flavi</i>	<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	-	-	+	СТЦ	<i>A. parasiticus</i>
4	<i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	+	+	АФЛ В1 АФЛ В2 СТЦ	<i>A. flavus</i>
1	<i>A. секции Flavi</i>	2	-	-	-	-	-	-	СТЦ	<i>A. nidulans</i> , <i>A. mottae</i> и <i>A. togoensis</i> 4
<b>Типовые штаммы</b>										
1	<i>A. niger</i> F-3883	<i>A. niger</i>	+	-	-	-	-	-	н/д	-
1	<i>A. carbonarius</i> F-40	<i>A. carbonarius</i>	-	+	-	-	-	-	н/д	-
1	<i>A. parasiticus</i> F-1267	<i>A. flavus/parasiticus</i>	-	-	-	-	-	+	н/д	-
1	<i>A. flavus</i> F-25	<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	+	+	н/д	-

Примечание: «+» амплификация есть; «-» амплификации нет; 1- не относится к *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis* и *A. welwitschiae*; 2- не относится к *A. flavus* и *A. flavus /parasiticus*; 3 - переходный вид, 4 - наиболее вероятные виды.

По результатам комплексных исследований 32 изолятов была получена высокая степень корреляции фенотипических и генетических тестов для штаммов секции *Aspergillus Nigri*: для *A. niger* - 15 штаммов, *A. tubingensis* – один, *A. carbonarius* – один, положительную корреляцию с *A. niger* / *A. welwitschiae* показали два штамма. У четырех штаммов данной секции не было положительных результатов ПЦР с видоспецифическими праймерами *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis* и *A. welwitschiae*, что означает принадлежность к другим видам этой секции. Для четырех штаммов, идентифицированных фенотипически как *A. niger /carbonarius* не был проведен ПЦР анализ, однако они продуцировали ОТА, что является отличительным признаком вида *A. carbonarius*, на этом основании они были отнесены к этому виду. Среди изолятов секции *Aspergillus Flavi* по результатам ПЦР анализа: один штамм этой секции был идентифицирован как *A. parasiticus*, для четырех штаммов был подтвержден вид *A. flavus*, и лишь для одного штамма не было положительной реакции ни с одним праймером этой секции, однако как продуцирующий СТЦ он может принадлежать к одному из видов: *A. nidulans*, *A. mottae* и *A. togoensis*. Таким образом, в подавляющем большинстве случаев 24 из 32 (75%) результаты фенотипической идентификации по комплексу макро- и микроморфологических признаков были подтверждены ПЦР-анализом, а данные по токсинообразованию позволили подтвердить вид для 4 (12,5%) штаммов *A. carbonarius* и ограничить видовой диапазон для одного штамма внутри секции *Flavi*.

Обнаруженная у штаммов *Aspergillus* секции *Nigri* фумонизин- и охратоксин-продуцирующая активность приобретает особую значимость с учётом широкого использования *A. niger* в биотехнологии в качестве важнейшего продуцента органических кислот и ферментных препаратов для пищевой промышленности.

### Выводы

1. Комплексный подход на основе полифазной таксономии, включающий изучение фенотипических, молекулярно-генетических и хемотаксономических характеристик микромицетов, позволяет получить надежные результаты видовой идентификации плесневых контаминантов пищевой продукции, расширить знания о метаболитных профилях конкретных видов грибов и их хемотипах, с учетом видоспецифичности токсинпродуцирующей способности, что дает возможность создавать новые инструменты

таксономической идентификации микромицетов.

2. Полученные при идентификации изолятов широко распространенных грибов рода *Aspergillus* экспериментальные данные подтвердили присутствие среди них потенциальных продуцентов МТ и ЭМТ. Изучение их способности к токсинообразованию необходимо для разработки подходов к предотвращению загрязнения пищевой продукции в процессе её получения, переработки и хранения с учётом специфики поведения микофлоры.

### Заключение

Авторы считают, что в представленном исследовании новыми являются следующие положения и результаты: реализован комплексный подход на основе полифазной таксономии при изучении плесневых контаминантов из пищевой продукции, повышающий надёжность их идентификации; показан потенциал образования микотоксинов (МТ) у плесневых контаминантов рода *Aspergillus*, выделенных из кофейного сырья, в благоприятных условиях способных к накоплению одновременно нескольких опасных МТ (ОТА, АФЛ В1, ФВ2), а также эмерджентных МТ (СТЦ); наличие токсигенной активности плесневых грибов, выделенных из зелёного кофе, показано в России впервые.

### Финансирование

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-16-00077-П) «Эмерджентные микотоксины в пищевых продуктах растительного происхождения: разработка методов анализа, изучение контаминации, видовая характеристика микромицетов-продуцентов, разработка гигиенических нормативов».*

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. Grube M., Gaya E., Kauserud H., Smith A.M., Avery S.V., Fernstad S.J., Muggia L., Martin M.D., Eivindsen T., Koljalg U., Bendiksby M. *The next generation fungal diversity researcher // Fungal Biology Reviews.* 2007. 31: 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.02.001>
2. Inderbitzin P., Robbertse B., Schoch C.L. *Species identification in plant-associated prokaryotes and fungi using DNA // Phytobiomes Journal.* 2020. 4:103-114. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-19-0067-RVW>
3. Samson R.A., Noonim P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C., Varga J. *Diagnostic tools to identify black aspergilli // Stud Mycol.* 2007; 59:129-45. doi: 10.3114/sim.2007.59.13
4. Frisvad J.C., Hubka V., Ezekiel C.N., Hong S.B., Nováková A., Chen A.J., Arzanlou M., Larsen T.O., Sklenář F., Mahakarnchanakul W., Samson R.A., Houbraken J. *Taxonomy of Aspergillus section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins // Stud Mycol.* 2019. 93:1-63. doi: 10.1016/j.simyco.2018.06.001
5. *Commission Regulation (EC) No 1881/2006. Commission Directive 2006/1881/EC of 19 December 2006, setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs // Off. J. Eur. Commun.* 2006. L364: 5–24.
6. Минаева Л.П., Евсюкова А.Д., Маркова Ю.М., Полянина А.С., Быкова И.Б., Стеценко В.В., Чалый З.А., Ефимочкина Н.Р., Шевелева С.А. *Оценка загрязнённости кофе, какао и какао-продуктов плесневыми грибами – потенциальными продуцентами микотоксинов // Гигиена и санитария.* 2022. №4. С.424-430. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-4>
7. Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J., Hong S.B., Hubka V., Klaassen C.H., et al. *Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus // Stud. Mycol.* 2014. 78: 141–73. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
8. Palumbo J. D., O'Keefe T. L. *Detection and discrimination of four Aspergillus section*

*Nigri species by PCR // Letters in applied microbiology. 2015. T. 60. №. 2. C. 188-195. DOI: 10.1111/lam.12358*

9. Al-Shuhaib M. B. S., Albakri A.H., Alwan S.H., Almandil N.B., Azeez S.A., Borgio J.F. *Optimal pcr primers for rapid and accurate detection of Aspergillus flavus isolates // Microbial pathogenesis. 2018. T. 116. C. 351-35. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.049>*

**Сведения об авторах**

**Людмила Павловна Минаева,**  
к.т.н., старший научный сотрудник  
ФГБУН Федеральный исследовательский центр  
питания, биотехнологии и безопасности пищи  
Москва, Россия  
Эл. почта: [liuminaeva-ion@mail.ru](mailto:liuminaeva-ion@mail.ru)

**Юлия Михайловна Маркова,**  
к.б.н., старший научный сотрудник  
ФГБУН Федеральный исследовательский центр пи-  
тания, биотехнологии и безопасности пищи  
Москва, Россия  
Эл. почта: [yulia.markova.ion@gmail.com](mailto:yulia.markova.ion@gmail.com)

**Алёна Дмитриевна Евсюкова,**  
лаборант-исследователь  
ФГБУН Федеральный исследовательский центр пи-  
тания, биотехнологии и безопасности пищи  
Москва, Россия  
Эл. почта: [st.shtolz@gmail.com](mailto:st.shtolz@gmail.com)

**Information about authors**

**Lyudmila Pavlovna Minaeva,**  
PhD in Technical Sciences, Senior researcher of the  
laboratory of biosafety and nutrimicrobiome analy-  
sis, Federal Research Centre of Nutrition and Bio-  
technology  
Moscow, Russia  
E-mail: [liuminaeva-ion@mail.ru](mailto:liuminaeva-ion@mail.ru)

**Yulia Mikhaylovna Markova,**  
PhD Biology, Senior researcher of the laboratory of  
biosafety and nutrimicrobiome analysis, Federal  
Research Centre of Nutrition and Biotechnology  
Moscow, Russia  
E-mail: [yulia.markova.ion@gmail.com](mailto:yulia.markova.ion@gmail.com)

**Alena Dmitrievna Evsjukova,**  
Research laboratory assistant of the laboratory of  
biosafety and nutrimicrobiome analysis, Federal  
Research Centre of Nutrition and Biotechnology  
E-mail: [st.shtolz@gmail.com](mailto:st.shtolz@gmail.com)

УДК 664 , 579  
ГРНТИ 65.01, 34.27  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.24-30

**Л.П. Минаева, О. В. Багрянцева, С. А. Шевелева**  
ФГБУН «Федеральный иссле-  
довательский центр питания, биотехнологии и  
безопасности пищи»

**ОБОСНОВАНИЕ ТРЕБОВАНИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ НОВОГО ВИДА, ПОЛУЧЕННОЙ ПУТЕМ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА**

*В статье представлен анализ научных данных о продукции микробного синтеза, используемой при производстве пищевых продуктов нового вида; выявлены основные потенциальные риски для здоровья человека при потреблении продукции, получаемой при помощи микробного синтеза генетически-модифицированными штаммами;*

**Ключевые слова:** продукция нового вида, генетически модифицированные микроорганизмы, пищевые ингредиенты, ферментные препараты, биологически активные вещества, микробный синтез, оценка риска, нормативы безопасности.

**Lyudmila P. Minaeva, Olga V. Bagryantseva, Svetlana A. Sheveleva**  
Federal Research Centre of Nutrition  
and Biotechnology

**SUBSTANTIATION OF MICROBIOLOGICAL SAFETY REQUIREMENTS FOR A NEW FOOD PRODUCTS OBTAINED BY MICROBIAL SYNTHESIS**

*The article presents an analysis of scientific data on microbial synthesis products that are used in the production of new types of food products; the main potential risks to human health in the use of products obtained using microbial synthesis with genetically modified strains have been identified; the main criteria for assessing the risk to human health of products of a new type of*

*microbial origin and updating the microbiological safety requirements for such products are given.*

**Keywords:** *new species products, genetically modified microorganisms (GMM), food ingredients, enzyme preparations, biologically active substances, microbial synthesis, risk assessment, safety standards.*

### **Введение**

Интенсивное развитие в результате научно-технического прогресса привело к появлению видов пищевой продукции с измененной молекулярной структурой. Для получения таких продуктов, относимых к продуктам нового вида, используются генно-инженерно-модифицированные растения, животные, мутантные и генетически-модифицированные (ГМ) микроорганизмы (ГММ) [1]. Изменение структуры ДНК и РНК этих организмов может привести к изменению структуры и, следовательно, биологических свойств получаемой с их использованием пищевых веществ. Кроме того, в пищевой продукции, получаемой с использованием мутантных и ГМ микроорганизмов, сохраняется риск присутствия микробных токсинов, в том числе микотоксинов, аллергенов, антибиотиков, а также ДНК, включая внехромосомные элементы (плазмиды, транспозоны, бактериофаги и др.) штаммов-продуцентов [2-4].

Наиболее значимую группу продукции нового вида составляют ферментные препараты [5,6], применяемые в пищевой промышленности. С использованием технологий микробного синтеза производятся такие пищевые ингредиенты, как ароматизаторы, пищевые добавки, биологически активные вещества (витамины и витаминоподобные вещества, аминокислоты, пептиды, белки), органические кислоты [7-9]. Все эти вещества позиционируются как «натуральные». Целый ряд этих ингредиентов используется в питании детей раннего возраста, беременных и кормящих женщин, в частности, заменители олигосахаридов грудного молока. Концепция создания пищевых продуктов для питания спортсменов фактически построена на использовании в их рационе аминокислот, пептидов, белков, витаминов, то есть пищевых ингредиентов, производимых при помощи микробного синтеза.

Применение новых видов штаммов-продуцентов неприродного происхождения, требует более тщательной оценки их безопасности и разработки регламентов безопасного применения в пищевой промышленности как самих технологических микроорганизмов, так и производимой с их использованием пищевой продукции. В Российской Федерации (РФ) нормативно-правовая и методическая база контроля таких продуктов и используемых штаммов-продуцентов основана на федеральном законодательстве, предусматривающем государственное регулирование генно-инженерной деятельности. В Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС) общие требования безопасного использования ГМО установлены Техническими регламентами Таможенного Союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011), «Пищевая продукция в части ее маркировки» (ТР ТС 022/2011) и другими техническими регламентами ЕАЭС. При этом установленные в этих документах требования обуславливают дальнейшее совершенствование на фоне постоянного повышения научно-методического уровня контроля. Обоснование введения новых нормативов опирается на результаты оценки риска здоровью населения.

### **Цель работы**

Совершенствование методологии оценки риска здоровью населения и регламентации использования продукции нового вида, изготавливаемой при помощи микробного синтеза, и обоснование требований микробиологической безопасности к продукции нового вида и штаммам-продуцентам.

### **Материалы и методы**

Материалы: законодательные и нормативные акты Евразийского экономического

союза, Российской Федерации, Комиссии Кодекс Алиментариус, Европейского союза, данные научных публикаций за период 2006-2021 гг. с использованием баз данных Pub Med, Web of Science, Google Scholar. Методы: информационный анализ и экспертная оценка отечественных и международных нормативных и законодательных документов и публикаций научных исследований.

### Полученные результаты

1. *Обобщение и анализ научных данных о продуктах микробного синтеза, используемых при производстве пищевых продуктов.* В результате обобщения и анализа научных данных установлено, что с использованием микробного синтеза производится основная часть витаминов и биологически активных веществ, являющихся обязательными компонентами специализированных пищевых продуктов для детского, спортивного и диетического питания. Так, с использованием мутантных и генетически модифицированных микроорганизмов производят аминокислоты, пептиды, белки, органические кислоты, жирные кислоты, витамины В1, В2, В12, С, Д, каротиноиды, минорные биологически активные вещества (БАВ) (например, ресвератрол, карнитин, коэнзим Q10, нуклеотиды) [7-9].

Более 90% ферментных препаратов производится с использованием мутантных и генно-инженерно-модифицированных (ГМ) микроорганизмов. С использованием микробного синтеза производятся пищевые добавки: органические кислоты и их производные (E270, E296, E297, E330—E333, E334—E337, E354, E355-E357, E363, E260, E280, E570, E300-E303); спирты и гликоли (E422, E1520, E1521, E1519); красители (E101, E160a, E160b, E160c, E160d, E161b, E161g, E100, E162, E163, красный рисовый); антиокислители (E307, E308, E309); сахароспирты и их производные (E420, E421, E574—E579, E967, E968); усилители вкуса и аромата - аминокислоты (E620—E625, E640, E960); производные фенолов (E210—E213, E214—E219, E310, E311, E312, E959); нуклеотиды и их производные (E626—E629, E630—E633, E634 и E635); олигопептиды и белки (E957, E951, E962, E234, E235) [10, 11]. Перечень вкусоароматических веществ микробного синтеза включает аминокислоты и их производные, органические кислоты, короткоцепочные жирные кислоты, ванилин, а также вкусоароматические препараты (экстракты) из дрожжеподобных грибов и др. [9].

Вместе с тем, применение технологий микробного синтеза в производстве пищевой продукции связано с определенными рисками для здоровья потребителей. Получены данные о мало изученных потенциально негативных для организма человека эффектах, которые могут иметь место при использовании для экспрессии ДНК-донора векторов вирусов или плазмид бактерий, обладающих антибиотикорезистентностью, патогенностью, токсигенностью, а именно, сенсбилизация организма, возможность накопления в продукции микробного синтеза потенциально токсичных метаболитов (ТМ), ДНК и живых клеток штаммов-продуцентов, для ферментных препаратов - влияние их остаточных количеств в пище на структуру слизистой и микробиоту кишечника [2,3]. В этой связи проведен анализ факторов, связанных с неконтролируемым использованием промышленных штаммов-продуцентов. Установлено, что изменение структуры ДНК в результате мутаций даже у близкородственных штаммов ведет к изменению свойств и спектра продуцируемых этими штаммами изоформ белковых молекул ферментов и других БАВ, и изменению свойств целевых продуктов микробной клетки [15,16].

Выявлены основные потенциальные риски: сенсбилизация организма; высока вероятность попадания в продукцию микробного синтеза потенциально токсичных метаболитов и детерминант антибиотикоустойчивости (АУ), ДНК, РНК и/или живых клеток штаммов-продуцентов; негативное влияние остаточных количеств ферментных препаратов на структуру слизистой и нормофлору кишечника [2, 17-20]. Кроме того, изменение в результате мутаций или рекомбинации генов и/или трансгенеза последовательности нуклеотидов ДНК и РНК таких штаммов обуславливает изменение физико-химических и биологических свойств производимой с их использованием пищевой продукции, в том

числе усилению продукции ими ТМ, детерминант АУ [15-18].

**2. Разработка методологического подхода к порядку разработки требований микробиологической безопасности пищевой продукции, получаемой с использованием микробного синтеза.** Стремительное развитие биотехнологических методов, появление новых технологий изготовления пищевых ингредиентов с использованием ГММ, направленного мутагенезе и при помощи микробного синтеза, потенциальные риски для здоровья человека при потреблении которых недостаточно изучены, обуславливают необходимость актуализации требований к их безопасности и гармонизации с аналогичными требованиями, принятыми на международном уровне и в экономически развитых странах с налаженными отраслями биотехнологических производств, включения их в нормативные и законодательные акты РФ и ЕАЭС.

С учётом этого, стратегия обеспечения безопасности пищевой продукции нового вида, получаемой при помощи микробного синтеза, в первую очередь, в качестве основного требования должна предусматривать комплексную оценку штаммов, включающую: изучение таксономии на уровне род/вид/штамм, фенотипических и генотипических свойств продуцента с применением современных методов генетического анализа; историю безопасного применения; для ГММ также структуру, свойства, стабильность, целевую эффективность всей новой генетической конструкции, включая происхождение и структуру её отдельных элементов, векторов и маркеров, используемых при конструировании. Условием при получении этой информации является использование генотипирования и сравнительного анализа геномов ГММ с не модифицированными предшественниками, которые также требуют усовершенствования в плане повышения научно-методического уровня [17,18, 21].

Используемая в настоящее время методология оценки риска продукции нового вида микробного происхождения, включает оценку безопасности самого продукта и технологического процесса: пути синтеза; характеристика вещества (идентификация, физико-химические свойства, условия стабильности/инактивации); технологическая функция (для ферментов); описание производственного процесса (в.т.ч этапы очистки от клеток и ДНК продуцента); оценку безопасности штамма-продуцента: потенциальная опасность производственного штамма-продуцента (история применения, наличие статуса QPS1); описание генетической модификации штамма-продуцента (штамма-донора, штаммов-реципиентов, генетических вставок); биологических свойств кодируемого протеина (фермента, пептида и др.): потенциальной аллергенности и токсичности (исследования или биоинформатические анализы); экспериментальные исследования токсичности (генотоксичность, цитотоксичность, перроральная тксичность) с определением допустимой суточной дозы (ДСД / ADI); уточнение области применения на основании полученных данных.

**3. Актуализация требований микробиологической безопасности к продукции нового вида.** Для актуализации требований к продукции нового вида: ферментным препаратам, пищевым добавкам, ароматизаторам, производимым с использованием микробного синтеза, на основе проработки аналогичных требований стандартов Комиссии Кодекс Алиментариус (с принятием во внимание европейского санитарного законодательства) [1,2] и в целях гармонизации с международными подходами, разработаны изменения и дополнения в Технический регламент таможенного союза «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологически вспомогательных средств» (ТР ТС 029/2012). В соответствии с этими изменениями актуализированы требования безопасности ферментных препаратов, пищевых добавок и ароматизаторов, производимых с использованием технологических микроорганизмов. Прошедшая государственную регистрацию продукция микробного синтеза нового вида может размещаться на рынках при условии прохождения процедуры оценки ее соответствия (декларирования) установленным требованиям безопасности, в случае представления производителем информации о качестве и безопасности, а также свидетельства государственной регистрации

<sup>1</sup> Qualified Presumption of Safety (QPS) - Квалифицированная презумпция безопасности.

штамма-производителя и пищевого ингредиента. [<http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptehreg/tr/Documents>].

Процедура оценки риска штаммов-производителей нового вида должна включать их идентификацию до вида/штамма по фенотипическим и генотипическим свойствам, в том числе с использованием методов ПЦР анализа и секвенирования ДНК с учетом сведений с учетом сведений, приведенных в международных базах об их таксономической принадлежности и токсигенных свойствах. В процессе оценки безопасности штаммов нового вида, требуется проведение экспериментов *in vivo* и *in vitro* (с использованием культур клеток) по определению их вирулентности, патогенности, способности к диссеминации внутренних органов, аллергенности, генотоксичности, мутагенной активности, а также анализов по выявлению способности у штаммов к продукции метаболитов (токсинов, антибиотиков и др.), оказывающих негативное воздействие на организм, наличие у них детерминант АУ [22,23].

Таким образом, обобщены и проанализированы научные данные о продукции, получаемой путем микробного синтеза с использованием мутантных и ГММ технологических микроорганизмов. Выявлены основные потенциальные риски для здоровья человека при использовании в пищу такой продукции. По результатам информационного анализа правовых актов РФ и ЕАЭС, международных организаций в сфере контроля качества и безопасности пищевой продукции обоснованы требования безопасного использования к пищевой продукции, получаемой с использованием микробного синтеза, к мутантным и ГММ штаммам-производителям.

#### **Заключение**

В представленном исследовании новыми являются следующие положения и результаты: обоснованы и актуализированы нормативные требования микробиологической безопасности к пищевой продукции нового вида, получаемой путем микробного синтеза, к мутантным и ГММ штаммам-производителям, которые включены в проекты Изменений к ТР ТС 029/2012».

#### **Финансирование**

*Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания Минобрнауки РФ № FGMF-2022-0003.*

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### **Список литературы**

1. *Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use //CAC/GL 46-2003, 13 P.; <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>*
2. *Guidance on safety evaluation of sources of nutrients and bioavailability of nutrient from the sources // EFSA J. 2018. Vol. 16,N 6. Article ID 5294. 35 p. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5294.*
3. *van der Vlugt C.J.B. Horizon Scan of Synthetic Biology Developments for Microorganisms with application in the Agri-Food Sector// EFSA Supporting publication 2020:EN-1664, 22 p.; doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1664*
4. *Багрянцева О.В. Пищевые ингредиенты, получаемые микробным синтезом: качество и безопасность// Труды XVIII международной научно-практической конференции «Пища. экология. качество». Краснообск 18-19 ноября 2021 г., с.54-58 ISBN-978-5-6047430-2-7*
5. *Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyama SB, Abraham A, Mathew AK, Madhavan A, Rebello S, Pandey A. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. Food Technol Biotechnol. 2018; 56(1):16-30. doi: 10.17113/ftb.56.01.18.5491.*
6. *Ladics G.S., Sewalt V.J. Industrial microbial enzymes safety: what does the weight-of-evidence indicate? Regul. Toxicol. Pharmacol., 98 (2018), pp. 151-154 <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.07.016>*



7. Kallscheuer N. *Engineered Microorganisms for the Production of Food Additives Approved by the European Union-A Systematic Analysis*. *Front Microbiol.* 2018 Aug 3;9:1746. doi: 10.3389/fmicb.2018.01746. PMID: 30123195; PMCID: PMC6085563.
8. *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition), 1st Edition. Ed.: McNeil B., Archer D., Giavasis I., Harvey L. ISBN-10 : 0857093436. 2013. 656 p.
9. Багрянцева О.В. Обоснование необходимости разработки мероприятий по управлению рисками, связанными с использованием пищевой продукции, производимой при помощи микробного синтеза// *Вопросы питания*. 2020. Том 89. № 2. С. 64–76. doi: 10.24411/0042-8833-2020-10017
10. Kallscheuer N. *Engineered Microorganisms for the Production of Food Additives Approved by the European Union-A Systematic Analysis*. *Front Microbiol.* 2018; 9:1746. doi: 10.3389/fmicb.2018.01746
11. Шатров Г. Н., Багрянцева О. В., Хотимченко С. А., Семенова П. А. Принципы безопасного использования пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств.: *Пищевые ингредиенты в продуктах питания: от науки к технологиям /под ред. В. А. Тутельяна, А. П. Нечаева, М. Г. Балыхина. 2-е изд., испр. и доп.* М.: МГУПП, 2021. 664 с. ISBN 978-5-9920-0377-2, стр. 91-144
12. de Benito A., Ibáñez Cl., Moncho W., Martínez D., Vettorazzi A., de Cerain A. L. *Database on the taxonomical identification and potential toxigenic capacities of non-QPS*. 2017. [Data set]. Zenodo. <http://doi.org/10.5281/zenodo.827184>
13. Ladics G.S., Sewalt V.J. *Industrial microbial enzymes safety: what does the weight-of-evidence indicate?* *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 98 (2018), pp. 151-154 <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.07.016>
14. Olempska-Beer Z.S. et al. *Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45 (2006) 144–158. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.05.001/>
15. Ding Wentao, Zhang Y., and Shi Sh. *Development and Application of CRISPR/Cas in Microbial Biotechnology*// *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, V. 8, Article 711, 22 p.; doi: 10.3389/fbioe.2020.00711
16. Zhang Z., Liu L., Liu C. et al. *New aspects of microbial vitamin K2 production by expanding the product spectrum*// *Microb Cell Fact* (2021) 20:84 <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01574-7>
17. More S., Bampidis V., Benford D. et al. *Evaluation of existing guidelines for their adequacy for the microbial characterisation and environmental risk assessment of microorganisms obtained through synthetic biology*// *EFSA Journal*, 2020;18(10):6263, 50 p.; doi: 10.2903/j.efsa.2020.6263
18. Allende A., Bolton D. et al. *Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 7: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2017*. *EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards)* // *EFSA J.* 2018a. Vol. 16. P. 43. URL: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5131>
19. Silano V, Barat Baviera JM, Bolognesi C, et al. *Statement on the characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes*. *EFSA CEP Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids)*// *EFSA Journal* 2019;17(6):5741, 13 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5741>
20. *Analysis of JECFA’s draft guideline on “Evaluation of enzyme preparations used in the manufacture of foods”*// *EFSA Supporting publication* 2020:EN-1795.-8pp. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1795
21. *Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use* // *EFSA Journal*.-V. 2011; V.9(6):2193; <http://www.efsa.europa.eu/>
22. Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordóñez A. et al. *Update of the list of QPS-*

*recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020 journal //EFSA Journal 2020;18(7):6174, 42 p.; doi: 10.2903/j.efsa.2020.6174*

23. Багрянцева О.В., Шевелева С.А. Вопросы обеспечения безопасного использования технологических микроорганизмов в пищевой промышленности// «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Материалы Междунар. конференции NT + M&E`2020, Весенняя сессия, Гурзуф, 31 мая-10 июня 2021 г., с.198-205
24. Багрянцева О.В., Гмошинский И.В., Шипелин В.А. с соавт. Оценка рисков для здоровья ферментного препарата - комплекса глюкоамилазы и ксиланазы из *Aspergillus awamori* Xyl T-15 // Вопросы питания. 2021. Т. 90, № 3. С. 28-39. DOI: <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-3-28-39>

#### Сведения об авторах

**Людмила Павловна Минаева,**  
к.т.н., старший научный сотрудник  
ФГБУН Федеральный исследовательский  
центр питания, биотехнологии и безопасно-  
сти пищи  
Москва, Россия  
Устьинский пр-д, д.2/14, Россия  
<http://www.ion.ru/>  
Эл. почта: [liuminaeva-ion@mail.ru](mailto:liuminaeva-ion@mail.ru)

**Ольга Викторовна Багрянцева,**  
д.б.н., ведущий научный сотрудник  
ФГБУН Федеральный исследовательский  
центр питания, биотехнологии и безопасно-  
сти пищи  
Москва, Россия  
Устьинский пр-д, д.2/14, Россия  
<http://www.ion.ru/>  
Эл. почта: [bagryantseva@ion.ru](mailto:bagryantseva@ion.ru)

**Шевелева Светлана Анатольевна,**  
д.м.н., заведующий лабораторией  
ФГБУН Федеральный исследовательский  
центр питания, биотехнологии и безопасно-  
сти пищи  
Москва, Россия  
Устьинский пр-д, д.2/14, Россия  
<http://www.ion.ru/>  
Эл. почта: [sheveleva@ion.ru](mailto:sheveleva@ion.ru)

#### Information about authors

**Lyudmila Pavlovna Minaeva,**  
PhD in Technical Sciences, Senior researcher of the labora-  
tory of biosafety and nutr microbiome analysis, Federal Re-  
search Centre of Nutrition and Biotechnology  
Moscow, Russia  
Ustinskiy proezd, 2/4  
<http://www.ion.ru/>  
E-mail: [liuminaeva-ion@mail.ru](mailto:liuminaeva-ion@mail.ru)

**Olga V. Bagryantseva,**  
Dr. of Biological science, Leading Researcher, Laboratory of  
Food Toxicology and Safety of Nanotechnologies, Federal  
State Budgetary Institution of Science "Federal Research  
Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety",  
Moscow, Russia  
Ustinskiy proezd, 2/4,  
<http://www.ion.ru/>  
E-mail: [bagryantseva@ion.ru](mailto:bagryantseva@ion.ru)

**Svetlana A. Sheveleva**  
Dr. of Medical Sciences, head of the laboratory of biosafety  
and nutr microbiome analysis, Federal Research Centre of  
Nutrition and Biotechnology,  
Moscow, Russia  
Ustinskiy proezd, 2/4,  
<http://www.ion.ru/>  
E-mail: [sheveleva@ion.ru](mailto:sheveleva@ion.ru)

УДК 591.826:636.4:575.113  
ГРНТИ 34.01, 68.39.35, 34.23.59  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.30-39

Е. А. Котенкова, В. А. Пчелкина, И. М. Чернуха  
ФГБНУ «Федеральный науч-  
ный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

## АДАПТАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЖИРОВОЙ ТКАНИ СВИНЕЙ И ПОИСК ГЕНОВ, НАХОДЯЩИХСЯ ПОД ДАВЛЕНИЕМ ОТБОРА, НА ПРИМЕРЕ КОММЕРЧЕСКОЙ ПОРОДЫ ДЮРОК

В статье обсуждаются результаты гистологического анализа образцов жира различной локализации, полученных от свиней породы дюрок. Было обнаружено наличие нетипичных адипоцитов в определенных локализациях, что вносит вклад в понимание процессов адаптивного термогенеза у свиней. Генетический анализ показал наличие ряда генов, вовлеченных в адипогенез, формирование качественных признаков у мясного сырья

и адаптацию к климатическим условиям, в том числе экстремальным.

**Ключевые слова:** жировая ткань, адипоцит, гистология, морфометрия, гены.

Е. А. Kotenkova, V. A. Pchelkina, I. M. Chernukha  
ФГБНУ «Федеральный научный  
центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

## ADAPTIVE FEATURES OF ADIPOSE TISSUE FORMATION IN PIGS OF THE COMMERCIAL DUROC BREED AND THE SEARCH FOR GENES UNDER SELECTION PRESSURE

*The paper discusses the results of histological analysis of fat samples of various localization obtained from Duroc pigs. The presence of atypical adipocytes in certain localities was found, which contributes to the understanding of the processes of adaptive thermogenesis in pigs. Genetic analysis showed the presence of a number of genes involved in adipogenesis, the formation of qualitative characteristics in meat raw materials and adaptation to climatic conditions, including extreme ones.*

**Keywords:** adipose tissue, adipocyte, histology, morphometry, genes.

### Введение

Жировая ткань представляет собой форму соединительной ткани, клетки которой заполнены жировой каплей [1], она распределена по всему организму и играет ключевую роль в энергетическом гомеостазе организма в качестве липидного резервуара, адипоциты также эндокринологически активны, особенно висцеральные [2,3].

Изначально жировая ткань млекопитающих была разделена на два типа: белую жировую ткань (*white adipose tissue (WAT)*) и коричневую (бурую) жировую ткань (*brown adipose tissue (BAT)*), основываясь на ее цвете и различных физиологических функциях [4]. *WAT* содержится в наибольшем количестве, функционально служит основным энергетическим депо, характеризуется также эндокринной функцией и обеспечивает механическую защиту мышц и внутренних органов, а также играет важную роль в сохранении температуры тела. Количество *BAT* существенно ниже, ее рассматривают как термогенную ткань, однако, она также обладает и эндокринной функцией [2,4,5]. Бежевая жировая ткань (*BeAT*) является третьим типом жировой ткани и образуется в результате “потемнения” *WAT*, когда коричневые адипоциты появляются в анатомических участках, характерных для *WAT* [6]. Первоначально предполагалось, что *BeAT* возникает в ответ на воздействие холода; однако впоследствии выяснилось, что такие факторы, как диета, физическая активность, пре- и пробиотики, фармацевтические и растительные вещества и т.д., также могут вызывать “потемнение” *WAT* [7].

Состояние здоровья, выживаемость потомства, качество продуктов переработки свиней в значительной степени зависят от соотношения всех трех типов жировой ткани. Белок *UCP1 (Uncoupling protein 1)* – это уникальный митохондриальный мембранный белок адаптивного термогенеза – специализированной функции, выполняемой коричневыми адипоцитами [8]. Ограниченный интерес к *BAT* и *BeAT* у свиней объясняется тем, что *UCP1* отсутствует у свиней в результате генетического события, которое уничтожило экзоны 3-5~20 миллионов лет назад [9-11]. Однако существуют публикации о наличии у некоторых хладостойких пород свиней гомолога *UCP1 – UCP3*, механизм вовлеченности которого в адаптивный термогенез уточняется и по сей день. Кроме того, у свиней этих пород наблюдалось “потемнение” *WAT* в определенных локализациях (в нижней части под шеей, а также в подмышечной и периренальной *WAT*) в ответ на воздействие холода и других факторов [9,12].

### Цель работы

В этой связи целью работы являлось гистологическое изучение жировой ткани различной локализации у свиней породы дюрок, а также поиск генов, вовлеченных в адипоцитогенез или адаптивные механизмы.

**Материалы и методы**

*Микроструктурные исследования.* Были отобраны образцы бокового шпика (на уровне *processus xiphoides*, БШ), хребтового шпика (на уровне 10-11 грудных позвонков, ХШ), жир с крестца (каудальнее крестца, КШ), которые характеризовались от белого до бледно-розового цвета, мягкой консистенции, без запаха, в области *m. masseter* с вентро-латеральной стороны (ПУ), внутренний подмышечный (ВП), внутренний околопочечный (ВО).

Для исследования морфологических характеристик жировой ткани получали желатиновые срезы. Для получения желатиновых срезов от зафиксированных в формалине образцов отбирали кусочки размером 1,5x1,5x0,5см, промывали холодной проточной водой в течение 4 часов. Далее уплотняли в желатине по восходящей концентрации (12,5 %, 25 %) (*AppliChem GMBH*, Германия) при температуре 37 °С в течение 8 часов в каждом с использованием термостата (СПУ, Россия). Изготовление срезов толщиной 14 мкм осуществляли на криостатате «*MIKROM-HM525*» (*Thermo Scientific*). Полученные срезы монтировали на стекла *Menzel-Glaser* (*Thermo Scientific*) и окрашивали гематоксилином Эрлиха и 1%-ым водно-спиртовым раствором эозина (*BioVitrum*) по общепринятой методике (гематоксилин Эрлиха, 10 мин; промывка водопроводной водой; 1% раствор соляной кислоты, неск сек до розоватого оттенка; промывка водопроводной водой; 1% раствор *NH<sub>4</sub>OH*, неск сек до посинения срезов; промывка водопроводной водой; 1% эозин, 1 мин; промывка водопроводной водой. Окрашенные срезы заключали в глицерин-желатин (1:1) под покровное стекло. Изучение гистологических препаратов и их фотографирование осуществляли на световом микроскопе «*AxioImager A1*» (*Carl Zeiss*, Германия) с помощью подключенной видеокамеры «*AxioCam MRc 5*». Обработку изображений производили с применением компьютерной системы анализа изображений «*AxioVision 4.7.1.0*» (*Carl Zeiss*), адаптированной для гистологических исследований. Площадь адипоцитов на желатиновых срезах измеряли в интерактивном режиме, подсчитывали площадь 400 клеток для каждого образца.

*Генетические исследования* были выполнены на базе научной инфраструктуры ОНИС БиоТехЖ. Материалом для исследований являлись образцы биоматериала (ушной выщип) свиней породы дюрок ( $n = 36$ ). Выделение ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора «ДНК-Экстран-2» (ЗАО «Синтол», г. Москва), в соответствии с протоколом выделения, представленного фирмой-производителем. Для оценки качества полученных препаратов ДНК выполняли измерение концентраций двухцепочечной ДНК с помощью флуориметра *Qubit™ (1.0)* (*Invitrogen, Lifetechnologies*, США) и определение чистоты препаратов ДНК посредством определения отношения степени поглощения препаратов ДНК при 260 и 280 нм на приборе *NanoDrop 8000* (*Thermo Scientific*, США).

Полногеномное генотипирование выполняли с использованием ДНК-чипа высокой плотности *Porcine GGP HD BeadChip* (*Illumina Inc., USA*), содержащего ~80 тыс. *SNP*. Была дополнена выборка свиней породы дюрок, полногеномные генотипы были предоставлены ОНИС БиоТехЖ. Контроль качества и фильтрацию данных генотипирования для каждого *SNP* и каждого образца выполняли с использованием программного пакета *PLINK 1.9* (<http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>). Количество *SNP*, прошедших фильтрацию, составило 53263 *SNP*. Кроме того, проводили оценку неравновесного сцепления исследуемых *SNP* (*LD* оценка). Количество *SNP*, прошедших *LD*-фильтр, составило 24861. По результатам контроля качества для исследований было отобрано 50 голов свиней. На основании полученных *SNP*-генотипов в *R* пакете *diversity* [13] проводили расчет следующих популяционно-генетических параметров: наблюдаемая (*Ho*) гетерозиготность, несмещенная ожидаемая гетерозиготность (*uHe*), аллельное разнообразие (*Ar*), коэффициент инбридинга *Fis* (с доверительным интервалом 95 %).

Для поиска локусов, находящихся под давлением отбора, использовали различные методы: расчет *FST* для каждого *SNP* при парном сравнении пород, идентификацию островков *ROH*, перекрывающихся у различных животных внутри каждой из пород, и анализ *hapFLK*. *LD*-фильтр не применяли. Генетическая дифференциация, основанная на

попарных значениях *FST* [14], была рассчитана между всеми *SNP* с использованием *PLINK 1.9*, использовали низкий порог для частоты минорных аллелей (*MAF*) менее 5% ( $-\text{maf } 0.05$ ). Согласно [15-16], *SNP*, входящие в 0.1% по значению *FST*, представляли отпечатки селекции. Для определения пробега гомозиготности (*ROH*) был использован метод последовательной детекции *SNP*, реализованный в R пакете *detectRUNS* [17]. Для исключения недооценки числа *ROH* длиной более 8 Mb было допущено наличие одного *SNP* с отсутствующим генотипом и не более одного возможного гетерозиготного генотипа [18]. Вследствие наличия сильного неравновесного сцепления (*LD*) на расстоянии до 100 kb, для исключения общих *ROH*, был установлен порог минимальной длины для одного *ROH* на уровне 500 kb. Для минимизации ложноположительных результатов рассчитали минимальное число *SNP*, как было предложено [19-20], минимальное число *SNP* составило 23. Были определены количество и длина *ROH* для каждого индивидуума и затем рассчитано среднее значение, коэффициент геномного инбридинга на основе *ROH* (*FROH*) как отношение суммы длины всех *ROH* в расчете на животное, к общей длине аутосомального генома, покрытого *SNP coverage* (2,449 Gb). Для свиней коммерческих пород, характеризующихся более высоким уровнем инбридинга, был установлен порог 70%. Был установлен порог 0,3 Mb в качестве минимальной длины перекрывающихся сегментов. Для определения отпечатков селекции посредством дифференциации гаплотипов было использовано программное обеспечение *hapFLK 1.4 program* [21]. Количество кластеров гаплотипов на хромосому, рассчитанное в *fastPHASE* посредством кросс-валидации, было установлено на уровне 35 [22]. Для детального анализа были отобраны регионы *hapFLK*, содержащие хотя бы один *SNP*с пороговым значением (*p*) менее 0.01 ( $-\log_{10}(p) > 2$ ).

Для выявления генов-кандидатов в участках генома, находящихся под действием возможного отбора, использовали геномную локализацию регионов, установленную по результатам анализа с использованием трех различных методов (*FST*, *ROH* и *hapFLK*). В качестве приоритетных были выбраны регионы, которые были идентифицированы, по крайней мере, двумя различными методами. Границы этих регионов, указанные в соответствии со сборкой генома 10.2, были конвертированы в сборку генома 11.1 и использованы для идентификации генов свиней с использованием веб-ресурса *Ensembl Genes release 103 database* [23]. Для функциональной аннотации генов было использовано программное обеспечение *DAVID* [24]. Биоинформационную обработку данных и работу с рисунками (графиками) проводили с помощью программной среды *R* [25].

**Статистический анализ.** Для расчетов использовали программу *STATISTICA 10*, результаты представлялись в виде «*Mean*» и [*MIN MAX*]. или «*Mean ± SE*» и [*MIN MAX*]. Статистическую достоверность рассчитывали с применением непараметрического критерия *U* Манна-Уитни (для двух независимых групп). Вероятность 0,05 была выбрана в качестве значимого уровня.

### Полученные результаты

Гистологический анализ образцов жира различной локализации выявил, что во всех исследуемых образцах адипоциты представлены в виде полигональных клеток, со скругленными краями. При этом адипоциты внутреннего жира (ВП, ВО) характеризуются более округлой формой. Центральную часть клетки занимает крупная жировая капля, ядро смещено к периферии клетки, имеет овальную форму и хорошо дифференцируется на препарате. Строение клеток характерно для зрелых белых адипоцитов.

Морфометрические измерения показали, что для БШ площадь адипоцитов составила 3826,67 [2543,45-5169,68] мкм<sup>2</sup>, ХШ – 4253,49 [2943,59-5615,82] мкм<sup>2</sup>, КШ – 3569,11 [2485,50-4901,08] мкм<sup>2</sup>, ПУ – 4540,49 [3153,32-6100,59] мкм<sup>2</sup>, ВО – 4187,26 [2899,44-5600,18] мкм<sup>2</sup>, ВП – 3867,14 [2710,86-5051,94] мкм<sup>2</sup>. Наибольшими размерами, как и предполагалось, характеризовались адипоциты ХШ, их площадь превышала площадь адипоцитов БШ и КШ в среднем на 11,1% и 19,2% ( $p \leq 0,0001$ ), и ПУ – площадь адипоцитов увеличивалась до 20% относительно БШ и КШ.

В образцах внутреннего подмышечного (ВП) жира, обнаружены единичные адипоциты полигональной формы, имеющие округлое ядро, находящееся ближе к центру клетки, в цитоплазме которых присутствуют несколько жировых капель различного размера (диаметром от 3 до 20 мкм). Такое строение клеток характерно для бежевых адипоцитов (Рисунок 1). Площадь бежевых адипоцитов была меньше площади белых, и составляла в среднем  $2217,468 \pm 278,395$  мкм<sup>2</sup>. Количество таких клеток в образцах ВП достигало 2-3 шт на 400 клеток.

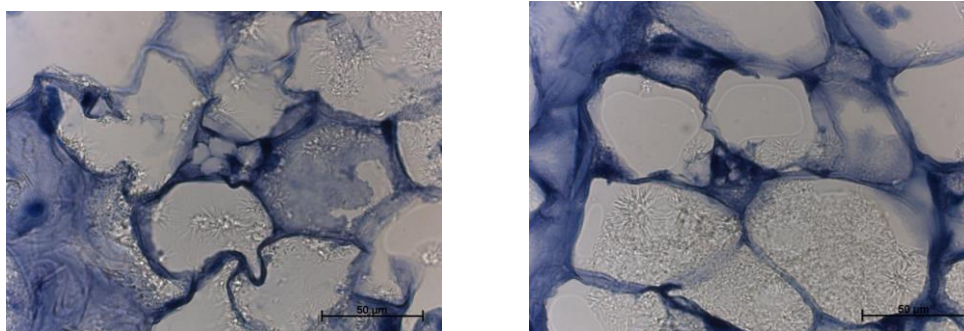


Рисунок 1. Клетки бежевого адипоцита в образце внутреннего подмышечного жира, окраска гематоксилин-эозином (об. х63).

Характеристика генетического разнообразия породы дюрок представлена в Таблице 1. Был выявлен незначительный избыток гетерозигот по сравнению с ожидаемым их числом.

<i>n</i>	<i>Ar</i>	<i>Ho</i>	<i>uHe</i>	<i>uFis</i>
50	$1.894 \pm 0.00$ 2	$0.325 \pm 0.0$ 01	$0.319 \pm 0.0$ 01	-0.016 [-0.018; -0.014]

Таблица 1. Характеристика генетического разнообразия породы дюрок.

Примечание: *n* – число животных, использованных в анализе, *Ar* – аллельное разнообразие, *Ho* – наблюдаемая гетерозиготность, *uHe* – несмещенная ожидаемая гетерозиготность, *uFis* – несмещенный индекс фиксации.

Характеристика пробегов гомозиготности (*ROH*) показана в Таблице 2. Весомое число *ROH* (304,18) и покрытие генома сегментами *ROH* (955,34 Mb) было выявлено у свиней породы дюрок. По всей видимости, это связано с высокой жесткостью отбора у свиней этой породы по очень ограниченному числу признаков (среднесуточный прирост живой массы, толщина шпика, площадь мышечного глазка). Свиньи этой породы характеризовались высоким значением геномной степени инбридинга, рассчитанной по *ROH* (0,390).

Количество <i>ROH</i>			Длина <i>ROH</i> , Mb			<i>FROH</i>		
<i>M</i> ± <i>SE</i>	<i>MIN</i>	<i>MAX</i>	<i>M</i> ± <i>SE</i>	<i>MIN</i>	<i>MAX</i>	<i>M</i> ± <i>SE</i>	<i>MIN</i>	<i>MAX</i>
$304.18 \pm 2.41$	263	343	$955.34 \pm 10.19$	811.45	1171.04	$0.390 \pm 0.004$	0.33	0.48

Таблица 2. Описательная статистика пробегов гомозиготности (*ROH*).

По результатам поиска отпечатков селекции тремя методами для структурной и функциональной аннотации были выбраны 11 регионов, специфических для свиней породы дюрок. Аннотация идентифицированных участков генома показала наличие 228 генов, локализованных в регионах, специфических для свиней породы дюрок. Анализ генов показал достоверное обогащение анализируемого списка генами, относящимися к семейству рецептора интерлейкина 1 (*IPR015621: Interleukin-1 receptor family*, *P*-значение для модифицированного точного теста Фишера =  $5,19 \times 10^{-5}$ , *P*-значение, скорректированное по методу *Benjamini-Hochberg*, = 0,020). Детальный анализ молекулярных функций отдельных генов показал их участие в регуляции роста и развития (*AGR2*, *CCM2*), процессах регуляции актина (*FRMD6*, *NCK2*, *SCIN*, *SORBS1*, *TEK*), биосинтезе

аминокислот (*ALDH18A1*, *ASNS*), биосинтезе и метаболизме жирных кислот (*CH25H*, *CROT*), формировании костной ткани (*FHL2*), процессах превращения глюкозы, в том числе по метаболическому пути превращения инсулина (*ADCY1*, *CAMK2B*, *IDE*, *GCK*, *NID2*, *PDE6C*, *PDK4*, *PAX6*, *PYGL*, *SORBS1*, *SOS2*), пигментации (*EDAR*).

По результатам детализированного литературного поиска идентифицированных генов у свиней породы дюрок в сравнении в том числе с другими млекопитающими и человеком, было обнаружено, что ряд генов вовлечен в метаболизм глюкозы и липидов, влияет на адипогенез (*AICF*, *ABCA1*, *ADCY1*, *PRKG1*, *AGR2*, *CDKN2B*, *AHR*, *AKAP9*, *TAC1*, *ARID5A*, *ADAM23*, *EXOC6*, *ASB4*, *CCDC171*, *THSD7A*, *CDCA7L*, *CDK14*, *CDK6*, *GLIS3*, *NOC3L*, *SH3RF3*, *SUV39H2*, *NID2*, *CH25H*, *CROT*, *CYP2C42*, *CYP51A1*, *HDAC9*, *MARCHF5*, *NDUFS1*, *NFIB*, *P14ARF*, *LIPA*, *PDE6C*, *PLCE1*, *SP4*, *PDK4* и др.). *GCK* участвует в клеточном гомеостазе глюкозы и увеличен у свиней с более высокой толщиной шпика [26], *DGKB* участвует в отложении жира у свиней [27], *ELP4* ассоциирован с ожирением и толщиной шпика у свиней породы Йоркшир [28,29], а *RUNDC3B* рассматривается как ген, связанный с формированием шпика [30], а *ZMIZ2* может быть связан с толщиной шпика [31]. *PYGL* вовлечен в углеводный обмен и гомеостаз глюкозы, играет важную роль в метаболизме гликогена во время дифференцировки бурых адипоцитов [32]. *OGDH* и *PANK1* участвуют в производстве тепла в бежевой/бурой жировой ткани и в дифференциации бежевых адипоцитов [33,34], в то время как *SLC16A12* преимущественно экспрессируется в белых адипоцитах, что может сделать его их маркером [35,36]. Было выявлено значительное количество генов, участвующих в формировании мышечных волокон, признаках качества мяса, которые также вовлечены в адипогенез или метаболизм глюкозы (*PTPRD*, *SORBS1*, *ALDH18A1*, *CALCR*, *COL1A2*, *COL28A1*, *FHL2*, *FOCAD*, *NCK2*, *SOS2*, *FRMD6*, *ITGA8*, *ITGB8*, *TEK*, *SCIN*, *SEPT10*, *SGCE*, *MYO1G*, *SMC2*, *TGFBRAP1*, *RAPGEF5*, *TMX 1* и др.). Гены, связанные с окислением (*PON2* и *PON3*), воспалением и иммунитетом (*MERTK*, *IL18R1*, *IL1R1*, *IL1R2*, *IL33*, *PIK3AP1*), были обнаружены у породы дюрок, но некоторые из них также были связаны с жировой тканью. *IL33* поддерживает иммунный гомеостаз в жировой ткани, его отсутствие приводит к нарушению несвязанного дыхания и терморегуляции, что особенно важно в перинатальный период [37,38].

Были обнаружены гены, связанные с адаптацией. *TBC1D12* связан адаптацией к температуре и солнечному свету, является сильным геном-кандидатом для отбора в ответ на стресс окружающей среды и климатические условия [39-42]. Положительный отбор по гену *ZDBF2* связан с некоторыми еще неизвестными физиологическими или иммунологическими адаптациями животных к низким температурам в арктических или антарктических условиях [43,44]. *ZDBF2*, по-видимому, является геном, стимулирующим рост, регулирует контроль кормления и роста новорожденных [45,46]. *ZNF804B* связан с селективной адаптацией у крупного рогатого скота и может быть важен для локальной адаптации у овец [47].

### Выводы

Таким образом, систематизируя полученные результаты, важно отметить, что бежевые адипоциты были найдены в мышечной области свиней породы дюрок, что соответствует литературным источникам. Кроме того, анализ, в том числе и литературный, показал наличие ряда генов, вовлеченных в адипогенез, формирование качественных признаков у мясного сырья и адаптацию к климатическим условиям, в том числе экстремальным. Интересным и перспективным может стать поиск выявленных генов и определение новых генов у свиней локальных пород для выяснения их приспособленности к выгульному содержанию. Наличие этих признаков способствует развитию органического свиноводства.

### Заключение

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



результаты: обнаружение клеток бежевых адипоцитов в жировой ткани определенной локализации у свиней породы дюрок заслуживают пристального внимания, как и выявление ряда генов, вовлеченных в метаболизм глюкозы и липидов, адипогенез, в формировании мышечных волокон, признаках качества мясного сырья, особенно интересным является обнаружение генов, связанных с адаптацией, в том числе к температурным условиям.

#### **Благодарности**

*Выражаем благодарность ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста за проведение генетических исследований на базе научной инфраструктуры ОНИС БиоТехЖ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №21-76-20032.*

#### **Список литературы**

1. Rosen E.D., Spiegelman B.M. What we talk about when we talk about fat // *Cell*. 2014. No.156(1-2). P. 20-44.
2. Choe S.S., Huh J.Y., Hwang I.J., Kim J.I., Kim J.B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders // *Frontiers in endocrinology*. 2016. V. 7. article 30.
3. McNamara J.P., Huber K. Metabolic and Endocrine Role of Adipose Tissue During Lactation // *Annual Review of Animal Biosciences*. 2018. No. 6(1). P.177-195.
4. Richard A.J., White U., Elks C.M., Stephens J.M. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. [Updated 2020 Apr 4]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Электронный ресурс]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/>
5. Scheja L., Heeren J. Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver // *Journal of Hepatology*. 2016. No. 64(5). P. 1176-1186.
6. Giralt M., Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? // *Endocrinology*. 2013. No. 154(9). P. 2992-3000.
7. Pilkington A.C., Paz H.A., Wankhade U.D. Beige Adipose Tissue Identification and Marker Specificity-Overview // *Frontiers in endocrinology*. 2021. V. 12. Article 599134.
8. Ricquier D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective // *Frontiers in endocrinology*. 2011. V. 2. article 85.
9. Lin J., Cao C., Tao C., Ye R., Dong M., Zheng Q., et al. Cold adaptation in pigs depends on UCP3 in beige adipocytes // *Journal of Molecular Cell Biology*. 2017. No. 9(5). P. 364-375.
10. Fyda T.J., Spencer C., Jastroch M., Gaudry M.J. Disruption of thermogenic UCP1 predated the divergence of pigs and peccaries // *The Journal of Experimental Biology*. 2020. No. 223(Pt 15). article jeb223974.
11. Jastroch M., Andersson L. When pigs fly, UCP1 makes heat // *Molecular Metabolism*. 2015. No. 4(5). P. 359-362.
12. Zhao J., Tao C., Chen C., Wang Y., Liu T. Formation of thermogenic adipocytes: What we have learned from pigs // *Fundamental Research*. 2021. No.1(4). P. 495-502.
13. Keenan K., McGinnity P., Cross T.F., Crozier W.W., Prodöhl P.A. diveRcity: an R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors // *Methods in Ecology and Evolution*. 2013. No. 4(8). P. 782-788.
14. Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure // *Evolution*. 1984. No. 38(6). P. 1358-1370.
15. Kijas J.W., Lenstra J.A., Hayes B., Boitard S., Porto Neto L.R., San Cristobal M., et al. International Sheep Genomics Consortium Members. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection // *PLOS Biology*. 2012. No. 10(2). article e1001258.
16. Zhao F., McParland S., Kearney F., Du L., Berry D.P. Detection of selection signatures in dairy and beef cattle using high-density genomic information // *Genetics Selection Evolution*. 2015. No. 47(1). article 49.



17. *Biscarini F., Paolo Cozzi P., Gaspa G., Marras G. detectRUNS: Detect runs of homozygosity and runs of heterozygosity in diploid genomes. R package version 0.9.5. Режим доступа: <https://cran.r-project.org/web/packages/detectRUNS/index.html>.*
18. *Ferenčaković M., Sölkner J., Curik, I. Estimating autozygosity from high-throughput information: effects of SNP density and genotyping errors // Genetics Selection Evolution. 2013. V. 45. article 42.*
19. *Lencz T., Lambert C., DeRosse P., Burdick K.E., Morgan T.V., Kane J.M., et al. Runs of homozygosity reveal highly penetrant recessive loci in schizophrenia // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007. No. 104(50). P. 19942–19947.*
20. *Purfield D.C., Berry D.P., McParland S., Bradley D.G. Runs of homozygosity and population history in cattle // BMC Genomics. 2012. V. 13. P. 70.*
21. *Fariello M.I., Boitard S., Naya H., SanCristobal M., Servin, B. Detecting signatures of selection through haplotype differentiation among hierarchically structured populations // Genetics 2013. No. 193(3). P. 929–941.*
22. *Scheet P., Stephens M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase // American Journal of Human Genetics. 2006. No. 78(4). P. 629–644.*
23. *Kinsella R.J., Kähäri A., Haider S., Zamora J., Proctor G., et al. Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space // Database. 2011. V. 2011. article. bar030.*
24. *Huang D., Sherman B., Lempicki R. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources // Nature Protocols. 2009. No. 4(1). P. 44–57.*
25. *R Core Team (2018). R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. Режим доступа: <https://www.R-project.org/>.*
26. *Xing K., Zhao X., Ao H., Chen S., Yang T., et al. Transcriptome analysis of miRNA and mRNA in the livers of pigs with highly diverged backfat thickness // Scientific Reports. 2019. No. 9(1). article. 16740.*
27. *Xing K., Wang K., Ao H., Chen S., Tan Z., et al. Comparative adipose transcriptome analysis digs out genes related to fat deposition in two pig breeds // Scientific Reports. 2019. No. 9(1). article. 12925.*
28. *Voisin S., Almén M.S., Zheleznyakova G.Y., Lundberg L., Zarei S., et al. Many obesity-associated SNPs strongly associate with DNA methylation changes at proximal promoters and enhancers // Genome Medicine. 2015. V. 7. article 103.*
29. *Chen D., Wu P., Yang Q., Wang K., Zhou J., et al. Genome-wide association study for backfat thickness at 100 kg and loin muscle thickness in domestic pigs based on genotyping by sequencing // Physiological Genomics. 2019. No. 51(7). P. 261-266.*
30. *Yang B., Bassols A., Saco Y., Pérez-Enciso M. Association between plasma metabolites and gene expression profiles in five porcine endocrine tissues // Genetics Selection Evolution. 2011. No. 43(1). article 28.*
31. *Srikanth K., Lee S.-H., Chung K.-Y., Park J.-E., Jang G.-W., et al. A Gene-Set Enrichment and Protein–Protein Interaction Network-Based GWAS with Regulatory SNPs Identifies Candidate Genes and Pathways Associated with Carcass Traits in Hanwoo Cattle // Genes. 2020. No. 11(3). article. 316.*
32. *Mayeuf-Louchart A., Lancel S., Sebti Y., Pourcet B., Loyens A., et al. Glycogen Dynamics Drives Lipid Droplet Biogenesis during Brown Adipocyte Differentiation // Cell Reports. 2019. No. 29(6). P. 1410-1418.e6.*
33. *Milet C., Bléher M., Allbright K., Orgeur M., Couplier F., et al. Egr1 deficiency induces browning of inguinal subcutaneous white adipose tissue in mice // Scientific Reports. 2017. V. 7. article. 16153.*
34. *Kiskinis E., Chatzeli L., Curry E., Kaforou M., Frontini A., et al. RIP140 represses the "brown-in-white" adipocyte program including a futile cycle of triacylglycerol breakdown and synthesis // Molecular Endocrinology. 2014. No. 28(3). P. 344-356.*
35. *Roh H.C., Tsai L.T.Y., Shao M., Tenen D., Shen, Y., et al. Warming Induces Significant*

- Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity // *Cell Metabolism*. 2018. No. 27(5). P. 1121-1137.e5.
36. *Kärst S., Arends D., Heise S., Trost J., Yaspo M.L., et al.* The direction of cross affects [corrected] obesity after puberty in male but not female offspring // *BMC Genomics*. 2015. V. 16. article. 904.
37. *Mahlakõiv T., Flamar A.L., Johnston L.K., Moriyama S., Putzel G.G., et al.* Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33 // *Science Immunology*. 2019. No. 4(35). article. eaax0416.
38. *Odegaard J.I., Lee M.W., Sogawa Y., Bertholet A.M., Locksley R.M., et al.* Perinatal Licensing of Thermogenesis by IL-33 and ST2 // *Cell*. 2016. No. 166(4). P. 841-854.
39. *Yurchenko A.A., Deniskova T.E., Yudin N.S., Dotsev A.V., Khamiruev T.N., et al.* High-density genotyping reveals signatures of selection related to acclimation and economically important traits in 15 local sheep breeds from Russia // *BMC Genomics*. 2019. V. 20. article. 294.
40. *Lv F.H., Agha S., Kantanen J., Colli L., Stucki S., et al.* Adaptations to climate-mediated selective pressures in sheep // *Molecular Biology and Evolution*. 2014. No. 31(12). P. 3324-3343.
41. *Kim E.S., Elbeltagy A.R., Aboul-Naga A.M., Rischkowsky B., Sayre B. et al.* Multiple genomic signatures of selection in goats and sheep indigenous to a hot arid environment // *Heredity (Edinb)*. 2016. No. 116(3). P. 255-264.
42. *Passamonti M.M., Somenzi E., Barbato M., Chillemi G., Colli L., et al.* The Quest for Genes Involved in Adaptation to Climate Change in Ruminant Livestock // *Animals*. 2021. No. 11(10). article. 2833.
43. *Yudin N.S., Larkin D.M., Ignatieva E.V.* A compendium and functional characterization of mammalian genes involved in adaptation to Arctic or Antarctic environments // *BMC Genomics*. 2017. No. 18(Suppl 1). article. 111.
44. *Freitas P.H.F., Wang Y., Yan P., Oliveira H.R., Schenkel F.S., et al.* Genetic Diversity and Signatures of Selection for Thermal Stress in Cattle and Other Two Bos Species Adapted to Divergent Climatic Conditions // *Frontiers in Genetics*. 2021. V. 12. article. 604823.
45. *Tucci V., Isles A.R., Kelsey G., Ferguson-Smith A.C., Erice Imprinting Group.* Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals // *Cell*. 2019. No. 176(5). P. 952-965.
46. *Glaser J., Iranzo J., Borensztein M., Marinucci M., Gualtieri A., et al.* The imprinted Zdbf2 gene finely tunes control of feeding and growth in neonates // *Elife*. 2022. V. 11. article. e65641.
47. *Kominakis A., Tarsani E., HagerTheodorides A.L., Mastranestasis I., Gkelia D., Hadjigeorgiou I.* Genetic differentiation of mainland-island sheep of Greece: Implications for identifying candidate genes for long-term local adaptation // *PLoS One*. 2021. No. 16(9). article. e0257461.

**Сведения об авторах**

**Елена Александровна Котенкова**

*к.т.н., старший научный сотрудник Экспериментальной  
клиники-лаборатории биологически активных веществ  
животного происхождения  
ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем  
им. В.М. Горбатова» РАН,  
Москва, Россия  
ул. Талалихина, 26  
Эл. почта: lazovlenna92@yandex.ru*

**Information about authors**

**Elena Alexandrovna Kotenkova**

*candidate of technical sciences, senior re-  
searcher in Experimental clinic and research  
laboratory for bioactive substances of animal  
origin, V. M. GorbatoV Federal Research  
Center for Food Systems  
Moscow, Russia  
Talalihina, 26  
E-mail: lazovlenna92@yandex.ru*

**Виктория Александровна Пчелкина**

к.т.н., ведущий научный сотрудник  
Экспериментальной клиники-лаборатории биологически  
активных веществ животного происхождения  
ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем  
им. В.М. Горбатова» РАН,  
Москва, Россия  
ул. Талалихина, 26

Эл. почта: v.pchelkina@fncps.ru

**Ирина Михайловна Чернуха**

д.т.н., проф., академик,  
Руководитель Отдела координации международных и  
инициативных проектов  
ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем  
им. В.М. Горбатова» РАН,  
Москва, Россия  
ул. Талалихина, 26

Эл. почта: imcher@inbox.ru

**Victoriya Alexandrovna Pchelkina**

candidate of technical sciences, leading re-  
searcher scientist in Experimental clinic and  
research laboratory for bioactive substances  
of animal origin, V. M. Gorbatov Federal Re-  
search Center for Food Systems  
Moscow, Russia  
Talalihina, 26

E-mail: v.pchelkina@fncps.ru

**Irina Mikhailovna Chernukha**

doctor of technical sciences, professor, acade-  
mician, head of the Department of coordina-  
tion of international and initiative projects, V.  
M. Gorbatov Federal Research Center for  
Food Systems  
Moscow, Russia  
Talalihina, 26

E-mail: imcher@inbox.ru

УДК 112:616.831-005:57.084.1  
ГРНТИ 34.39.17,34.39.23,34.05  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.39-46

**Е. Р. Василевская**  
ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем  
им. В.М. Горбатова» РАН

## ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ МОЗГА И МЫШЦ СВИНЕЙ-РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ

*В статье представлены результаты исследования протеомного профиля мозга и мышц свиней, восстановившихся после острого внутримозгового кровоизлияния. Показано, что физиологические параметры (вес, гематологические и биохимические показатели крови) на 42-е сутки после моделирования травмы мозга возвращаются к исходным значениям. С применением масс-спектрометрии были идентифицированы и распределены по функциям белки мозга и мышц свиней (контрольных, ложнооперированных, реконвалесценто́в). Выявлены 15 соединений, характерных для мышц свиней-реконвалесценто́в, среди которых митохондриальные белки, соединения с высоким антиоксидантным потенциалом, белок – регулятор метаболизма жирных кислот, а также шаперон.*

**Ключевые слова:** протеом, биомоделирование, белки, геморрагический инсульт, масс-спектрометрия.

**E. R. Vasilevskaya**  
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems

## PROTEOMIC ANALYSIS OF THE BRAIN AND MUSCLES OF RECONVALESCENT PIGS

*The article presents the results of a study of the proteomic profile of the brain and muscles of pigs recovered from acute intracerebral hemorrhage. It was shown that physiological parameters (weight, hematological and biochemical parameters of blood) returned to their initial values on the 42nd day after brain injury modeling. Using mass spectrometry, the proteins of the brain and muscles of pigs (control, sham-operated, convalescents) were identified and distributed by function. 15 compounds characteristic of the muscles of convalescent pigs were identified, while the presence of proteins with antioxidant potential and compounds involved in neuroregulatory reactions was noted.*

**Keywords:** proteome, biomodels, proteins, hemorrhagic stroke, mass spectrometry.

### Введение

Современные исследования в области молекулярной биологии открывают новые возможности для разработки инновационных продуктов на основе технологии, предполагающей направленную модификацию протеостаза *in vivo*.

Свиньи являются популярной биомедицинской моделью для биомедицинских

исследований от токсикологии до экспериментальной хирургии и поведенческих исследований, но только недавно их начали использовать для изучения нейродегенеративных заболеваний. Так, известно о сходстве мозга свиньи с мозгом человека и приматов по неокортексу [1], плотности белого и серого вещества [2], а также по форме и расположению субталамических ядер [3], чего не наблюдается у грызунов. Модель экспериментального острого внутримозгового кровоизлияния [4] позволяет ограниченно нарушить целостность мозговых структур во внутренней капсуле специальным ножом-дорном, при этом возникающая травма наиболее близка к возникающим и развивающимся острым формам цереброваскулярных патологий у человека. Несмотря на ряд исследований белкового профиля мозга в острый период после возникновения внутримозгового кровоизлияния, изменения протеома мозга и мышц и идентификация специфичных соединений, экспрессируемых в период восстановления после травматического повреждения, не проводились. Поскольку согласно научной гипотезе, любое повреждение запускает каскад компенсаторных реакций, приводящих к активации синтеза биоактивных веществ, которые за счет различных систем доставки могут проникать и накапливаться в тканях-мишенях, большой интерес вызывает сравнительная оценка белкового состава тканей животных после моделирования.

### **Цель работы**

Целью исследования было изучение влияния левосторонней внутримозговой гематомы у свиней-реконвалесцентов на протеомный профиль мозга и мышц в отдаленном периоде после моделирования.

### **Материалы и методы**

В эксперименте участвовали 9 самок вьетнамских вислобрюхих свиней×Визенау в возрасте 180–200 дней и весом  $30,7 \pm 7,4$  кг. Исследование проводили в питомнике лабораторных животных ООО «Кролинфо» (Ликино-Дулево, Россия). Свиней содержали группами по 3 особи на подстилке из древесной стружки в загонах площадью 4,5 м<sup>2</sup>. Температура в помещении на протяжении всего эксперимента составляла  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ . Уход за животными осуществлялся квалифицированным персоналом под наблюдением ветеринаров. Всем свиньям два раза в день скармливали полнорационный комбикорм СК-7 (Россия). Водопроводная вода была доступна *ad libitum*. Световой цикл 12:12/день:ночь с регулируемым освещением. Свиней помещали в эти условия за 7 суток до начала исследования для акклиматизации. Свиней не кормили в течение ночи перед операцией, чтобы предотвратить рвоту во время премедикации, но они имели свободный доступ к воде до введения анестезии в день операции. Животных распределяли на 3 группы: контрольные (CON), ложнооперированные (*SHAM*) и реконвалесцентов (И).

Была использована модель левосторонней интрацеребральной гематомы в области *Capsule interna* (координаты стереотаксиса: А:3; Н:10; L:12 [5]), с последующим введением аутокрови в зону повреждения [4]. Мнимую операцию проводили без повреждения структур мозга.

Взвешивание и ветеринарный осмотр животных проводили на 0, 7, 14, 21, 36 и 42 сутки опыта. Пробы крови для исследований брали из яремной вены на 0, 14, 28, 36 и 42 сутки натошак, утром. Образцы крови анализировали с помощью автоматического ветеринарного гематологического анализатора *Abacus Junior Vet 2.7 (Diatron Messtechnik GmbH, Австрия)* для определения количества эритроцитов (эритроцитов), гемоглобина (*HGB*), гематокрита (*HCT*), тромбоцитов (*PLT*), тромбоцитрита (*PCT*). Для измерения относительного содержания лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов в крови использовали автоматический проточный цитометр *Guava easyCyte (Merck Millipore, Франция)*. На автоматическом биохимическом анализаторе *BioChem FC-360 (НТТ, США)* с использованием наборов реагентов (*НТТ, США*) определяли общий белок (ОБ), альбумин (А), креатинин (Кр), мочевины (М), прямой билирубин (ПрБ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинтрансаминазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гамма-

глутамилтрансферазы (ГГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), триглицеридов (ТГр), холестерина (ТС) и глюкозы (Г) в сыворотке крови.

Свиней содержали и подвергали всем манипуляциям в соответствии с Директивами Европейского Сообщества 86/609ЕЕС. Исследование одобрено биоэтической комиссией Института им. В.М. Горбатова РАН (протокол № 11/2020 от 27.01.2021).

На 42-е сутки после операции отбирали образцы мозга из левого полушария в зоне *IH* (*IP*, ипсилатеральное) и правого (*CL*, контралатеральное) полушарий. Аналогичные пробы брали у 3 контрольных (*CON*) и ложноперированных (*SHAM*) свиней. Для масс-спектрометрического анализа каждую пробу мозга предварительно делили на 5 проб *SDS-PAGE* электрофорезом [6], а каждую пробу мышц – на 3 пробы, затем проводили гидролиз белка трипсином. Протеомный анализ пептидов осуществляли с использованием хроматографической ВЭЖХ системы *Ultimate 3000 RSLCnano* (*Thermo Scientific, USA*) соединенной с масс-спектрометром *Q-Exactive HF* (*Thermo Scientific, USA*). Масс-спектрометрический анализ проводили на масс-спектрометре *Q-Exactive HF* в режиме положительной ионизации с использованием источника *NESI* (*Thermo Scientific, USA*). Идентификацию белков проводили при помощи программы *MaxQuant v.1.6.17.0* с использованием поискового алгоритма *Andromeda*. Для идентификации белков использовали базу данных *Uniprot* с ограничением по видовой специфичности исследуемого организма *Sus scrofa* (*UP8227 S\_scrofa*). Белки рассматривались в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено, по крайней мере, два пептида. Безметковая количественная оценка содержания белков происходила на основе эмпирического показателя *Ibaq*. Система классификации *PANTHER* (анализ белков через эволюционные отношения) использовалась для классификации белков с повышающей и понижающей регуляцией на основе их молекулярной функции, участия в биологических процессах и клеточных компонентов/локализации [7].

### Полученные результаты

Моделирование травмы головного мозга не повлияло на изменение массы тела свиней *SHAM* и *IH*. Прирост массы тела свиней *CON* в первую неделю опыта составил в среднем 27,2%, на вторую и третью недели – на 11,3% и 6,1%, на четвертую неделю – менее чем на 1%, на пятую и шестую недели – на 4,3% и 5,6%. Животные *SHAM* в первую и вторую недели увеличили свою массу на 18,5% и 19,4%, на третью неделю потеряли массу (на 3,9%), на четвертую неделю прирост был положительным – на 4,7%, на пятую неделю – на 11,6%, на шестой неделе - на 1,0%. Свиньи *IH* на первой неделе прибавили вес в среднем на 20,7 %, на второй неделе – на 7,2 %, на третьей неделе – менее 1,0 %, на четвертой и пятой неделях – на 3,4 и 4,3 %, на шестой неделе – на 9,1%. За весь период эксперимента (на 42-е сутки относительно 0) прирост массы тела животных *CON* составил 52,0 %, *SHAM* - 54,8 %, *IH* - 62,9 %.

При анализе цельной крови выявлена разница в содержании клеток крови свиней до начала эксперимента (0-е сутки). Выявленные различия обусловлены индивидуальными особенностями животных и дальнейший анализ показателей проводился внутри групп между днями эксперимента.

У свиней *CON* на 28-й день по сравнению с 0-м и 14-м днем увеличилось относительное содержание лимфоцитов (на 18,4% и 16,4%,  $p < 0,001$ ), уменьшилось относительное содержание гранулоцитов (на 35,2%,  $p < 0,001$ ; 26,5%,  $p = 0,007$ ). На 42-й день показатели соответствовали 0-му дню. Выявлено увеличение относительного содержания моноцитов на 7-е и 14-е сутки относительно 0-х на 40,7% ( $p < 0,001$ ), на 30,0% ( $p < 0,001$ ). На 28-е и 42-е сутки этот показатель соответствовал значениям 0-х суток. Содержание эритроцитов и гемоглобина, а также уровень гематокрита увеличились относительно 0-х суток на 28-е сутки на 15,5% ( $p = 0,004$ ), на 12,9% ( $p = 0,028$ ) и на 19,7% ( $p < 0,001$ ) на 42-е сутки. сутки - на 14,4% ( $p = 0,020$ ), 17,7% ( $p = 0,002$ ) и на 16,0% ( $p = 0,010$ ). Количество тромбоцитов уменьшилось в ходе эксперимента относительно 0-х суток: на 14-е сутки на 25,5% ( $p = 0,242$ ), на 28-е сутки - на 26,4% ( $p = 0,018$ ) и на 42-е сутки - на 33,7%

( $p=0,018$ ).  $p<0,001$ ). Тромбоцит уменьшился на 42-е сутки относительно 0-х на 25,0% ( $p=0,008$ ).

У животных *SHAM* относительное содержание лимфоцитов на 14-е и 28-е сутки по отношению к 0-м суткам увеличилось на 14,0 % ( $p = 0,007$ ) и 31,5 % ( $p < 0,001$ ). Относительное содержание гранулоцитов на 14-е и 28-е сутки по сравнению с исходными значениями уменьшилось на 30,2% и на 36,0% ( $p<0,001$ ). На 42-й день показатели соответствовали 0-му дню. На 14-е и 42-е сутки относительное содержание моноцитов увеличилось относительно 0-х суток на 63,8% ( $p<0,001$ ) и на 53,0% ( $p=0,001$ ). Содержание гемоглобина и уровень гематокрита в цельной крови свиней *SHAM* увеличились на 28-е и 42-е сутки относительно 0 на 6,7 % ( $p = 0,017$ ) и на 12,3 % ( $p < 0,001$ ) и на 15,8 % ( $p = 0,001$ ) и 20,9% ( $p<0,001$ ) соответственно.

У животных *ИН* отмечено увеличение относительного содержания лимфоцитов на 14-е и 28-е сутки относительно 0-х суток на 34,9% ( $p<0,001$ ) и 8,2% ( $p=0,085$ ), при снижении показателя на 42 е сутки по отношению к 28-м суткам (на 19,8%,  $p = 0,012$ ). Относительное содержание гранулоцитов уменьшилось на 28-е сутки на 40,8% ( $p<0,001$ ) относительно 0-х суток, на 42-е сутки показатель увеличился относительно 28-х суток на 44,1% ( $p=0,002$ ). Относительное содержание моноцитов на 28-е сутки снизилось относительно 14-х суток на 30,7% ( $p<0,001$ ). На 42-е сутки показатель увеличился относительно 28-х суток на 35,4% ( $p=0,010$ ) и был сопоставим с исходными значениями. Достоверных различий в показателях эритроцитов и тромбоцитов не было. Анализ сыворотки крови животных *ИН* выявил, что при отсутствии достоверных различий в содержании общего белка и альбумина (табл. 2). Отмечено снижение содержания креатинина на 14-е сутки относительно 0-х суток (на 25,4%,  $p=0,004$ ) и мочевины на 28-е сутки относительно 0-х суток (на 82,0%,  $p=0,023$ ); увеличение общего билирубина на 28-е сутки по отношению к 0-м суткам (в 2,4 раза,  $p<0,001$ ) и активности АЛТ на 28-е сутки по отношению к 0-м и 14-м суткам (на 12,2%,  $p=0,176$  и на 14,7%,  $p=0,021$ ). Активность щелочной фосфатазы и содержание глюкозы увеличились на 14-е сутки по отношению к 0-м суткам на 41,0% ( $p=0,209$ ) и в 2,2 раза ( $p=0,009$ ). Уровень триглицеридов на 14-й день снизился относительно 0-го дня на 44,4% ( $p=0,002$ ), содержание холестерина на 28-й день снизился относительно 0-го дня на 24,5% ( $p=0,025$ ).

Биохимический анализ крови животных *SHAM* относительно 0-х суток показал снижение уровня креатинина на 14-е сутки на 24,5% ( $p=0,001$ ). На 28-й день показатели вернулись к исходным значениям. Общий билирубин на 28-е сутки увеличился (на 62,5%,  $p=0,021$ ), а прямой билирубин снизился на 14-е и 28-е сутки на 26,8% ( $p=0,002$ ) и на 30,2% ( $p<0,001$ ) относительно 0-х суток. активность на 28-й день снизилась на 31% по отношению к 14-му дню ( $p = 0,046$ ). Активность щелочной фосфатазы, ГГТ, амилазы и ЛДГ, а также содержание холестерина и триглицеридов не изменялись на протяжении всего исследования. Содержание глюкозы снизилось на 28-е сутки по отношению к 0-м суткам на 22,5% ( $p = 0,061$ ).

В сыворотке крови животных *CON* относительно 0-х суток отмечено увеличение содержания мочевины (на 47,3%,  $p<0,001$ ), снижение содержания креатинина (на 18,7%,  $p=0,011$ ) и активности АСТ (на 46,1%,  $p<0,011$ ).  $<0,001$ ). Содержание глюкозы снизилось на 14-е и 28-е сутки относительно 0-х суток на 19,4% ( $p=0,035$ ) и на 34,0% ( $p<0,001$ ). Содержание холестерина снизилось на 28-е сутки по отношению к 0-м суткам на 31,5% ( $p = 0,005$ ). Содержание общего белка, альбумина, триглицеридов, общего и прямого билирубина, а также активность АЛТ, ЩФ, ГГТ, ЛДГ и амилазы не изменились.

Для проб мозга были идентифицированы 514 соединений у *CON* свиней, 402 у *SHAM* свиней, 1114 у свиней реконвалесцентов. При этом 294 белка присутствовали во всех образцах, выявлен 41 белок идентифицированный только в образцах *CON*, 37 белков, выявленных только в образцах *SHAM*, 620 соединений, характерных для образцов *ИН*.

Анализ распределения белков по клеточным компонентам с помощью системы *PANTERA* показал отсутствие отличий между образцами: 43-45% относятся к клеточным

анатомическим образованиям; 15% к белковосодержащим комплексам; 40-41% к внутриклеточным компонентам.

Также минимальные определения в распределении доли по 8 молекулярным функциям. Однако в пробах мозга свиней ИГ отмечено увеличение соединений с активностью молекулярного преобразователя – на 31,37% относительно контрольных проб и на 14,21% относительно *SHAM*; активность структурных молекул – на 19,11% относительно контрольных проб и на 26,47% относительно *SHAM*. При этом в пробах мозга свиней *IH* и *SHAM* относительно контрольных проб выявлено увеличение количества соединений с активностью регулятора трансляции (на 54,42% и на 44,44%). В пробах *SHAM* увеличивалось количество соединений с активностью молекулярного адаптера (на 25,00% относительно контроля и на 28,69% относительно количества И) при уменьшении соединений с транспортной активностью (на 19,12% относительно контроля и на 14,21% относительно И).

При анализе распределения белков по 15 биологическим функциям белков нами выявлено, что в пробах мозга свиней И выявлены отдельные соединения межвидового взаимодействия между организмами (0,13%); увеличилось количество соединений биологической адгезии – на 114,17% относительно контрольных проб и на 27,64% относительно *SHAM*; белков иммунной системы - на 66,46% относительно контрольных проб и на 197,82% относительно *SHAM*. Отмечено снижение числа молекул класса мультиорганных процессов - на 47,56% относительно контрольных проб и на 42,55% относительно *SHAM*; реакции на раздражитель - на 10,59% относительно *CON* и на 6,99% относительно *SHAM*; сигнальных соединений - на 20,73% относительно *CON* и на 23,64% относительно *SHAM*; участников процессов развития - на 13,53% относительно *CON* и на 18,96% относительно *SHAM*; участников многоклеточных процессов в организме - на 13,15% относительно *CON* и на 22,31% относительно *SHAM*. В пробах *SHAM* относительно *CON* и относительно *IH* увеличивалось количество соединений, участвующих в репродуктивном процессе и репродукции (на 123,57% и на 135,04%, соответственно).

Анализ распределения по классам идентифицированных белков показал, что в пробах мозга свиней *IH* выявлено увеличение количества протеинов 7 классов из 2 относительно *CON* и *SHAM*: транспортеры (на 12,40% и на 13,46%); каркасный/адапторный белок (на 45,42% и на 52,22%); геноспецифический регулятор транскрипции (на 13,80% и на 19,13%); трансляционный белок (на 24,76% и на 83,66%); белок мембранного транспорта (на 94,54% и на 65,46%); шаперон (на 74,22% и на 11,91%); трансмембранный сигнальный рецептор (на 102,32% и не выявлялся у *SHAM*). При этом в пробах мозга свиней ИГ относительно контрольных проб и *SHAM* выявлено уменьшение числа белков внеклеточного матрикса (на 49,42% и на 54,62%); белков цитоскелета (на 1,82% и на 25,12%); межклеточных сигнальных молекул (на 15,70% и на 33,82%); модуляторов белоксвязывающей активности (на 10,08% и на 9,23%).

В пробах мозга свиней *IH* и *SHAM* относительно *CON* выявлено снижение количества белков защиты/иммунитета (на 15,70% и 15,09%), ферментов взаимопревращения метаболитов (на 13,90% и 12,49%), белков-транспортеров (на 30,45% и 20,39%) и белков клеточного соединения (на 49,42% и на 68,16%). Содержание молекул клеточной адгезии и кальций-связывающих белков в образцах *IH* уменьшалось относительно *CON* (на 15,70% и на 24,13%), увеличиваясь относительно *SHAM* (на 98,55% и на 78,70%). Число белков метаболизма нуклеиновых кислот увеличивалось в пробах *IH* и *SHAM* относительно *CON* на 85,46% и на 91,06%.

В пробах *SHAM* относительно *CON* и относительно *IH* увеличивалось количество соединений белка цитоскелета (на 31,12% и на 33,54%), межклеточных сигнальных молекул (на 27,37% и на 51,10%), белок-модифицирующих ферментов (на 15,52% и на 22,77%), хроматин/хроматин-связывающих, или -регуляторных белков (на 27,37% и на 25,91%), структурных белков (на 27,37% и 25,91%).

Таким образом, большинство соединений в пробах мозга *IH* относятся к классам белков, участвующих в сигнальном пути (скаффолд/адапторный белок,

трансмембранный сигнальный рецептор, транспортер), белков-транспортеров (мембранный транспортный белок), трансляционных белков (трансляционный белок) и цитоплазматических белков (шапероны). Изменения в распределении белков в пробах *SHAM* присутствуют в основном в увеличении доли скелета и белков внутриклеточных элементов, в связи с чем сравнительный функциональный анализ белков мышечной ткани осуществлялся между контролем и *ИН*.

В долях белков по 7 молекулярным функциям выявлено увеличение числа белков в мышцах *ИН* относительно *CON* с активностью регулятора трансляции (на 67,90%), активностью молекулярного адаптера (на 11,93%), активностью структурных молекул (на 67,90%), транспортной активности (на 39,92%), снижении белков с регулятором молекулярной функции (на 16,05%). При анализе распределения белков по 13 биологическим функциям нами выявлено, что в пробах мышц свиней *ИН* выявлено увеличение соединений биологической регуляции (на 11,58%), белков, ответственных за реакцию на раздражитель (на 11,58%), сигнальных соединений (на 65,41%), при снижении белков, участвующих в процессах развития (на 18,32%). Кроме того, в пробах мышц *ИН* не обнаружены белки, участвующие в процессах биологической адгезии и роста, обнаруженные в контроле. Анализ распределения по 18 классам идентифицированных белков белков показал, что в пробах свиней *ИН* выявлено увеличение числа геноспецифических регуляторов транскрипции (на 32,12%), трансляционных белков (на 44,13%), белков мембранного транспорта (на 23,12%) при уменьшении числа белков внеклеточного матрикса (на 11,92%), каркаса/адаптера (на 11,92%), внутриклеточных сигнальных молекул (на 11,92%), белков иммунитета (55,96%).

Был проведен сравнительный анализ белков мышц опытных свиней и соединений, идентифицированных в мозге и мышцах животных остальных групп, также было проведено контрольное сравнение полученного перечня белков с известными уже соединениями, характерными для тканей свиней [8]. В результате были выявлены 15 соединений, которые выявлены только в мышечной ткани свиней-реконвалесцентов, перенесших экспериментальную травму головного мозга и восстановившихся после операции: *Q9BG57*; *H6UI30*; *A0A287A271*; *A0A287B931*; *F1S534*; *A0A286ZNK1*; *A0A1Z1VUJ8*; *A0A287B4D9*; *A0A287ARV8*; *A0A286ZWB1*; *F1SMB6*; *M3V828*; *K7GP19*; *A0A286ZJR2*; *A0A287BCZ5*.

### Выводы

Таким образом, результаты цитометрического анализа функциональной активности лейкоцитов крови свидетельствовали о развитии воспалительных реакций у животных *ИН* и *SHAM*, причем у животных *ИН* эти реакции проявлялись на 21-28 сутки эксперимента, в то время как у ложнооперированных свиней - на 14 и 21 сутки. Что касается показателей функциональной активности эритроцитов, то на 28 и 42 сутки у *ИН* животных отмечено увеличение содержания эритроцитов, гемоглобина и гематокрита. Интересно, что у животных *ИН* отмечалось снижение тромбоцитов на 14-е сутки. На 14-е и 28-е сутки отмечались изменения активности ферментов крови (аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, гаммаглутаминтранспептидазы), что свидетельствует о патологических процессах, возможно цитолитических, в очаге поражения, что косвенно увеличивает нагрузку на печень и снижает ее общую функциональность. Косвенно это подтверждается снижением уровня триглицеридов и холестерина на 14-е и 42-е сутки. Гипергликемия также наблюдалась на 14-е сутки. Сравнительный анализ биохимического анализа выявил, что после моделирования у экспериментальных животных наблюдалось усиление белкового катаболизма и выраженные нарушения функции печени, которые частично сохранялись на 14-е и 28-е сутки. На 42-е сутки анализируемые показатели крови были сопоставимы с таковыми у контрольных животных.

При этом протеом контрольных свиней значительно отличался от свиней-реконвалесцентов – как в случае белков мозга, так и в случае белков мышц, несмотря на полное физиологическое восстановление животных. Спустя 42 дня после воздействия на мозг,



уникальные белки мышц свиней-реконвалесцентов свидетельствовали о происходивших процессах регенерации тканей. Так, белок *Q9G32 (COX2, MM 26,1 кДа)* — митохондриальный трансмембранный белок, компонент цитохром-С-оксидазы, который является конечным компонентом электрон-транспортной цепи и катализирует перенос электронов от цитохрома с к кислороду. Эта субъединица выполняет каталитическую функцию, связанную с окислительно-восстановительной химией [9]. Соединения *A0A286ZNK1 (MRPL18, молекулярная масса 19,9 кДа)*, *A0A287ARV8 (MRPL12, молекулярная масса 21,2 кДа)*, *K7GP19 (MRPL13, молекулярная масса 22,9 кДа)*, *A0A286ZJR2 (MRPL58, молекулярная масса 23,5 кДа)* также относятся к митохондриальным белкам, которые способны образовывать энергию за счет окислительного фосфорилирования, осуществляют протекание цикла трикарбоновых кислот, а также участвуют в синтезе различных аминокислот, органических кислот, липидов, нуклеотидов, гема, кластеров сульфата железа, субстанций, участвуют в антиоксидантной защите, в регуляции иммунитета и апоптоза. Белки *F1S9Q1* и *A0A287B931* не охарактеризованы. Белок *H6UI30 (H-FABP, молекулярная масса 14,76 кДа)* ответственен за связывание жирных кислот и участвует в их метаболизме, при этом факт его обнаружения в мозге и мышцах свиней, перенесших острое мозговое кровоизлияние, свидетельствует о гиперметаболизме жирных кислот вследствие восстановления [10]. *A0A287A271 (HSPB3, молекулярная масса 16,8 кДа)* относится к специализированным шаперонам, участвующим в дифференцировке мышечных клеток [11].

### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: свиньи восстанавливаются после моделирования локальной внутримозговой гематомы на 42-й день после операции. Биохимические, цитометрические и гематологические показатели свидетельствуют о воспалении и нарушении ферментативной продукции на 14-28-й день исследования, но в дальнейшем показатели становятся равными исходным. Протеомные исследования показали различия в белковом составе мозга свиней ложнооперированных, реконвалесцентов, и контрольных; а также для ипсилатеральной и контралатеральной сторон мозга. Впервые были выявлены различия в мышечном составе свиней разных групп. Определены уникальные белки, которые могут быть маркерами патологии в отдаленном периоде, а также использоваться для создания функционального продукта для нейрореабилитации.

*Исследование выполнено в рамках гранта Российского научного Фонда (проект №19-76-10034).*

### Список литературы

1. Villadsen J., Hansen H. D., Jørgensen L. M., Keller S. H., Andersen F. L., Petersen I. N. Automatic delineation of brain regions on MRI and PET images from the pig // *Journal of Neuroscience Methods*. 2018. № 294. P. 51–58.
2. Cullen D. K., Harris J. P., Browne K. D., Wolf J. A., Duda J. E., Meaney D. F. A porcine model of traumatic brain injury via head rotational acceleration // *Methods in Molecular Biology*. 2016. №1462. P.289–324.
3. Larsen, M., Bjarkam, C. R., Østergaard K., West M. J., Sørensen J. C. The anatomy of the porcine subthalamic nucleus evaluated with immunohistochemistry and design-based stereology // *Anatomy and embryology*. 2004. № 208. P.239–247.
4. Vasilevskaya E., Makarenko A., Tolmacheva G., Chernukha I., Kibitkina A., Fedulova L. Local Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats // *Biomedicines*. 2021. №9(6). P.585.
5. Félix B., Léger M.-E., Albe-Fessard D., Marcilloux J.-C., Rampin O., Laplace J.-P., Duclos A., Fort F., Gougis S., Costa M., Duclos N. Stereotaxic atlas of the pig brain // *Brain Research Bulletin*. 1999. №49(1–2). P.1-137.
6. Akhremko A., Fedulova L. Comparative study of weaning pigs' muscle proteins using two-dimensional electrophoresis // *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2021. №15.

P.52-57.

7. Mi H., Muruganujan A., Casagrande J. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system // *National Protocols*. 2013. №8. P. 1551–1566.
8. Liu R., Wu G.-Y., Li K.-Y., Ge Q.-F., Wu M.-G., Yu H., Wu S.-L., Bao W.-B.. Comparative Study on Pale, Soft and Exudative (PSE) and Red, Firm and Non-Exudative (RFN) Pork: Protein Changes during Aging and the Differential Protein Expression of the Myofibrillar Fraction at 1 h Postmortem // *Foods*. 2021. №10(4). P. 733.
9. Schoch C.L. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools // *Database (Oxford)*. 2020. Article № baaa062.
10. Rink C., Khanna S. Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke // *Antioxidants & redox signaling*. 2011. №14(10). P.1889–1903.
11. Vendredy L., Adriaenssens E., Timmerman V. Small heat shock proteins in neurodegenerative diseases // *Cell stress & chaperones*. 2020. №25(4). P. 679–699.

**Сведения об авторах**

**Екатерина Романовна Василевская**

к.т.н., научный сотрудник

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем

им. В.М. Горбатова» РАН,

Москва, Россия

ул. Талалихина, 26

Эл. почта: e.vasilevskaya@fneps.ru

**Information about authors**

**Ekaterina Romanovna Vasilevskaya**

cand. Sc. (Technology), Researcher,

V.M. Gorbatov Federal Research Center for

Food Systems

Moscow, Russia

Talalihina, 26

E-mail: e.vasilevskaya@fneps.ru

УДК 01.891.574

ГРНТИ 34.39.17, 34.39.23, 62.01

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.46-52

**Е. Р. Василевская, Г. Г. Молдованов, Н. В. Купаева, В. А.**

**Пчелкина, Л. В. Федулова,**

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем

им. В.М. Горбатова» РАН

**МОДЕЛЬ АУТОГЕМОМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА *IN VIVO*: ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОДУКТА ДЛЯ ЭНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ НА МЯСНОЙ ОСНОВЕ**

Проведено экспериментальное исследование морфофункционального состояния ткани головного мозга крыс с гемморагическим инсультом при диетотерапии специализированным мясным продуктом. Выявленные у контроля деструктивные изменения в структуре головного мозга и, в частности, нейронах, с преобладанием глиоза, стабилизировались на 16-е сутки после операции при введении в рацион продукта.

**Ключевые слова:** свиньи-реконвалесценты, ТБК-АП, ипсилатеральное полушарие головного мозга крыс, FRAP, глиоциты.

**E. R. Vasilevskaya, G. G. Moldovanov, N. V. Kupaeva, V. A.**

**Pchelkina, L. V. Fedulova**

V. M. Gorbatov Federal Research

Center for Food Systems

**IN VIVO MODEL OF AUTOHEMORRHAGIC STROKE: EFFECTIVENESS OF A MEAT-BASED ENTERAL NUTRITION PRODUCT**

An experimental study of the morphofunctional state of rats' brain tissue with hemorrhagic strokes after diet therapy with a specialized meat product was carried out. Destructive changes in the structure of the brain and, in particular, neurons, revealed in the control, with a predominance of gliosis, stabilized on the 16th day after the operation when the product was introduced into the diet.

**Keywords:** reconvallescent pigs, TBA-AP, ipsilateral cerebral hemispheres in rats, FRAP, gliocytes.

### **Введение**

Внутричерепное кровоизлияние – цереброваскулярное заболевание с высокой смертностью и инвалидизацией [1]. В отношении разработки терапии внутричерепного кровоизлияния приложено много усилий, однако до сих пор не существует эффективного лечения [2]. В связи с чем в последние годы внутричерепное кровоизлияние привлекает все большее внимание исследователей, изучающих механизмы повреждения и восстановления нейронов. Геморрагический инсульт (ГИ) характеризуется гемодинамическими изменениями, отеком головного мозга, нарушением функционирования и разрушением гематоэнцефалического барьера, окислительным стрессом и пагубным действием продуктов распада эритроцитов, возбуждающих каскады токсических эффектов, нейровоспалением и, в конечном итоге, апоптозом нейронов [3]. Процессы окислительного стресса, нарушенного метаболизма и митохондриальной дисфункции, начинающиеся с первых минут развития катастрофы и сохраняющиеся в длительном периоде, являются одним из основных факторов формирования отдаленных последствий инсульта, ввиду активного взаимодействия свободных радикалов и молекулярных продуктов свободно-радикального окисления с молекулами, формирующими нейрональные и внутриклеточные биомембраны при непосредственном влиянии на нарушение метаболических процессов нейронов [4]. Учитывая, что животный протеин сегодня рассматривается не только как источник пластического материала, но и как закодированная аминокислотная последовательность, способная формировать гомеостаз, встраиваясь в метаболические пути при алиментарном поступлении. Особую актуальность приобретает разработка специальных продуктов питания, содержащих соединения белковой природы, действующие как активаторы клеточного метаболизма и нейропротекторы.

Ранее было установлено, что в биосубстратах свиней-реконвалесцентов, восстановившихся после интравентрикулярной гематомы, накапливаются уникальные белки, участвующие в биологических реакциях протеостаза – аутофагии (шаперонин-опосредованной и митохондриальной); биосинтезе белка (сворачивание, формирование ансамблей и транслокацию белков); апоптозе и эндоцитозе. В связи с чем предположена возможность использования мяса свиней-реконвалесцентов в производстве специализированных продуктов питания нейропротекторного действия для энтерального питания пациентов, страдающих заболеваниями центральной нервной системы.

### **Цель работы**

Изучение эффективности продукта для энтерального питания на мясной основе на модели аутогеморрагического инсульта на лабораторных крысах.

### **Материалы и методы**

Продукт «опыт» для энтерального питания представлял собой готовую к употреблению стерилизованную смесь в виде однородной гомогенной массы без видимых включений, с низкой вязкостью, светло-коричневого цвета, имеющую приятный молочный, слегка сладковатый вкус и содержал мясо свиней-реконвалесцентов (17%), сывороточный молочный белок (2,5%), мальтодекстрин (12,5%), соевое (1%) и рапсовое (3,5%) масла, инулин (0,3%), стабилизатор паслгард (0,4%), воду питьевую (62,8%). Продукт «контроль» изготавливали из обычной свинины, в остальной рецептура была аналогичной. Содержание белка составляло 5,6 г для продукта «опыт»; 5,0 г для продукта «контроль»; жира – 5,0 г и 4,7 г и углеводов – 13,3 г и 11,6 г, соответственно; калорийность – 1200 ккал/л.

Исследования проведены на крысах-самцах *Wistar*, полученных из питомника ООО «Кролинфо» (Россия). Животных содержали в клетках из поликарбоната (Tecniplast, Италия) по 5-6 голов, при стандартной для вивария температуре ( $20 \pm 3$ )°С, влажности (48±2) % и освещения (режим день/ночь), при свободном доступе к полнорационному комбикорму (Лабораторкорм, Россия) и воде. Животных формировали на группы методом парных аналогов по массе тела и выраженности ориентировочно-исследовательского

поведения в тесте «открытое поле». Группа 1 состояла из интактных животных ( $n=10$ ), крысам групп 2 - 4 под наркозом с использованием стереотаксической установки (*RWD Life Science Co.*, Китай) травмировали ткани головного мозга с последующим введением аутокрови (20 мкл) в соответствии с [5]. Крысы группы 2 ( $n=11$ ) являлись контрольными, крысам групп 3 ( $n=11$ ) и 4 ( $n=11$ ) после операции ежедневно дополнительно в рацион вводили контрольный и опытный продукты с помощью внутрижелудочного зонда по 15 г/голову с 1-х по 3-и сутки и в кормушках по 25 г/голову на 3-16-е сутки.

Эксперимент завершали на 16-е сутки путем усыпления крыс в камере для эвтаназии (*VetTech*, Великобритания), отбирали фрагменты ипсилатерального полушария головного мозга на гистологические исследования и для оценки интенсивности процессов свободно-радикального окисления и антиоксидантного потенциала нервной ткани.

Содержание и все манипуляции проводили с соблюдением Приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики», Директив Европейского сообщества 86/609ЕЕС, исследование одобрено биоэтической комиссией ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» (протокол №01/2021 от 15.04.2021).

Гистологические препараты готовили путем фиксации биопроб (5x5x5 мм) в 10 %-м забуференном формалине (БиоВитрум, Россия) с последующим обезвоживанием и пропитыванием парафином *Histomix* (БиоВитрум, Россия) при помощи автоматического процессора *Tissue-Tek (Sakura Seiki Co., ltd.*, Япония) по стандартной методике. Серийные срезы толщиной 5 мкм получали на ротационном микротоме *HM 315 (Microm GmbH*, Германия), монтировали на предметные стекла (*Menzel-Gläser*, Германия), высушивали при температуре 37°C (12 час), депарафинизировали, регидратировали и окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля (БиоВитрум, Россия). Окрашенные срезы заключали под покровное стекло с использованием монтирующей среды (*Leica Biosystems*, Германия). Анализ препаратов, их фотографирование осуществляли на световом микроскопе «*Axiolmager A1*» с помощью видеокамеры «*Axiocam MRc 5*» и компьютерной системы анализа изображений «*AxioVision 4.7.1.0*» (*Carl Zeiss*, Германия). Для количественной оценки области таламуса исследовали плотность нейронов и глии (число клеточных элементов на единицу площади) и нейроглиальный индекс (соотношение числа глии к числу нейронов). Локализацию изучаемых областей головного мозга на гистологических препаратах определяли с помощью стереотаксического атласа [6].

В тканях головного мозга измеряли концентрацию ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) и низкомолекулярных антиоксидантов методом *FRAP* с использованием спектрофотометра СФ-2000 (Спектр, Россия) по методике [7, 8], выражая результаты в мкмоль/г белка и мкмоль-экв. кверцетина /г белка, соответственно. Для получения экстрактов ткани гомогенизировали с 50 мМ фосфатным буфером (рН 7,0) в соотношении 1:5 с помощью стеклянного гомогенизатора, центрифугировали в течение 5 мин при 7000 g при 4°C, отбирая надосадочную жидкость. Концентрацию белка в экстрактах определяли биуретовой реакцией на спектрофотометре СФ-200 следующим образом: в стеклянные пробирки вносили 1200 мкл биуретового реактива (*HTI, USA*) и 20 мкл исследуемого образца, реакционную смесь инкубировали в течение 10 мин при температуре 22°C и проводили измерение оптической плотности при 540 нм, используя в качестве раствора сравнения биуретовый реактив.

Статистический анализ данных проводили с помощью пакета программ *STATISTICA 10.0*, результаты представлены в виде медианы (*Me*) и «интерквартильного размаха» (P25-P75), достоверным считали различие при  $p < 0,05$ , значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна-Уитни.

### Полученные результаты

Гистологическая картина структур головного мозга крыс приведена на рисунке 1. На препаратах головного мозга интактных крыс группы 1 в области *Corpus callosum* глиациты и аксоны располагались упорядоченно, олигодендроциты обеспечивали нормальную миелинизацию нервных отростков; наблюдали единичные погибшие нейроны. В

области таламуса выявлено незначительное количество набухших нейронов, глиальные клетки располагались.

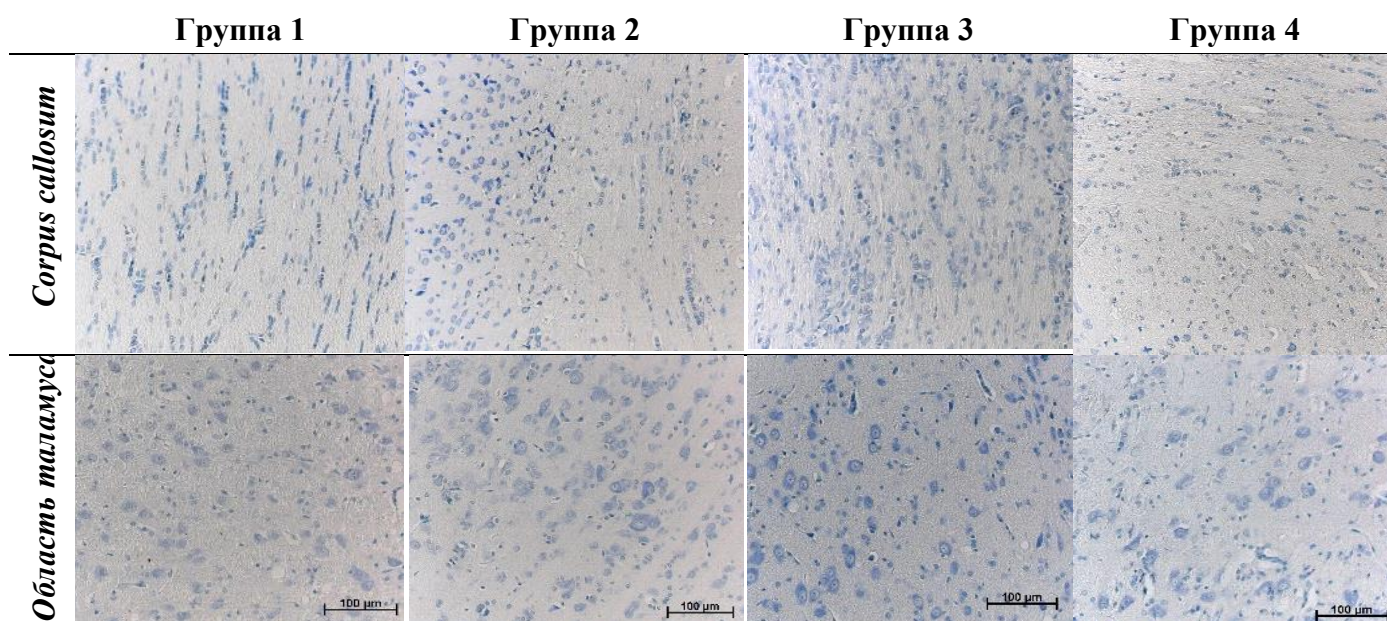


Рис. 1. Гистологическая картина структур головного мозга экспериментальных крыс. Окраска по Нислю, ув. 20х

У крыс группы 2 в области *Corpus callosum* глиациты и аксоны упорядочены, выявлено значительное количество нейронов с дистрофическими изменениями - в состоянии отека, с умеренной вакуолизацией цитоплазмы, гиперхроматозом и гомогенизация цитоплазмы, при умеренном количестве погибших нейронов. В области таламуса отмечались дистрофические изменения нейронов: набухание и объединение с клетками макроглии, выявлялись гипохромные клетки и деструктивно измененные клетки-тени, погибшие нейроны – по мере приближения к очагу поражения. Глиальные клетки располагались равномерно. У крыс группы 3 *Corpus callosum* состоял из пучков нервных волокон, тянущихся параллельно друг другу. Глиальные клетки расположены упорядоченно по направлению аксонов, у края области поражения глиоциты располагались хаотично. Погибшие нейроны преимущественно не наблюдались. В области таламуса, выявлено увеличение концентрации глиальных клеток, дистрофические изменения нейронов на всех полях зрения: набухание и объединение с клетками макроглии, выявлены единичные погибшие нейроны. Выявлены признаки компенсаторно-восстановительных реакций выживших нейронов и глиоцитов, проявляющиеся на структурном уровне увеличением количественных и качественных характеристик нейронов: восстановлением тинкториальных свойств цитоплазмы, гиперплазией и гипертрофией субклеточных элементов, гипертрофией сомы. Препараты мозга крыс группы 4 характеризовались хаотичностью расположения аксонов мозолистого тела в области поражения, погибшие нейроны выявлены в большей степени в области мозговой оболочки. В области таламуса наблюдалось увеличение концентрации глиальных клеток, нейроны в состоянии отека, значительные количества клеток макроглии, отмечены погибшие нейроны.

Установлены различия по плотности расположения нейронов и глиальных клеток в структурах таламуса крыс (Таблица 1): в группе 2 и 4 относительно группы 1 количество нейронов статистически снижалось на 46,2% и 25,6%, количество глиальных клеток увеличивалось на 75,4% и 62,1%, соответственно. В группе 3 плотность расположения нейронов соответствовала группе 1, увеличиваясь относительно группы 4 на 31,1%, при этом количество глиоцитов увеличиваясь относительно группы 1 на 55,4%.

## Секция 1. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

**Таблица 1. Количество нейронов и глиальных клеток в структурах таламуса экспериментальных крыс (Ме [P25-P75])**

Показатель	Группа животных			
	1	2	3	4
Количество нейронов	160 [130-180]	86* [73-100]	156 <sup>#+</sup> [121-169]	119* [92-129]
Количество глиальных клеток	630 [526-743]	1105* [796-1165]	979* [853-1078]	1021* [848-1241]

Примечание: статистически значимое отличие ( $p < 0,05$ ): \* - от интактных крыс группы 1; # - от показателя контрольных крыс с ГИ группы 2, + - от показателя крыс группы 4.

В тканях головного мозга крыс группы 2 отмечено значительное накопление ТБК-активных продуктов и низкомолекулярных антиоксидантов – в 3,1 раз и на 18,6% относительно группы 1 (Таблица 2). В тканях головного мозга крыс группы 3 отмечалась наибольшая концентрация низкомолекулярных антиоксидантов, увеличиваясь на 34,56% относительно группы 1, на 13,5 % относительно группы 2 и на 10,8% относительно группы 4; при этом ТБК-АП снижалось (на 58,7% относительно группы 2 и на 22,5% относительно группы 4).

**Таблица 2. Оценка интенсивности процессов свободно-радикального окисления и антиоксидантного потенциала нервной ткани головного мозга экспериментальных крыс (Ме [P25-P75])**

Показатель	Ед. изм.	Группа животных			
		1	2	3	4
Относительная масса головного мозга	%	0,57 [0,56-0,59]	0,55 [0,54-0,63]	0,61 [0,57-0,64]	0,56 [0,53-0,58]
Концентрация белка	г/л	7,47 [7,15-8,03]	7,43 [7,26-7,66]	5,89* [5,3-6,13]	6,08* [5,82-6,47]
ТБК-АП	мкмоль/г белка	0,45 [0,41-0,54]	1,84* [1,71-2,07]	0,76 <sup>#+</sup> [0,54-0,82]	0,98 <sup>#</sup> [0,89-1,04]
FRAP	мкмоль-экв. кверцетина / г белка	14,84 [14,21-15,26]	17,60 [16,34-19,44]	19,97 <sup>#</sup> [19,17-22,02]	18,02 [17,35-20,21]

Примечание: статистически значимое отличие ( $p < 0,05$ ): \* - от интактных крыс группы 1; # - от показателя контрольных крыс с ГИ группы 2, + - от показателя крыс группы 4.

### **Выводы**

Травма головного мозга сопровождается нарушением тканевого гомеостаза, нейротрансмиттерной дезорганизацией и, в конечном итоге, функциональной активности нейронов и глии [9]. Введение в рацион крыс с ГИ продукта для энтерального питания способствовало компенсаторно-приспособительным реакциям со стороны нейроглии и сохранению нейронов, нивелированию избыточного образования активных форм кислорода нормализации параметров перекисного окисления липидов и общего антиоксидантного статуса за счет увеличения количества низкомолекулярных антиоксидантов в головном мозге.

### **Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: 1) в группе контроля при ГИ в коре головного мозга ипсилатерального



полушария преобладали дистрофически измененные нейроны, характеризующиеся набуханием перикариона, гипер- и гипохромией, вакуолизацией цитоплазмы, хроматоллизом, незначительной деформацией ядра; 2) на фоне диетотерапии продуктом для энтерального питания на основе мяса свиней-реконвалесцентов происходили защитно-приспособительные реакции со стороны нейроглии и нейронов (восстановление тинкториальных свойств цитоплазмы, гиперплазия и гипертрофия субклеточных элементов), обеспечивающие нейрорегенераторные изменения; снижение интенсивности процессов свободно-радикального окисления и увеличение антиоксидантного потенциала нервной ткани головного крыс.

*Исследование выполнено в рамках гранта Российского научного Фонда (проект №19-76-10034).*

### Список литературы

1. Васильева Е.Б., Талыпов А.Э., Синкин М.В., Петриков С.С. Особенности клинического течения и прогноз исходов тяжелой черепно-мозговой травмы. Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». 2019. № 8(4), С. 423-429.
2. Kang M., Yao Y. Oligodendrocytes in intracerebral hemorrhage // *CNS Neurosci Ther.* 2019. No 25(10). P.:1075-1084. doi: 10.1111/cns.13193.
3. Jiang Y.B., Wei K.Y., Zhang X.Y., Feng H., Hu R. White matter repair and treatment strategy after intracerebral hemorrhage // *CNS Neurosci Ther.* 2019. No 25(10). P. 1113-1125.
4. Wellman S.M., Cambi F., Kozai T.D. The role of oligodendrocytes and their progenitors on neural interface technology: A novel perspective on tissue regeneration and repair // *Bio-materials.* 2018. No 183. P. 200-217.
5. Vasilevskaya E., Makarenko A., Tolmacheva G., Chernukha I., Kibitkina A., Fedulova L. Local Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats // *Biomedicines.* 2021. No. 9(6). P. 585.
6. Paxinos G., Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates / 6th ed.: London: Academic Press.* 2007. 448 p.
7. Chernukha I.M., Fedulova L.V., Vasilevskaya E.R., Kulikovskii A.V., Kupaeva N.V., Kotenkova E.A. Antioxidant effect of ethanolic onion (*Allium cepa*) husk extract in ageing rats // *Saudi Journal of Biological Sciences.* 2021. No. 28(5). P. 2877-2885.
8. Kupaeva N.V., Kotenkova E.A. Current view on the assessment of antioxidant and antiradical activities: A mini review // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 61st International Meat Industry Conference, MEATCON. Zlatibor, 2021. No. 854(15): 012048.*
9. Литвицкий П.Ф. Общая этиология расстройств нервной деятельности. нейрогенные патологические синдромы. *Вопросы современной педиатрии.* 2013. №12(4). С. 73-90.

### Сведения об авторах

**Екатерина Романовна Василевская**

к.т.н., научный сотрудник

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем

им. В.М. Горбатова» РАН,

Москва, Россия

ул. Талалихина, 26

Эл. почта: e.vasilevskaya@fneps.ru

**Геннадий Геннадьевич Молдованов**

Аспирант

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем

им. В.М. Горбатова» РАН,

Москва, Россия

ул. Талалихина, 26

Эл. почта: moldovanov.gena@mail.ru

### Information about authors

**Ekaterina Romanovna Vasilevskaya**

cand. Sc. (Technology), Researcher,

V.M. Gorbатов Federal Research Center for

Food Systems

Moscow, Russia

Talalihina, 26

E-mail: e.vasilevskaya@fneps.ru

**Gennady Gennadievich Moldovanov** post-

graduate,

V. M. Gorbатов Federal Research Center for

Food Systems

Moscow, Russia

Talalihina, 26

E-mail: moldovanov.gena@mail.ru

**Надежда Владимировна Купаева**

аспирантка

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем

им. В.М. Горбатова» РАН,

Москва, Россия

ул. Талалихина, 26

Эл. почта: n.kupaeva@fncps.ru

**Виктория Александровна Пчелкина**

к.т.н., ведущий научный сотрудник

Экспериментальной клиники-лаборатории биологически

активных веществ животного происхождения

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем

им. В.М. Горбатова» РАН,

Москва, Россия

ул. Талалихина, 26

Эл. почта: v.pchelkina@fncps.ru

**Лилия Вячеславовна Федулова**

д.т.н., проф. РАН,

заведующий лабораторией ФГБНУ «Федеральный науч-

ный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН,

Москва, Россия

ул. Талалихина, 26

Эл. почта: l.fedulova@fncps.ru

**Nadezhda Vladimirovna Kupaeva** postgradu-

ate,

V. M. Gorbatov Federal Research Center for

Food Systems

Moscow, Russia

Talalihina, 26

E-mail: n.kupaeva@fncps.ru

**Victoriya Alexandrovna Pchelkina**

candidate of technical sciences, leading re-

searcher scientist in Experimental clinic and

research laboratory for bioactive substances

of animal origin, V. M. Gorbatov Federal Re-

search Center for Food Systems

Moscow, Russia

Talalihina, 26

E-mail: v.pchelkina@fncps.ru

**Liliya Vyacheslavovna Fedulova**

D.Sc. (Technology), Professor of RAS, Head

of the Laboratory,

V. M. Gorbatov Federal Research Center for

Food Systems

Moscow, Russia

Talalihina, 26

E-mail: l.fedulova@fncps.ru

УДК 577.11

ГРНТИ 31.23

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.52-57

**О. Д. Гендриксон, Е. А. Зверева, А. В. Жердев,**

**Б. Б. Дзантиев**

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук

## **ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ФИКОТОКСИНОВ МИКРОЦИСТИНА И ДОМОЕВОЙ КИСЛОТЫ**

*Разработана иммунохроматографическая тест-система для одновременного обнаружения двух фикотоксина – домоевой кислоты и микроцистина. Анализ реализуется в непрямом конкурентном формате с использованием антивидовых антител, меченных наночастицами золота. Инструментальный/визуальный пределы обнаружения составляют 2/80 и 0,05/0,3 нг/мл для домоевой кислоты и микроцистина, соответственно; время анализа – 18 мин. Показана применимость разработанной тест-системы для определения фикотоксина в морской воде. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 20-43-07001).*

**Ключевые слова:** фикотоксины, микроцистин, домоевая кислота; иммунохроматографический анализ; безопасность воды

**O. D. Hendrickson, E. A. Zvereva, A. V. Zherdev,**

**B. B. Dzantiev**

A.N. Bach Institute of Biochemistry

Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of

Sciences

## **IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEM FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF PHYCOTOXINS MICROCYSTIN-LR AND DOMOIC ACID**

*An immunochromatographic test system has been developed for the simultaneous detection of two phycotoxins, domoic acid (DA) and microcystin-LR (MC-LR). The assay is implemented in an indirect competitive format using anti-species antibodies labeled with colloidal gold*



*nanoparticles. The instrumental/visual detection limits are 2/80 and 0.05/0.3 ng/mL for DA and MS-LR, respectively; the assay duration is 18 min. The applicability of the developed test system for the determination of phycotoxins in seawater is shown. This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 20-43-07001).*

**Key words:** *phycotoxins, microcystin-LR, domoic acid, immunochromatographic analysis, water safety.*

### **Введение**

В настоящее время наблюдается непрерывный рост влияния хозяйственной деятельности человека на окружающую среду. Так, активное поступление соединений азота и фосфора со сточными водами приводит к эвтрофикации водоемов и бурному развитию цианобактерий и водорослей, продуктами жизнедеятельности которых являются крайне опасные для здоровья человека соединения фикотоксины [1]. По трофическим цепям фикотоксины попадают и накапливаются в моллюсках, ракообразных и рыбе, которые являются традиционными объектами промысла и аквакультуры. Употребление в пищу контаминированной фикотоксинами продукции приводит как к острым, так и к хроническим токсическим эффектам [2]. Среди широкого спектра фикотоксинов к приоритетным по распространенности и токсичности относятся амнотический токсин домоевая кислота (ДК) и гепатотоксин микроцистин (МЦ) [3, 4]. Поэтому крайне востребованы аналитические системы для их массового контроля. Существующие методы инструментального выявления фикотоксинов ориентированы на сложное дорогостоящее оборудование и позволяют проводить лишь подтверждающий контроль, но непригодны для широкого первичного скрининга [5]. Оптимальным способом решения скрининговых задач является иммунохроматографический анализ (ИХА), сочетающий экспрессность и простоту проведения, в том числе, непосредственно в местах отбора проб [6]. Известен ряд успешных разработок иммунохроматографических тест-систем для выявления индивидуальных фикотоксинов [6]. Однако в ситуации, когда конкретный контаминант неизвестен, применение нескольких монопараметрических тестов увеличивает трудоемкость скрининга. Поэтому особый интерес представляют практически отсутствующие на сегодняшний день иммунохроматографические тесты для одновременной детекции двух и более фикотоксинов. В данном исследовании впервые проведена разработка и характеристика тест-системы для одновременного выявления двух приоритетных фикотоксинов – микроцистина и домоевой кислоты.

### **Материалы и методы**

В работе использовали золотохлористоводородную кислоту (ЗХВК), ДК, Тритон X-100 (*Sigma-Aldrich*, США), МЦ (*Enzo Life Science*, Швейцария), моноклональные антитела к МЦ (*Eximio Biotec*, Китай), конъюгат МЦ с бычьим сывороточным альбумином (МЦ–БСА, *Unibiotest*, Китай), антитела козы против иммуноглобулинов мыши (АК), антитела осла против иммуноглобулинов козы (АО, *Arista Biologicals*, США), моноклональные антитела к ДК (Центр молекулярной диагностики и лечения, Россия). Конъюгат ДК с БСА синтезировали карбодимидным методом [7]. Наночастицы золота (НЧЗ) синтезировали восстановлением ЗХВЧ цитратом натрия [8]. Конъюгаты АК–НЧЗ получали адсорбционной иммобилизацией по методике, описанной в работе [9].

Для изготовления иммунохроматографических тест-систем использовали нитроцеллюлозную рабочую мембрану *CNPC-SS15* на пластиковой подложке, мембрану под образец *GFB-R4* и впитывающую мембрану *APO45* (*Advanced Microdevices*, Индия). Тестовые (Т) зоны формировали, нанося на рабочую мембрану МЦ–БСА и ДК–БСА (0,5 мг/мл) в 50 мМ фосфатно-солевом буфере, содержащем 100 мМ *NaCl*, pH 7.4 (ФСБ), с помощью автоматического диспенсера *Iso-Flow* (*Imagene Technology*, США). Контрольную (К) зону формировали нанесением АО в ФСБ (0,15 мг/мл). Мультимембранный композит нарезали на тест-полоски шириной 3 мм с помощью автоматической гильотины (*KinBio*, Китай).

Для реализации ИХА смешивали 25 мкл раствора МЦ (0,5 пг/мл – 10 нг/мл в ФСБ, содержащем 0,05% Тритон Х-100 (ФСБТ)), 25 мкл раствора ДК (0,1 нг/мл – 2 мкг/мл в ФСБТ), 25 мкл антител против МЦ (0,39 мкг/мл), 25 мкл антител против ДК (0,22 мкг/мл) и 5 мкл АК–НЧЗ (с оптической плотностью (ОП) при 520 нм, равной 15). После 3 мин инкубации смеси при комнатной температуре опускали в нее тест-полоску и инкубировали 15 мин. Затем тест-полоски извлекали, сканировали и определяли интенсивность окрашивания зон с помощью программы *TotalLab* (Великобритания). Графики интенсивности окрашивания Т-зон в зависимости от концентрации фикотоксина были построены с использованием программного обеспечения *Origin (OriginLab, США)*. Визуальный и инструментальный пределы обнаружения (ПрО), а также рабочие диапазоны определяемых концентраций оценивали, как описано в [10].

### Результаты и обсуждение

**Получение и характеристика иммунореагентов.** В качестве метки в ИХА были использованы НЧЗ. Просвечивающая электронная микроскопия показала, что синтезированные НЧЗ характеризовались средним диаметром  $31.2 \pm 2.9$  нм. Белковый конъюгат ДК, полученный карбодиимидным методом, характеризовали спектрально. Наличие пиков, характерных для гаптена и белка, подтвердило успешное комплексообразование. Иммунные свойства антител к МЦ и ДК были охарактеризованы методом непрямого конкурентного иммуноферментного анализа. Препараты антител и белковые конъюгаты фикотоксинов позволили детектировать МЦ и ДК с ПрО 0.01 нг/мл и 180 нг/мл, соответственно (данные не представлены).

Методом физической адсорбции были получены конъюгаты НЧЗ с АК. Оптимальную концентрацию антител для конъюгирования определяли с помощью флокуляционной кривой – зависимости ОП580 НЧЗ от концентрации антител в присутствии коагулянта. Для конъюгации была выбрана концентрация АК, равная 6 мкг/мл, которая соответствует нижнему плато ОП580, свидетельствующему о стабилизации поверхности НЧЗ адсорбированными иммуноглобулинами.

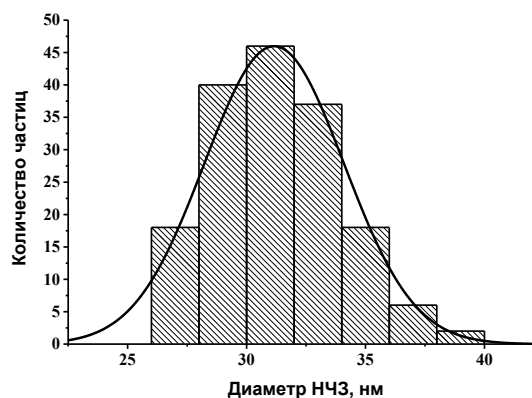
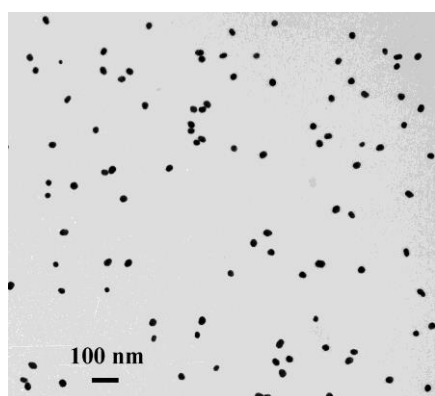


Рисунок 1. Микрофотография НЧЗ и гистограмма их распределения по диаметру.

**Разработка двойного ИХА МЦ и ДК.** Для реализации непрямого конкурентного ИХА МЦ и ДК получали иммунохроматографические тест-полоски с двумя Т-зонами на рабочей мембране. Сначала специфические антитела и конъюгат АК–НЧЗ добавляли в тестируемую пробу и инкубировали, а затем тест-полоску инкубировали с реакционной смесью. При отсутствии фикотоксинов в пробе образуются двойные комплексы антитело–АК–НЧЗ, которые двигаются с током жидкости в Т-зоны и взаимодействуют с иммобилизованными конъюгатами фикотоксин–белок, образуя окрашенные линии. Избыток конъюгата АК–НЧЗ связывается с АО, иммобилизованными в К-зоне, также образуя окрашенную линию. Наличие ДК и(или) МЦ в пробе приводит к их взаимодействию со специфическими антителами (с образованием тройного комплекса фикотоксин–антитело–АК–НЧЗ), что препятствует связыванию антител с конъюгатами фикотоксинов в Т-

зонах. Таким образом, интенсивность окрашивания в Т-зонах убывает пропорционально возрастанию концентрации фикотоксинов в пробе.

Двойной ИХА был оптимизирован с целью достижения минимальных ПрО МЦ и ДК при высоких аналитических сигналах. Для этого варьировали расположение Т-зон на рабочей мембране, концентрации реагентов и время стадий ИХА. Установлено, что указанные требования достигаются при следующем расположении зон (по направлению латерального потока): Т1-зона (ДК–БСА) → Т2-зона (МЦ–БСА) → К-зона. Оптимальные концентрации анти-МЦ и анти-ДК антител составляли 0,39 и 0,22 мкг/мл, объем АК–НЧЗ – 5 мкл, время предынкубации реакционной смеси – 3 мин, время инкубации с ней тест-полоски – 15 мин. Концентрации иммобилизуемых белковых конъюгатов фикотоксинов составляли 0,5 мг/мл, а АО в К-зоне – 0,15 мг/мл.

Калибровочные кривые МЦ и ДК, полученные в оптимизированных условиях, и изображения соответствующих тест-полосок представлены на рисунке 2. Согласно полученным данным, инструментальные ПрО ДК и МЦ составляют 2 и 0,05 нг/мл, визуальные ПрО – 80 и 0,3 нг/мл, рабочие диапазоны определяемых концентраций – 5,1–112,6 и 0,08–0,28 нг/мл, соответственно.

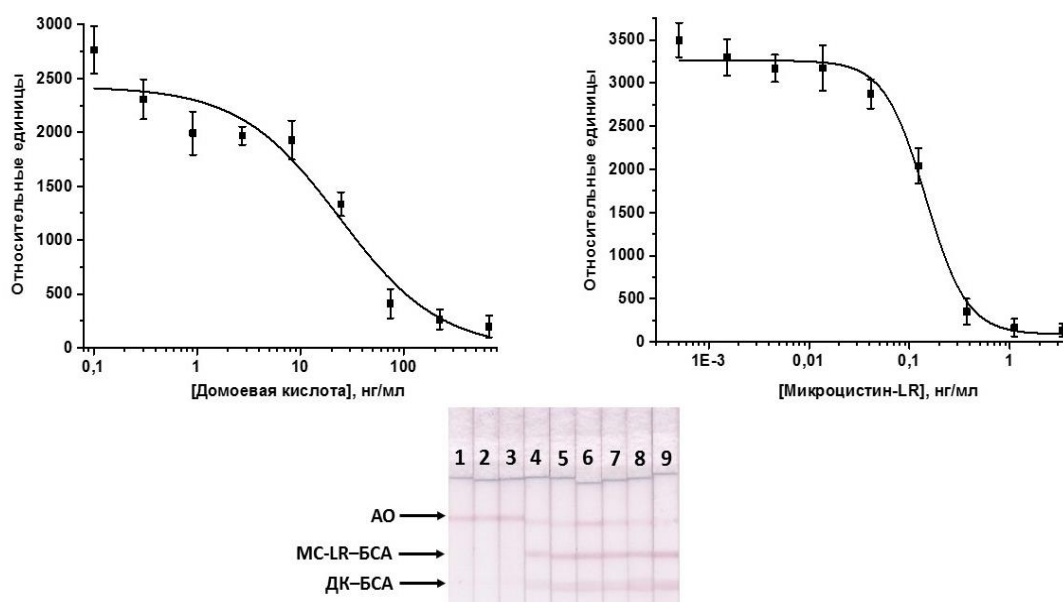


Рисунок 2. Калибровочные кривые ДК и МЦ в ИХА и внешний вид тест-полосок. Концентрации ДК/МЦ: 1 – 667/3,3; 2 – 222/1,1; 3 – 74/0,37; 4 – 24,7/0,12; 5 – 8,2/0,04; 6 – 2,7/0,01; 7 – 0,91/4,57 × 10<sup>-3</sup>; 8 – 0,30/1,52 × 10<sup>-3</sup>; 9 – 0,10/5,1 × 10<sup>-4</sup> нг/мл.

**Определение МЦ и ДК в морской воде.** Пробы морской воды отбирали в Эгейском море. Определена процедура пробоподготовки морской воды, направленная на минимизацию матричного эффекта. Показано, что данное условия достигается при добавлении в морскую воду 0,05% детергента Тритона X-100 с последующим разбавлением смеси в 10 раз ФСБТ. Изображения тест-полосок после детекции ДК и МЦ в морской воде представлены на рисунке 3.



Рисунок 3. Вид тест-полосок после двойного ИХА ДК и МЦ в морской воде. Концентрации добавленных в воду ДК/МЦ: 1 – 667/3,3; 2 – 222/1,1; 3 – 74/0,37; 4 – 24,7/0,12; 5 – 8,2/0,04; 6 – 2,7/0,01; 7 – 0,91/4,57 × 10<sup>-3</sup>; 8 – 0,30/1,52 × 10<sup>-3</sup>; 9 – 0,10/5,1 × 10<sup>-4</sup>; 0,03/1,7 × 10<sup>-4</sup> нг/мл.

**Выводы**

Впервые разработан чувствительный и экспрессный ИХА, позволяющий проводить одновременное определение двух фикотоксина – ДК и МЦ. Показана применимость тест-системы для детекции фикотоксинов в пробах морской воды. Универсальность предложенного подхода позволяет использовать его для мониторинга различных токсикантов, в том числе, фикотоксинов, в водных объектах.

**Заключение**

Полученные результаты демонстрируют потенциал ИХА как экспрессного метода обнаружения фикотоксинов. Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

- разработана двойная иммунохроматографическая тест-система для простого и быстрого одновременного обнаружения ДК и МЦ с инструментальными ПрО 2 и 0,05 нг/мл; время анализа составляет 18 мин;
- показана перспективность разработанной тест-системы для скринингового контроля контаминации морской воды фикотоксинами ДК и МЦ.

**Список литературы**

1. Louzao M.C., Vilariño N., Vale C., Costas C., Cao A., Raposo-Garcia S., Vieytes M.R., Botana L.M. Current trends and new challenges in marine phycotoxins // *Marine Drugs*. 2022. V. 20. P. 198.
2. Murk A.J., Nicolas J., Smulders F.J.M., Burk C., Gerssen A. Marine biotoxins: types of poisoning, underlying mechanisms of action and risk management programmes // *Food safety assurance and veterinary public health, Chemical Hazards in foods of animal origin*. 2019. V. 7. P. 207-239.
3. Lefebvre K.A., Robertson A. Domoic acid and human exposure risks: A review // *Toxicon*. 2010. V. 56 (2). P. 218-230.
4. Arman T., Clarke J.D. Microcystin toxicokinetics, molecular toxicology, and pathophysiology in preclinical rodent models and humans // *Toxins*. 2021. V. 13 (8). Article 537.
5. Luckas B., Erler K., Krock B., Analysis of marine biotoxins using LC-MS/MS // *Methods of Molecular Biology*. 2015. V. 1308. P. 277-297.
6. Dillon M., Zaczek-Moczydlowska M.A., Edwards C., Turner A.D., Miller P.I., Moore H., McKinney A., Lawton L., Campbell K. Current trends and challenges for rapid smart diagnostics at point-of-site testing for marine toxins // *Sensors*. 2021. V. 21(7). Article 2499.
7. Finlay W.J.J., Shaw I., Reilly J.P., Kane M. Generation of high-affinity chicken single-chain Fv antibody fragments for measurement of the *Pseudonitzschia pungens* toxin domoic acid // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. V. 72(5). P. 3343–3349.
8. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Natural Physical Science*. 1973. V. 241. P. 20-22.
9. Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic test systems for detection of microcystin-LR in seafood // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. V. 57 (3). P. 403-409.
10. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Shanin I.A., Zherdev A.V., Tarannum N., Dzantiev B.B. Highly sensitive immunochromatographic detection of antibiotic ciprofloxacin in milk // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. V. 54 (6). P. 670-676.

**Сведения об авторах**

**Ольга Дмитриевна Гендриксон**

канд. хим. наук, ст. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** odhendrick@gmail.com

**Information about authors**

**Olga Dmitrievna Hendrickson**

PhD, Senior researche

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

**E-mail:** odhendrick@gmail.com

**Елена Анатольевна Зверева**

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** zverevaea@yandex.ru

**Анатолий Виталиевич Жердев**

канд. биол. наук, вед. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** zherdev@inbi.ras.ru

**Борис Борисович Дзантиев**

доктор хим. наук, зав. лаб.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** dzantiev@inbi.ras.ru

**Elena Anatolievna Zvereva**

PhD, Senior researcher

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

**E-mail:** zverevaea@yandex.ru

**Anatoly Vitalievich Zherdev**

PhD, Leading researcher

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

**E-mail:** zherdev@inbi.ras.ru

**Dzantiev Boris Borisovich**

Dr. of Chem. sciences, professor, Head of Laboratory

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

**E-mail:** dzantiev@inbi.ras.ru

УДК 613.29; 615-07

ГРНТИ 613.29, 615.07

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.57-63

<sup>1,2</sup>О. В. Багрянцева, <sup>1</sup>З. Г. Гурэу

<sup>1</sup>ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

<sup>2</sup>ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова  
Минздрава России

## ВОПРОСЫ АНАЛИЗА РИСКОВ ЗДОРОВЬЮ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ, ПОЛУЧАЕМОЙ МИКРОБНЫМ СИНТЕЗОМ

*В статье приведены предложения по порядку проведения анализа рисков технологических штаммов микроорганизмов и пищевой продукции, получаемой с их использованием, на основе данных полученных в экспериментах in vivo и in vitro.*

**Ключевые слова:** анализ рисков, пищевая продукция, микробный синтез, штаммы-продуценты

<sup>1,2</sup>Olga V.Bagryantseva, <sup>1</sup>Zinaida G.Gureu

<sup>1</sup>Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology  
<sup>2</sup>First Moscow, State Medical University. I.M. Sechenov of Health Ministry

## ISSUES OF HEALTH RISK ANALYSIS OF FOOD OBTAINED BY MICROBIAL SYNTHESIS

*The article provides suggestions on the procedure for conducting risk analysis of technological strains of microorganisms and food obtained with their use, based on data from in vivo and in vitro experiments.*

**Keywords:** risk analysis, food, microbial synthesis, strains-producer

В настоящее время в пищевой промышленности все большее применение находят пищевые ингредиенты, производимые с использованием мутантных и/или генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов (ГММ), которые значительно повышают

выход получаемой продукции и улучшают их потребительские свойства. Вместе с тем, изменения в последовательности нуклеотидов ДНК и РНК у таких микроорганизмов может привести к продукции различных изоформ белков, то есть к изменению их конфигурации и свойств. Кроме того, микроорганизмы, используемые в производстве пищевой продукции, способны продуцировать токсины и вторичные метаболиты. Доказана возможность включения факторов антибиотикорезистентности в ДНК таких микроорганизмов и их живых форм и/или их генетического материала в готовой продукции при ее недостаточной очистке. В этой связи, в процессе микробного синтеза разрешено использовать только штаммы (технологические микроорганизмы), в отношении которых доказана возможность их безопасного применения в пищевой промышленности. [1-4].

В качестве методик анализа рисков использования пищевой продукции, все большую актуальность представляют альтернативные классическим экспериментальным методам с использованием животных [5], модели с применением культур клеток *in vitro*. В некоторых случаях производители предлагают для размещения на рынках Российской Федерации (РФ) и Евразийского экономического союза (ЕАЭС) продукты анализ возможного использования которых в пищевой промышленности проводился только на основе данных полученных в экспериментах на культурах клеток. Такие модели позволяют решить этические вопросы, связанные с массовым использованием и гибелью лабораторных животных, сокращают сроки исследования, а также установить тенденцию влияния изучаемых токсических веществ на клеточном уровне. Преимущество моделей *in vitro* также заключается в возможности работы с использованием клеток человека, что делает возможным (в некоторой степени) проектировать полученные данные на организм человека. Кроме того, использование культур клеток дает возможность установить характер биологической активности изучаемых соединений на клеточном уровне и учесть сложные синергические и/или разнонаправленные эффекты смесей химических соединений [6,7]. Вместе с тем, невозможность экстраполяции полученных в экспериментах *in vitro* данных на организм в целом, а также оценки их действия на метаболические процессы, делает необходимым обоснование интегрированного подхода анализа рисков такой пищевой продукции, с использованием *методов in vitro u in vivo* [6, 8].

### **Цель**

Актуализация алгоритма оценки риска здоровью населению пищевой продукции, получаемой с использованием микробного синтеза в экспериментах *in vivo u in vitro*.

### **Материалы и методы**

В ходе выполнения исследований проведен анализ и обобщение данных опубликованных в реферативных базах данных *Scopus*, *Web of Science*, *PubMed*, РИНЦ, а также положений отечественных и международных нормативных и законодательных документов.

### **Основные результаты и обсуждение**

В развитых странах процедура анализа рисков включает необходимость исследования безопасности всех видов пищевой продукции, производимой с использованием микробного синтеза [1-3]. В международной практике протоколы подтверждения безопасности пищевой продукции, полученных микробным синтезом, включают методы *in vivo* с использованием экспериментальных животных и *in vitro* с использованием культур клеток. Общие требования к проведению таких исследований были разработаны Организацией экономического сотрудничества и развития (*OECD*) и утверждены Международным комитетом экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (*JECFA*), РФ, Европейским агентством по безопасности пищевой продукции (*EFSA*), [3,5,9-11]. Выполнение требований протоколов *OECD* предусматривает необходимость проведения анализов, включающих определение генотоксичности, мутагенности, хромосомных аббераций и др.

[<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforhetestingofchemicals.htm>].

При этом, методы *in vitro*, предусматривающие анализ воздействия химических веществ на культуры клеток, в настоящее время в РФ не распространяются на пищевую продукцию:

- мутации репортерных генов (генетических маркеров), в частности эндогенных гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (*Hprt* - в клетках грызунов, *HPRT*) и трансгена ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (*gpt*) (*XPRT*) исследуются с использованием клеточных линий человека [12-14].

- микроядерный тест *in vitro* (МЯТ) – включает метод оценки генотоксичности по выявлению микроядер в цитоплазме интерфазных клеток млекопитающих *in vitro*. Метод оценивает кластогенную и анеугенную активность химических веществ в клетках, которые проходят клеточное деление во время или после экспозиции исследуемого вещества [15, 16].

- исследование хромосомных aberrаций костного мозга млекопитающих важно для оценки генотоксичности в условиях *in vivo* и *in vitro*. Имеются убедительные доказательства того, что хромосомные aberrации приводят к изменениям в онкогенах и генах-супрессорах опухолей, которые, в свою очередь, вызывают рак в экспериментальных системах и у людей [17,18].

Является также важным проведение исследований влияния пищевой продукции нового вида на иммунный статус организма, а именно уровень содержания цитокинов и хемокинов (*IL-1*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*, *INF- $\alpha$* , *TNF- $\alpha$* , *MCP-1*, *MIP-1a*), показатель *RANTES* (регулятор активности нормальной экспрессии и секреции Т-клеток), иммунные сигнальные каскады, апоптоз клеток [7, 8, 19].

Высокая вероятность влияния продукции микробного синтеза на микробиом, делает необходимым оценку их воздействия на качественный и количественный состав микробиоценоза кишечника в условиях *in vivo*, в том числе с использованием клеточных моделей оценки проницаемости кишечного барьера [20, 21].

Следовательно, является важным использование методов *in vitro* при оценке рисков здоровью пищевой продукции. Вместе с тем, следует учесть факт того, что эти тесты обычно требуют использования экзогенного источника метаболической активации, за исключением клеток, которые метаболически компетентны в отношении исследуемых соединений. Система метаболической активации не может полностью воспроизводить условия, присутствующие у млекопитающих *in vivo* [8,16]. Таким образом, полученные *in vitro* данные об отсутствии рисков использования в пищевой промышленности, как штаммов-продуцентов, так и синтезируемых ими пищевых веществ, должны быть подтверждены в экспериментах *in vivo*, поскольку в условиях *in vitro* невозможно воспроизвести гомеостатические процессы, протекающие в закрытой системе живого организма и, таким образом, получить интегральные данные их влияния на организм.

Штаммы-продуценты пищевой продукции должны пройти оценку их патогенности и вирулентности, токсигенности, способность к продукции антибиотиков, а также диссеминации внутренних органов. Пищевая продукция микробного синтеза в обязательном порядке должна проверяться на отсутствие ДНК штамма-продуцента, ДНК маркеров антибиотикоустойчивости и ДНК селективных маркерных генов [22-25].

Порядок оценки рисков пищевой продукции в РФ и ЕАЭС с использованием методов *in vivo* приведен в [26]. Вместе с тем, в последние годы показано, что порядок исследования токсичности продукции микробного синтеза должен учитывать химические свойства продуцируемых веществ [27,29]. В процессе проведения анализа рисков здоровью такой пищевой продукции представляется важным определение биомаркеров токсичности в зависимости от вида пищевой продукции и технологического микроорганизма [30].

Анализ имеющихся данных и результаты проводимых ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» исследований свидетельствуют о том, что процедура анализа рисков штаммов-продуцентов нового вида, наличие или отсутствие у них встроенных локусов

ДНК, должна включать их идентификацию до вида/штамма по фенотипическим и генотипическим свойствам, в том числе с использованием методов ПЦР анализа и секвенирования ДНК с учетом сведений, приведенных в международных базах об их таксономической принадлежности и токсигенных свойствах. В процессе оценки безопасности штаммов нового вида, требуется проведение комплекса экспериментов *in vivo* и *in vitro* по определению их вирулентности, патогенности, способности к диссеминации внутренних органов, аллергенности, генотоксичности, мутагенной активности, а также анализов по выявлению способности у штаммов к продукции метаболитов (токсинов, антибиотиков и др.), оказывающих негативное воздействие на организм, наличие у них детерминант антибиотикоустойчивости. С целью соблюдения принципа «один штамм - один продукт» штамму, прошедшему процедуру оценки рисков, должен быть присвоен индивидуальный код-номер [4, 31, 32].

С учетом международных требований [1-4, 33] ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» были разработаны предложения по актуализации процедуры проведения оценок рисков пищевой продукции, получаемой с использованием микробного синтеза (Рис. 1).

Рисунок 1 – Схема оценки рисков пищевых ингредиентов, получаемых с использованием микробного синтеза.



### Выводы

Анализ рисков пищевой продукции нового вида получаемой при помощи микробного синтеза должен основываться на результатах их острой и подострой (в течение 90 дней) токсичности, полученных в экспериментах *in vivo*, а именно их влияние на физический статус животных, гематологические, биохимические показатели крови, способность вызывать апоптоз гепатоцитов, влияние на иммунный статус организма и микробиоценоз кишечника. Кроме того, следует учесть, что перечень показателей безопасности этой пищевой продукции должен включать исследования потенциальной цитотоксичности, нейротоксичности, эмбриотоксичности, генотоксичности, мутагенной активности и др., с использованием культур животных клеток.

В производстве такой пищевой продукции должны использоваться только безопасные для здоровья человека технологические микроорганизмы. Их идентификацию до вида/штамма (в случае с ГММ наличие генетической вставки) необходимо проводить по фенотипическим и генотипическим свойствам, в том числе с использованием методов ПЦР анализа и секвенирования ДНК. Данная продукция не должна содержать в составе живых клеток штаммов-продуцентов и их ДНК/РНК, токсинов (бактериальных токсинов или микотоксинов, в случае использования в технологическом процессе плесневых грибов), антибиотиков. Необходимость проведения этих исследований обоснована тем, что ДНК и/или РНК штамма, продуцируемые им токсины могут, в случае нарушения технологического процесса, присутствовать в готовом продукте.



### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются положения о порядке проведения анализа рисков технологических штаммов микроорганизмов и пищевой продукции, получаемой с их использованием, на основе данных *in vivo* и *in vitro* экспериментов.

**Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (тема №0410-2022-0003).**

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

1. *Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use //CAC/GL 46-2003, 13 P.; <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>*
2. *Analysis of JECFA's draft guideline on "Evaluation of enzyme preparations used in the manufacture of foods"//EFSA Supporting publication 2020:EN-1795; doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1795;*
3. *Younes M., Aggett P., Aguilar F. et al. Guidance on safety evaluation of sources of nutrients and bioavailability of nutrient from the sources (Revision 1) //EFSA Journal 2021;19(3):6552; doi: 10.2903/j.efsa.2021.6552*
4. *Allende A., Bolton D. et al. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 7: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2017. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards) // EFSA J. 2018a. Vol. 16. P. 43.URL: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5131>*
5. *OECD guideline for the testing of chemicals Repeated dose 90 day oral toxicity study in rodents. OECD/OCDE. 408 Adopted: 25 June 2018. 16 p.// <http://www.oecd.org/termsand-conditions/>.*
6. *Lama S., Merlin-Zhang O., Yang C. In Vitro and In Vivo Models for Evaluating the Oral Toxicity of Nanomedicines// Nanomaterials 2020, 10, 35 p., 2177; doi:10.3390/nano10112177*
7. *Фреши Р. Я. Культура животных клеток [Электронный ресурс] : практическое руководство / пер. 6-го англ. изд. — 4-е изд., испр. и доп. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 791 с.). - М. : Лаборатория знаний, 2018. — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10". ISBN 978-5-00101-557-4*
8. *Багрянцева О.В., Гмошинский И.В., Шипелин В.А. с соавт. Оценка рисков для здоровья ферментного препарата - комплекса глюкоамилазы и ксиланазы из *Aspergillus awamori* Xyl T-15 //Вопросы питания. 2021. Т. 90, № 3. С. 28-39. DOI: <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-3-28-39>*
9. *Межгосударственный стандарт. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке репродуктивной/онтогенетической токсичности (скрининговый метод) ГОСТ 32379-2020*
10. *Межгосударственный стандарт. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсibilизации методом изучения реакции региональных лимфатических узлов ГОСТ 34556-2019*
11. *Межгосударственный стандарт. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении. ГОСТ 34557-2019.*
12. *OECD Guideline for the testing of chemicals. In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes, OECD/OCDE, 476 Adopted:29 July 2016, 18 p.;*
13. *Межгосударственный стандарт. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Метод оценки генных мутаций на клетках млекопитающих *in vitro*, ГОСТ 32638-2020.*

14. Государственный стандарт. Руководство по применению критериев классификации опасности химической продукции по воздействию на организм Мутагенность ГОСТР 57454- 2017
15. OECD Guideline for the testing of chemicals. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD/OCDE, 487 Adopted: 29 July 2016, 29 p., OECD Guideline for the testing of chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. 474 Adopted: 21st July 1997. 10 p.
16. Межгосударственный стандарт. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Микроядерный тест на клетках млекопитающих in vitro. ГОСТ 32635-2014
17. OECD Guideline for the testing of chemicals. In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test, OECD/OCDE, 473 Adopted: 29 July 2016, 22 p.; OECD Guideline for the testing of chemicals. Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test, OECD/OCDE, 475 Adopted: 21st July 1997, 8 p.
18. Межгосударственный стандарт. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Оценка хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих. ГОСТ 34659-2020
19. Dhanwani R., Takahashi M., Mathews I. T., Lenzi C., Romanov A. et al. Cellular sensing of extracellular purine nucleosides triggers an innate IFN- $\beta$  response. SCIENCE ADVANCES. 2020; 6 15 p.: eaba3688 22 July 2020
20. Barko P.C., McMichael M.A., Swanson K.S., Williams D.A. The Gastrointestinal Microbiome: A Review//J Vet Intern Med 2018;32:9–25; DOI: 10.1111/jvim.14875
21. Schoultz I., Keita A.V. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability//Cells 2020, 9, 1909; 30 p., doi:10.3390/cells9081909
22. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use//EFSA Journal.-V. 2011; V.9(6):2193; <http://www.efsa.europa.eu/>
23. Методические указания МУК 4.2.2305-07. Определение генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генно-инженерно-модифицированные аналоги, в пищевых продуктах методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и ПЦР с электрофоретической детекцией;
24. Методические указания. МУК 2.3.2. 1830-04. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов;
25. Багрянцева О.В., Шевелева С.А Вопросы обеспечения безопасного использования технологических микроорганизмов в пищевой промышленности// «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Материалы Международной конференции NT + M&Eс`2020, Весенняя сессия, Гурзуф, 31 мая-10 июня 2021 г., с. 198-205
26. Методические указания по установлению и обоснованию гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска для здоровья человека. Евразийская экономическая комиссия-2020. 100 с. // <http://www.eurasiancommission.org/ru/nae/news/Pages/26-02-2020-5.aspx>
27. Cerimi K., Jackel U., Meyer V., Daher U., Reinert J., Klar S. In Vitro Systems for Toxicity Evaluation of Microbial Volatile Organic Compounds on Humans: Current Status and Trends. J. Fungi. 2022, 8, 75. <https://doi.org/10.3390/jof8010075>;
28. Hartwig A., Arand M., Epe B., Guth S., Jahnke G., et al. Mode of action-based risk assessment of genotoxic carcinogens//Archives of Toxicology. 2020. 94:1787–1877 <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02733-2>
29. Li K.J., Brouwer-Brolsma E.M., Burton-Pimentel K.J., Vergeres G., Feskens E.J.M. A systematic review to identify biomarkers of intake for fermented food products// Genes & Nutrition (2021) 16:5, 17 p., <https://doi.org/10.1186/s12263-021-00686-4>
30. Evaluation of existing guidelines for their adequacy for the microbial characterisation and environmental risk assessment of microorganisms obtained through synthetic Biology// EFSA Journal 2020;18(10):6263; doi: 10.2903/j.efsa.2020.6263

31. Багрянцева О.В. Обоснование необходимости разработки мероприятий по управлению рисками, связанными с использованием пищевой продукции, производимой при помощи микробного синтеза// Вопросы питания. 2020. Том 89. № 2. С. 64–76. doi: 10.24411/0042-8833-2020-10017
32. Guidance on date marking and related food information: part 2 (food information)// EFSA Journal 2021;19(4):6510; doi: 10.2903/j.efsa.2021.6510

**Сведения об авторах**

**Ольга Викторовна Багрянцева**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

профессор кафедры гигиены питания и токсикологии

профессор кафедры гигиены питания и токсикологии

ИПО ФГАОВ ВО

Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова Минздрава России

Москва, Россия

**E-mail:** [bagryantseva@ion.ru](mailto:bagryantseva@ion.ru)

**Зинаида Геннадиевна Гурзу**

аспирант

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,

Москва, Россия

Устьинский пр-д, д.2/14,

**E-mail:** [gurzinaida1395@gmail.com](mailto:gurzinaida1395@gmail.com)

**Information about authors**

**Olga V. Bagryantseva**

Dr of Biological Sciences,

Leading Researcher of Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology, ,

Moscow; Russia

Ustinskui pr. H. 2/14

First Moscow State Medical University. I.M. Sechenov of Health Ministry,

Moscow, Russia

**E-mail:** [bagryantseva@ion.ru](mailto:bagryantseva@ion.ru)

**Zinaida G. Gureu**

postgraduate

Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology

Moscow; Russia

Ustinskui pr. H. 2/14

**E-mail:** [gurzinaida1395@gmail.com](mailto:gurzinaida1395@gmail.com)

УДК 574 +632.727

ГРНТИ 34.33.02, 68.37.29

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.63-68

**Я. В. Саванина**

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

## БОРЬБА С САРАНЧОЙ ПЕРЕЛЕТНОЙ С УЧЕТОМ ЕЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ

В статье рассматривается саранча перелетная – видовой состав, биологические особенности, включая фазовую изменчивость, зависимость от абиотических и биотических факторов среды, роль в экосистеме. Анализируются методы борьбы с данным вредителем с учетом перечисленного. Оценивается возможность использования саранчи как ресурса — сезонного, но достаточно обильного и предсказуемого.

**Ключевые слова:** *Locusta migratoria L.*, *Schistocerca gregaria Forsk*, биологические инсектициды, феромоны, аттрактанты, серотонин.

**Y. V. Savanina**

M.V.Lomonosov Moscow State University

## FIGHT AGAINST THE MIPATIENT LOCUST WITH TAKING INTO ACCOUNT ITS BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

The article discusses the migratory locust - species composition, biological features, including phase variability, dependence on abiotic and biotic environmental factors, role in the ecosystem. The methods of combating this pest are analyzed, taking into account the above. The possibility of using locusts as a resource is assessed, seasonal, but quite plentiful and predictable.

**Keywords:** *Locusta migratoria L.*, *Schistocerca gregaria Forsk*, biological insecticides, pheromones, attractants, serotonin

### Введение

Саранчовые (*Acridoidea*) – довольно крупные насекомые, принадлежащие к отряду прямокрылых (*Orthoptera*). Их ближайшие родственники – всем известные кузнечики и сверчки, а также мелкие обитатели растительной подстилки (триперсты). Понятие «саранча» — собирательное, основными видами являются перелетная саранча (*Locusta migratoria L.*) и пустынная саранча (*Schistocerca gregaria Forsk.*) (реже саранча марокканская, итальянский прус и пр.). Их особенность – ярко выраженная фазовая изменчивость. Это означает, что особи одиночной и стадной фазы численности заметно отличаются друг от друга по внешнему виду. Особи стадной формы отличаются более темной (яркой) окраской, более длинными крыльями и лучшим развитием мускулатуры. У них более интенсивный обмен веществ, очень высокая двигательная активность и, самое главное, стремление образовывать скопления [1, 2].

### Цель работы

Проанализировать различные методы борьбы с саранчой перелетной с учетом их эффективности и воздействия на экосистему.

Саранча относится к насекомым с неполным превращением. Это означает, что она проходит лишь три стадии развития: яйцо — личинку — имаго (взрослое насекомое). У взрослых и личинок насекомых с неполным превращением — сходный спектр питания (сравнить с гусеницей и бабочкой), личинки саранчи по внешнему виду похожи на взрослых насекомых, но летать не могут. Личинки растут и после последней, пятой линьки, окрыляются, превращаясь во взрослое насекомое. Самка саранчи откладывает 300-1200 яиц за раз. Живет насекомое до 2 лет, за одно лето могут вырасти до 3-х поколений [1, 2].

Изучением саранчовых занимаются во всех странах мира и особенно там, где эти насекомые имеют хозяйственное значение, главным образом в плане борьбы с ней (*Таблица 1*) и предсказания возможных нашествий. В середине XX в. было установлено, что в периоды между вспышками численности мигрирующие виды саранчовых существуют в небольших количествах, на весьма ограниченной территории, и представлены они только одиночными формами. Миграция — это одна из форм приспособления саранчовых к существованию в условиях жаркого климата, точнее, климата с жарким вегетационным периодом. Вспышки численности саранчи наблюдались с давних времен как раз в тех регионах, которые были древнейшими очагами земледелия (Северная Африка, Передняя Азия) - в южных и умеренных широтах с резко континентальным климатом, где наблюдается значительная разница между дневными и ночными температурами. Из ближайших это Казахстан и области юга России: Дагестан, Чечня, Ставропольский край, Калмыкия, Астраханская область, Башкирия, Южный Урал, Оренбургская область, Алтайский край. Основное нашествие – июнь, возможен второй пик – осенью, с падением уровня воды в реках.[1, 3]. Ранее скопления и миграция саранчи фиксировались раз в 10-15 лет, в засушливые годы. Основное нашествие – июнь, возможен второй пик – осенью, с падением уровня воды в реках. На фоне климатических изменений данное явление наблюдается значительно чаще: [3, 4].

Таблица 1

Способы борьбы с саранчой.

Методы	Эффективность/недостатки) (+/-)
<b>1.Исторические</b> (до начала XX в) отпугивание (шум, дымовая завеса) заградительные мероприятия (рвы до 3 м в ширину до 2 – в глубину). механическое уничтожение выжигание мест залежей яицекладок	+ +/-, спорная, развивающиеся организмы часто располагаются на глубине более 5 – 7 см, тепло от сжигаемой соломы до них не доходит.
<b>2. Химические</b> (до 80% всех мероприятий) распыление приманки (отруби, жмых) с инсектицидом [1, 3, 5].	+/-: высокая, но сопряжена со значительными экологическими проблемами. + менее опасны

Методы	Эффективность/недостатки ) (+/-)
<b>3.Агротехнические [5]</b> осенняя глубокая вспашка, лущение, боронование,..культивирование высев по периметру поля (зерновых) стометровых полос из технических культур. освоение целины, уход за лесополосами, борьба с сорняками, избавление от растительных остатков.	+. помогает уничтожить огромное количество кубышек саранчи + +, сокращение возможных мест откладки яиц (распашкой тростниковых плавней была практически полностью ликвидирована опасность массового лета саранчи на территории Советской Украины.
<b>4. Биологические [ 6, 7 ].</b> Естественные враги <i>Хищники, патогены, паразитоиды</i> Биопрепараты репелленты, аттрактанты * феромоны пищевые	+ + +, + +/-, эффективнее для менее массовых вредителей, +

\*свет, ультрафиолет – также привлекает насекомых.

В нашей стране **химическая** обработка посевов (распыление химикатов, в том числе – с использованием авиации). (Табл., п 2) позволяет предотвратить ущерб сельскохозяйственному производству на сумму свыше 100 млрд. р./год. Нашествия саранчи приносят убытки не только из-за уничтоженных посевов и пастбищ, но и за счет вложенных средств на борьбу с ней. По данным Минсельхоза РФ, в 2008-2016 гг. на закупку препаратов против саранчи и других вредителей было выделено 295,2 млн. р. Дополнительно выделяются средства из региональных бюджетов (в 2018 г. – 52 млн. р.). Участвуют в борьбе и сами сельхозпроизводители, которые также покупают препараты, а к обработке посевов привлекается авиация и наземная техника. [3, 5].

Основные разработки для минимизации «сопутствующего ущерба» экосистемам (в первую очередь это относится к гибели других беспозвоночных) связаны со снижением общей токсичности и эффективных доз новых инсектицидов: у нас используют водные растворы, но существуют и ультрамалообъемные опрыскиватели (УМО), распыляющие концентрированные растворы в масле, что позволяет снизить расход препарата и обрабатываемые площади. Наиболее эффективна обработка в весенне-летний период, когда их личинки еще находятся в ранних возрастах и есть возможность обрабатывать не сразу всю зараженную площадь, а только те участки, куда саранча в это время мигрирует [1]. Борьба с саранчой осложняется тем, что осенью кубышки («домики» для личинок) откладываются на территориях особо охраняемых земель, заповедных зон. Весной, когда начинается отрождение личинок, вести обработку на этих землях не разрешается. [3, 4].

Соединения мышьяка, ДДТ и ГХЦГ сменились более современными препаратами.

*Фосфорорганические соединения и карбаматы:* применяются в больших дозах (>200 г действующего вещества/га), срок действия - всего несколько суток. Значительное падение численности саранчи наблюдается примерно на 2-е сут., препараты опасны для других членистоногих (включая водных) и сравнительно мало - для позвоночных. *Синтетические пиретроиды* применяются в низких дозах (10-20 г /га), эффект очевиден уже через несколько часов, но при необходимости снижения численности личинок старших возрастов и взрослых количество вносимого препарата приходится увеличивать. Опасны для всех членистоногих (особенно водных), некоторые - и для млекопитающих.

Борьбу с саранчой надо начинать как можно раньше – пока сами личинки мелкие, занимают малые площади и менее устойчивы к ядохимикатам. Здесь (и желательно в составе приманок) эффективны ингибиторы синтеза хитина, которые нарушают формирование покровов и других скелетных элементов членистоногих, соответственно их развитие прекращается. Максимальный эффект наблюдается через несколько недель после их внесения, но и защитные свойства проявляются длительное время. Рекомендуемые дозы - 25 - 60 г/га. Опасны для всех личинок членистоногих (особенно водных), практически безопасны для взрослых домашних пчел и позвоночных животных. Адонис (из группы фенилпиразолов) характеризуется избирательным воздействием на саранчовых,

доза (1-5 г /га), эффект- через 2-3 дня после обработки. Может представлять опасность для всех наземных членистоногих, но практически безопасен для позвоночных и для обитателей водных экосистем.

Кроме снижения экологического ущерба в ряде случаев снижаются и затраты. Так, обработка химическими пестицидами оценивается в \$12/га, обработка «биоагентами» (Табл, п 4) — \$15-\$20/га, а применение «ингибитора стадности» *Phenylacetoneitrile (PAN)* — 0,5 \$ /га [8]. Превращение одиночной формы в стадную в экспериментальных условиях наблюдалось при воздействиях, приводящих к выделению нейромедиатора серотонина («гормон удовольствия» для людей). Введение антагонистов серотонина не препятствовало превращению, но специфический феромон саранчи *PAN* (контролирует поведение взрослой мужской особи в стае, и предупреждает других самцов держаться подальше в период спаривания). При воздействии на неокрыленных самцов саранчи (<10 мл/ га) дезориентировал их и вынуждал возобновить замкнутый образ жизни [8].

В естественных условиях в качестве растительноядных животных саранча является важнейшим элементом пищевых сетей в травянистых экосистемах. В кишечнике саранчовых листья и стебли злаков подвергаются не столько перевариванию, сколько измельчению, а симбиотические кишечные микроорганизмы обогащают эти фрагменты витаминами группы В. В умеренных широтах Евразии одиночные саранчовые в течение теплого сезона могут потреблять свыше 10 % зеленой фитомассы трав. Кроме того, они активно используют в пищу опад, а при недостатке растительной пищи способны переключаться на трупы своих собратьев, экскременты других животных. Объедая листья, саранчовые активизируют рост растений и увеличивают их продуктивность. В свою очередь, саранча интенсивно поедается мелкими хищниками (Табл. п.4). Наиболее активны птицы, особенно розовые и обыкновенные скворцы (*Pastor roseus L. u Sturnus vulgaris L.*), реже млекопитающими (от полевок до ежей и лис) и земноводными.

Биопрепараты производятся на основе специально разводимых патогенов (одноклеточные бактерии, простейшие, вирусы и грибы) и паразитоидов (насекомые, клещи и круглые черви, приводящие к гибели либо существенному снижению жизненной активности «хозяина», с утратой способности к размножению); Как правило, они специализируются на определенных стадиях (яйцах, личинках и взрослых [1, 6]. Патогены особо эффективны в ядовитых (зараженных) приманках; Споры грибов – *Beauveria bassiana u Metarhizium anisopliae* в смеси с нерафинированным рапсовым маслом буквально прорастают внутрь, уничтожая организм. Рапсовое масло является сильным пищевым аттрактантом ждля саранчи: в крестоцветных содержится достаточно влаги. Воду саранча получает из корма, высокая влажность для нее губительна. Она избегает влажных лесов, а дожди способствуют распространению ее грибных («грибковых») заболеваний. Так, благодаря дождливой погоде максимальная численность саранчи в Саратовской области в 2017 г. оценивалась в 0,3-2 экзemplаров/м2, что не превышает экономического порога вредоносности (минимальная плотность вредителя, при которой затраты на борьбу окупаются доходом от сохраненного урожая) [9].

Другое перспективное направление - это создание биопрепаратов на базе местных возбудителей болезней. Кроме *Metarhizium*, массовую гибель личинок и взрослых особей саранчовых может вызывать гриб *Entomophaga grylli* , а также *Aspergillus flavus* и *A. ochraceus* К Грибы действуют медленнее химических препаратов, но практически безопасны для подавляющего большинства остальных животных, в том числе человека.

Перспективно применение разводимой для биоконтроля бактерии - *Bacillus thuringiensis* (если будет выделен специфичный штамм), а также некоторых групп вирусов.

Яйца в кубышках часто выедаются личинками жуков-нарывников из родов *Mylabris* и *Epicauta*, личинками жужелиц из рода *Amara* и мух-жужжал родов *Anastoechus* и *Cytherea* . Среди паразитов личинок и имаго хорошо представлены мухи - *Anastoechus nitidulus*, *Systoechus sp.*, *Cytherea setosa*, *Blaesoxipha lineata*, *Wohlfartia balassogloi*, а также клещики и мермитиды [6, 7].

Саранчовые концентрируются у растений, привлекательных для них (крестоцветные) и напротив, почти не повреждают (Табл. п.3). В группу биопрепаратов можно включить использование аттрактантов и репеллентов, регуляторов роста и их аналогов, в первую очередь получаемых из растений. Так, азадирахтин получают при переработке плодов тропических деревьев *Azadirachta indica* и *Melia volkensii* из семейства *Meliaceae* [10]. биологически активные вещества – репелленты. Растения, обработанные экстрактом листьев кустарника *Melia azedarach* саранча объедает лишь в самых исключительных случаях, защитная пленка сохраняет устойчивость до 4 дней, как некоторые инсектициды.

К недостаткам биопрепаратов относится их относительная дороговизна, длительный (до 30 дней) период действия и, в большинстве случаев, необходимость применять их на ранних стадиях, пока вредитель не поднялся в воздух, что, в свою очередь, требует системы наблюдения и контроля на ранней стадии заражения местности.

Появление саранчи и ее дальнейшее поведение, включая миграции достаточно предсказуемо, для наблюдений за ее перемещениями применимы те же приборы и методы, что и для метеорологических наблюдений [3, 9]. Мигрирующая стая уничтожает на своем пути почти все зеленые части растений на посевах и в естественных пастбищах. В наибольшей степени страдают злаки, но также и огородные овощи, конопля, гречиха, фруктовые деревья, виноград. Единый центр борьбы с нашествиями саранчи располагается в Риме. Его основными задачами является выявление очагов появления крупных популяций (для чего используются методы дистанционного зондирования и автоматическая обработка спутниковых снимков) и снижение использования химикатов. При своевременном принятии необходимых мер эту проблему реально если не решить полностью, то хотя бы свести к минимуму ее последствия. Перемещение стаи по ветру из области более высокого в область более низкого барометрического давления не только помогает саранче экономить силы, но и «автоматически» приводит насекомых в «благоприятные» области. Дело в том, что в таких местах чаще выпадают осадки и соответственно гуще и сочнее растет трава, удобнее оказываются места для откладывания яиц и т. п. При прогнозировании миграций на дальние расстояния необходимо учитывать движение атмосферных фронтов, разделяющих различные массы воздуха: стаи саранчи концентрируются недалеко от зоны конвергенции (граница соприкосновения воздушных масс) и совершают перелеты вместе с перемещением тропического фронта и межтропической зоны конвергенции. До июля тропический фронт передвигается в северном направлении, а с июля и до января отступает на юг [3, 9]. Прогнозирование, тесно связанное с метеорологическими наблюдениями, можно считать отдельным пунктом, не включенным в таблицу. Наилучший же вариант - ускорение восстановления степных экосистем на выведенных из хозяйственного оборота землях.

### Заключение

Авторы считают, что новыми являются следующие положения и результаты: оценка различных методов борьбы с саранчой с учетом их эффективности и воздействия на экосистему, а также экологическая роль саранчовых в экосистеме. Ранее мы рассматривали [11, 12] саранчу в качестве перспективный источник кормового белка и сорбционных материалов, содержащих хитин и его производные..

### Список литературы

1. Лачининский, А. В., Сергеев, М. Г., Чильдебаев, М. К., Черняховский, М. Е., Локвуд, Дж. А., Камбулин, В. И., Гаппаров, Ф. А. 2002. Саранчовые Казахстана, Средней Азии и сопредельных территорий. Ларами: Международная Ассоциация Прикладной Акриндологии / Университет Вайоминга, 387 с. (на русском).
2. Бей-Буенко Г.Я. Общая энтомология. Учебник для университетов и сельхозвузов. - 3-е изд., доп. - М.: Высшая школа, 1980. - 416 с.
3. [rosselhocenter.com](http://rosselhocenter.com) Аналитика и статьи...-на-28-iyunya-2018-g 19.02.2019
4. [agroinvestor.ru](http://agroinvestor.ru)...article...sarancha-vstaet-na-krylo/ 19.02.2019.

5. ЦОДП - Степная программа - Документы - Управление популяцией саранчовых в степных ландшафтах. (*biodiversity.ru*) 27/04.2022.
6. Сергеев М.Г., Копанева Л.М., Рубцов И.А., Антипанова Е.М., Бугров А.Г., Высоцкая Л.В., Иванова И.В., Казакова И.Г., Карелина Р.И., Пшеницына Л.Б., Соболев Н.Н., Чо-гсомжав Л. Сибирская кобылка (*Aeropus sibiricus* L.). Новосибирск: Наука, 1995. 176 с.
7. Daxl R., von Kayserlingk N., Klein-Koch C., Link R., Waibel H. *Integrated pest management*. Rossdorf: TZ-Verl.-Ges., 1994. 119 p.
8. Michael L. Anstey, Stephen M. Rogers, Swidbert R. Ott, Malcolm Burrows, Stephen J. Simpson. *Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts* // *Science*. 2009. V. 323. P. 627.
9. *fao.org*...locusts-CCA/common/ecg...Report...2009\_09\_23...19.02.2019.
10. Rembold H. *Controlling locusts with plant chemicals* // *New trends in locust control*. Rossdorf: TZ-Verl.-Ges., 1994. P. 41-49.
11. Саванина Я.В. Хитиновые материалы: получение; очистка сточных вод. 2020. ИТ-НОУ. № 2. С. 41-46..
12. Саванина Я.В. Комплексное использование природного инсектного сырья // *Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT+M&Ec`2021 (Гурзуф. Весенняя сессия)*. С. 211-216.

**Сведения об авторах**

**Янина Вячеславовна Саванина**

к.б.н., инж.,

Московский государственный университет

имени М.В.Ломоносова,

биологический факультет

Москва, Россия

Ленинские горы, д.1, корп.12.

**E-mail:** v.savanin@gmail.com

**Information about authors**

**Savanina Yanina Viatcheslavovna**

PhD,

School of Biology,

M.V.Lomonosov Moscow State University

Moscow; Russia

Leninskie gory, h.1, korp.12

**E-mail:** v.savanin@gmail.com

УДК 543.066:57.083.3

ГРНТИ 31.19, 34.05

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.68-73

Е. А. Зверева, О. Д. Гендриксон, А. В. Жердев,

Б. Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный

исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук

## ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ БЫСТРОГО ВНЕЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ СОСТАВА МЯСНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

В статье обсуждаются разработанные иммунохроматографические тест-системы для идентификации сырья при производстве мясных продуктов на основании выявления белковых биомаркеров тропонин I, миоглобин, иммуноглобулины. Рассмотрены возможности данных систем для оценки содержания разных видов сырья (контроля состава). Получены данные воспроизводимости фотометрических измерений. Проведена апробация разработанных тест-систем для характеристики мясных пищевых продуктов, оценка их эффективности для контроля состава.

**Ключевые слова:** иммунохроматографический анализ, внелабораторное тестирование, идентификация сырья пищевых производств, биомаркеры мышечных тканей, фальсификация мясных продуктов



E. A. Zvereva, O. D. Hendrickson, A. V. Zherdev,  
B. B. DzantievA.N. Bach Institute of Biochemistry,  
Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of  
Sciences**IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR RAPID  
OUT-OF-LABORATORY CONTROL OF THE COMPOSITION OF MEAT FOODS**

*The article discusses the developed immunochromatographic test systems for the identification of raw materials in the production of meat products based on the detection of protein biomarkers troponin I, myoglobin, immunoglobulins. The possibilities of these systems for assessing the content of different types of raw materials (composition control) are considered. Data on the reproducibility of photometric measurements have been obtained. Approbation of the developed test systems for the characteristics of meat food products, evaluation of their effectiveness for composition control was carried out.*

**Keywords:** immunochromatographic analysis, out-of-lab testing, identification of raw materials for food production, biomarkers of muscle tissue, falsification of meat products

**Введение**

Мясные продукты являются важным компонентом рациона современного человека. Многоступенчатые технологические процессы позволяют недобросовестным производителям скрывать нарушения рецептур, связанные с заменой мышечной ткани белок-содержащими добавками растительного или животного происхождения, а также нарушением видового состава мясного сырья. Поэтому определение состава готовых мясных пищевых продуктов и источников сырья, использованных при их производстве, является важной задачей, связанной с обеспечением безопасности и здоровья людей. Достоверная информация о составе мясных продуктов помогает соблюдать особенности рациона, связанные с соблюдением традиций и религиозных убеждений [1,2].

Для решения этой задачи необходимы быстрые и чувствительные аналитические методы, которые позволят проводить скрининговое тестирование. Эффективным средством экспрессного тестирования являются иммунохроматографические тест-системы, которые характеризуются простотой проведения анализа, производительностью, возможностью использования во внелабораторных условиях [3].

Для успешной реализации иммунохроматографического анализа (ИХА) принципиальное значение имеет выбор молекулярного идентификатора, который позволит достоверно оценивать качественный и количественный состав мясного продукта. Контролируемый маркер должен присутствовать в сырье в высоких концентрациях, быть стабильным при различных видах обработки и характеризоваться межвидовой изменчивостью антигенных детерминант. Показано, что для определения источников мясного сырья в качестве маркера можно использовать миоглобин [4], тропонин I [5], легкие цепи миозина 1-го типа, мышечную карбоангидразу, мышечную енолазу [6], иммуноглобулины класса G [7]. Ряд иммунохроматографических систем с использованием различных биомаркеров был разработан в рамках наших предыдущих исследований [8-11].

Отметим, что ИХА традиционно рассматривается как метод качественного анализа, позволяющий делать выводы только о наличии или отсутствии контролируемого компонента в пробе. Такое тестирование решает ряд задач пищевой безопасности, но недостаточно, когда нужно сделать вывод о соблюдении заявленной рецептуры, присутствии компонентов продукта в необходимой пропорции. В последние годы с развитием средств цифровой регистрации и обработки изображений все более активно рассматриваются количественные варианты проведения ИХА [12]. Однако применительно к контролю состава мясных продуктов эти возможности иммунохроматографии ранее не анализировались.

**Цель работы**

Рассмотрение возможностей применения иммунохроматографических тест-систем для идентификации мясного сырья как средств оценки состава мясных продуктов.

### Материалы и методы

Изготовление иммунохроматографических тест-систем предусматривает формирование мультимембранного композита с предварительным нанесением всех необходимых для анализа реагентов на мембраны тест-полоски. Благодаря этому для проведения анализа достаточно контакта этой тест-полоски с пробой, инициирующего движение реагентов по мембранам о формирование иммунных комплексов, регистрируемых как окрашенные зоны тест-полоски [3].

В использованных в работе тест-системах был реализован «сэндвич»-формат ИХА с формированием комплексов (специфическое антитело на мембране – поливалентный антиген – специфическое антитело, меченное окрашенным маркером). В «сэндвич»-ИХА реализуется прямая зависимость яркости окрашивания аналитической зоны от концентрации контролируемого соединения, линейная в достаточно широком диапазоне концентраций.

В качестве маркера для ИХА были использованы наночастицы золота (НЧЗ), которые получали цитратным восстановлением золотохлористоводородной кислоты по методу Френса [13]. Средний диаметр частиц составил 30 нм. Выбор условий конъюгирования специфических антител с НЧЗ проводили на основании фотометрических данных, отражающих агрегацию продукта реакции после добавления коагулирующего агента, 10% *NaCl*, взаимодействующего с нестабилизированными адсорбированным белком участками поверхности НЧЗ [14]. Полученные концентрационные зависимости характеризовались первоначальным ростом оптической плотности (*D580*) с последующим спадом и выходом на плато при концентрации антител, достаточной для стабилизации поверхности частиц. Для конъюгирования выбирали концентрацию антител, на 10–20% превосходящую точку выхода *D580* на плато. Избыток непрореагировавших антител удаляли на стадии осаждения конъюгата.

Для проверки эффективности работы тест-систем были изготовлены пробы – мясные фарши с известным варьируемым соотношением сырья разных видов: 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 % свинины в курином фарше.

Процедуры пробоподготовки для проведения ИХА были направлены на быстрое извлечение целевого маркера. Для экстракции термостабильного тропонина I гомогенизированные пробы инкубировали при 100°C в течение двух минут и центрифугировали. Экстракцию миоглобина проводили по аналогичной схеме при комнатной температуре в специально подобранном буфере.

Для тестирования экстрактов в лунки микропланшета вносили 100 мкл пробы и погружали тест-полоску в вертикальном положении. Через 15 мин качественный результат анализа контролировали визуально. Инструментальную регистрацию результатов ИХА проводили с помощью сканера *CanoScan LiDE 90* («Canon», Япония). Для оценки интенсивности окрашивания аналитических зон полученные изображения обрабатывали с помощью программы *TotalLab* («Nonlinear Dynamics», Великобритания).

### Полученные результаты




Разработка анализа включала оптимизацию концентраций иммунореагентов, продолжительности стадий взаимодействия, а также выбор состава мультимембранного композита, режимов предобработки и сушки мембран. Оптимизация тест-систем была направлена на снижение предела обнаружения аналитов и обеспечение высокой воспроизводимости количественных результатов ИХА. Как средства количественного анализа были охарактеризованы разработанные тест-системы для детекции таких молекулярных биомаркеров мышечной ткани, как скелетный тропонин I [8], миоглобин [9], иммуноглобулины [10,11].

Выбранное сочетание двух клонов моноклональных антител позволило детектировать скелетный тропонин I с чувствительностью 25 нг/мл в течение 15 мин. Тест-система специфически выявляет тропонин I в пробах мяса млекопитающих (говядина, свинина, баранина, конина), но не взаимодействует с тропонином I из мяса птицы (курица, индейка), что позволяет выявлять добавки дешевого сырья, используемого при

фальсификации мясных продуктов.




Для характеристики эффективности количественной идентификации состава мясных продуктов были протестированы экстракты проб с разным соотношением видов мясного сырья. Для оценки точности и воспроизводимости количественных измерений с использованием тест-системы для выявления тропонина I были проведены серии экспериментов, в которых регистрировали интенсивность окрашивания аналитической зоны при тестировании экстрактов мясных смесей известного состава (не менее 10 измерений в каждой точке) (таблица 1). Результаты показывают высокую воспроизводимость результатов ИХА – стандартное отклонение аналитического сигнала не превышало 12.8%.

**Таблица 1. Результаты измерения интенсивности окрашивания аналитических зон тест-полосок при детекции тропонина I в мясных смесях разного состава (n=10)**

	Состав мясной смеси	Интенсивность окрашивания аналитической зоны, усл. ед.	Внешний вид аналитической и контрольной зон тест-полосок
1	0.5% свинины в курином фарше	1767.5±120.3	
2	1.0% свинины в курином фарше	7978.1±278.7	
3	5.0% свинины в курином фарше	15137.5±1942.4	

Разработанная тест-система для выявления миоглобина в оптимизированных условиях характеризовалась пределом обнаружения 5 нг/мл. ИХА специфически выявляет свиной миоглобин в мясных смесях. Детектируемые комплексы в аналитической зоне не образуются при тестировании экстрактов из мяса других млекопитающих (говядина, баранина) и птиц (курица, индейка).

**Таблица 2. Результаты измерения интенсивности окрашивания аналитических зон тест-полосок при детекции миоглобина в мясных смесях разного состава (n=10).**

	Состав мясной смеси	Интенсивность окрашивания аналитической зоны, усл. ед.	Внешний вид аналитической и контрольной зон тест-полосок
1	0.1% свинины в курином фарше	663.6±100.7	
2	1.0% свинины в курином фарше	4835.8±744.3	
3	10.0% свинины в курином фарше	9802.0±890.3	

Анализ мясных смесей известного состава показал высокую воспроизводимость результатов ИХА с контролем миоглобина в качестве биомаркера - стандартное отклонение аналитического сигнала не превышало 15.4% (таблица 2).

Разработанные тест-системы для обнаружения иммуноглобулинов, которые присутствуют в плазме всех позвоночных, позволили определить видовую принадлежность сырья и провести оценку его содержания. Тест-система для детекции куриных IgY позволяет в течение 20 мин определять 0.063% куриного мяса в сырых и термообработанных мясных смесях, равно как и в мясных продуктах (колбасах и др.).

Иммунохроматографическая тест-система для детекции свиных IgG характеризовалась визуальным пределом обнаружения IgG 1.5 нг/мл. В рабочем диапазоне определяемых концентраций IgG - 18.5–161.7 нг/мл - коэффициент вариации внутри серии и между сериями не превышал 10%. Предел обнаружения определяли по способности тест-системы выявлять добавки из свинины к различным видам мяса. Разработанная тест-система детектирует 0.125% свинины в фарше из баранины, курицы, кролика, индейки и 0.063% свинины в фарше из говядины.

**Выводы**

Апробация разработанных иммунохроматографических тест-систем показала их эффективность для выявления молекулярных биомаркеров в мясных смесях разного состава. Высокая чувствительность анализа позволяет контролировать даже небольшие нарушения рецептуры. Стандартное отклонение измеренной интенсивности аналитического сигнала не превышало 15.4%. Проведенная апробация позволяет предложить разработанные тест-системы для скринингового контроля заявленного состава мясных продуктов.

**Заключение**

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

1. Показана эффективность иммунохроматографических тест-систем для количественной оценки содержания биомаркеров в мясных смесях.
2. Результаты количественных измерений, основанных на величинах интенсивности окрашивания аналитической зоны тест-полоски, характеризуются относительными стандартными отклонениями в диапазоне 12-15% и незначительно варьируют в зависимости от контролируемого биомаркера.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-16-00108).*

**Список литературы**

1. Kumar P., Chatli M.K., Mehta N., Singh P., Malav O.P., Verma A.K. Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017. V. 57 (5). P. 923–932.
2. Premanandh J., Bin Salem S. Progress and challenges associated with Halal authentication of consumer packaged goods // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017. V. 97. P. 4672–4678.
3. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014. V. 55. P. 81–93.
4. Kotoura S., Murakami-Yamaguchi Y., Kizu K., Nakamura M., Fuchu H., Miake K. Sugiyama M., Narita H. Establishment of a sandwich ELISA for the determination of beef content in processed foods by using monoclonal antibodies to myoglobin // *Food and Agricultural Immunology*. 2012. V. 23. P. 289–301.
5. Chen F.C., Hsieh Y.H.P. Porcine troponin I: A thermostable species marker protein // *Meat Science*. 2002. V. 61. P. 55–60.
6. Montowska M.A., Pospiech E. Species-specific expression of various proteins in meat tissue: Proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species // *Food Chemistry*. 2013. V. 136. P. 1461–1469.
7. Kuswandi B., Gani A.A., Ahmad M. Immuno strip test for detection of pork adulteration in cooked meatballs // *Food Bioscience*. 2017. V. 19. P. 1–6.
8. Zvereva E.A., Popravko D.S., Hendrickson O.D., Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Lateral flow immunoassay to detect the addition of beef, pork, lamb, and horse muscles in raw meat mixtures and finished meat products // *Foods*. 2020. V. 9 (11). Article 1662.
9. Zvereva E.A., Byzova N.A., Hendrickson O.D., Popravko D.S., Belichenko K.A., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Immunochromatographic detection of myoglobin as a specific biomarker of porcine muscle tissues in meat products // *Applied Science*. 2020. V. 20 (21). Article 7437.
10. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Lateral flow immunoassay for sensitive detection of undeclared chicken meat in meat products // *Food Chemistry*. 2021. V. 344. Article 128598.
11. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Sensitive lateral flow immunoassay for the detection of pork additives in raw and cooked meat products // *Food Chemistry*. 2021. V. 359. Article 129927.

12. *Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Towards lateral flow quantitative assays: Detection approaches // Biosensors. 2019. V. 9 (3). Article 89.*
13. *Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // Nature Physics Sci. 1973. V. 241 (105). P. 20-22.*
14. *Hermanson G.T. // Academ. Press, Elsevier: Amsterdam. 2008. 900 p.*

**Сведения об авторах**

**Елена Анатольевна Зверева**

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** zverevaea@yandex.ru

**Ольга Дмитриевна Гендриксон**

канд. хим. наук, ст. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** odhendrick@gmail.com

**Анатолий Виталиевич Жердев**

канд. биол. наук, вед. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** zherdev@inbi.ras.ru

**Борис Борисович Дзантиев**

доктор хим. наук, зав. лаб.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** dzantiev@inbi.ras.ru

**Information about authors**

**Elena Anatolievna Zvereva**

PhD, Senior researcher

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

**E-mail:** zverevaea@yandex.ru

**Olga Dmitrievna Hendrickson**

PhD, Senior researche

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

**E-mail:** odhendrick@gmail.com

**Anatoly Vitalievich Zherdev**

PhD, Leading researcher

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

**E-mail:** zherdev@inbi.ras.ru

**Dzantiev Boris Borisovich**

Dr. of Chem. sciences, professor, Head of Laboratory

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

**E-mail:** dzantiev@inbi.ras.ru

УДК 579.67, 613.2

ГРНТИ 34.27, 65.59.01

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.73-78

**В. В. Насонова, А. А. Семенова, Ю. К. Юшина,**

**Д. С. Батаева, А. И. Синичкина**

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем

им. В.М. Горбатова» РАН

## **РИСКИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ СО СВИНЫМИ СУБПРОДУКТАМИ**

Мясное сырье и субпродукты выступают причиной части выявляемых пищевых инфекций. В то же время, распространение патогенных и условно патогенных микроорганизмов со свинными субпродуктами представляет риск для изготовителей мясной продукции и потребителей, что обусловлено реализацией субпродуктов в переработанном виде. В этой связи проведено исследование по изучению качественного и количественного выявления микроорганизмов на поверхности субпродуктов, непосредственно после их получения.

**Ключевые слова:** Субпродукты, микроорганизмы, контаминация, свинина.

**RISKS OF THE SPREAD OF MICROORGANISMS WITH PORK BY-PRODUCTS**

*Meat and by-products are the cause of a part of detected foodborne infections. At the same time, the spread of pathogenic and opportunistic microorganisms with pork by-products poses a risk for manufacturers of meat products and consumers, which is due to the sale of by-products without processing. In this regard, a study was conducted to study the qualitative and quantitative detection of microorganisms on the surface of by-products, immediately after their receipt.*

**Keywords:** *By-products, microorganisms, contamination, pork*

**Введение**

На долю мяса и мясной продукции приходится около 18% всех вспышек пищевых инфекций в Европе [EFSA, 2017]. В США ежегодно причиной до полумиллиона случаев пищевых инфекций является свинина [Painter J.A. et al, 2013]. По данным Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) свинина и продукты ее переработки наиболее часто являются источником пищевых заболеваний, вызванных патогенами *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, паразитами *Toxoplasma gondii* и *Trichinella spp.* [EFSA, 2017], а также вирусом гепатита E (HEV) [Casas M., Martín M., 2010]. С потреблением свинины связывают 20% случаев пищевого сальмонеллеза [Hoffmann S. et al, 2017]. Одновременно с этим, источником распространения патогенов является не столько мясное сырье, сколько субпродукты. Субпродукты, как продукты убоя контаминированных животных, могут являться источником новых бактериальных агентов, влияющих на снижение безопасности мясной продукции. Об актуальности этой проблемы также свидетельствует рост количества публикаций, связанных с выявлением патогенов в субпродуктах – в 2021 году количество статей увеличилось в два раза по отношению к 2020 году. Таким образом, проведение исследований микробиологического сообщества, выявляемого на субпродуктах, представляет научный и практический интерес.

**Целью исследования** являлось изучение состава микробной популяции, выявляемой при исследовании субпродуктов непосредственно после их выделения на этапе первичной переработки свиней.

**Объектами исследования** были выбраны следующие субпродукты свиные: язык, печень, почки, сердце и свиные головы. Отбор проводили на этапе убоя и первичной переработки свиней, после предварительной обработки субпродуктов. Охлаждению субпродукты не подвергали.

**Методы исследования**

Для выявления патогенных субпродуктов пробы отбирали методом смыва, без проведения обеззараживания поверхности. В работе использовали общепринятые микробиологические методы (подтверждение выявления патогенных микроорганизмов). Видовую идентификацию отобранных микроорганизмов проводили масс-спектрометрическим методом *MALDI-ToF-MS* путем прямого бактериального профилирования с помощью времяпролётного масс-спектрометра «*MALDI Biotyper Microflex*». Определение патогенных микроорганизмов проводили методом, основанным на петлевой изотермической амплификации ДНК (LAMP) с использованием праймеров для обнаружения: *L. monocytogenes* – *3M Molecular Detection Assay Listeria monocytogenes*, для обнаружения бактерий рода *Salmonella spp.* – *3M Molecular Detection Assay Salmonella*.

### Результаты исследования

Изучение патогенных и условно патогенных микроорганизмов, выявленных при исследовании субпродуктов показало, что в совокупности были выявлены следующие микроорганизмы: *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *S.aureus*, *E.coli*, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp*, *Ewingella americana*, *Enterobacter spp*, *Clostridium spp*, *Staphylococcus spp*, *Acinetobacter spp*, *Aeromonas spp*.

При исследовании образцов свиных субпродуктов *L. monocytogenes* не были выявлены ни в одном образце. В то же время микроорганизмы рода *Salmonella spp* были идентифицированы во всех образцах исследуемых субпродуктов, за исключением почек и сердца, что может быть обусловлено организацией процесса нутровки и первичной переработки субпродуктов. Количество случаев выявления *Salmonella spp* в печени была несколько больше, чем в свином языке и голове, что могло быть результатом перекрестной контаминации при выделении ливера.

*Campylobacter spp* был выявлен только в одном виде субпродуктов – в почках, частота выявления составила 20% от общего количества исследованных образцов. Данный патогенный микроорганизм, как и *Salmonella spp*, мог контаминировать почки после убоя на этапе первичной переработки, например, в случае нарушения целостности желудочно-кишечного тракта. На поверхности охлажденных свиных туш он практически никогда не обнаруживается, поскольку не развивается при низких температурах, низкой влажности [Pearce et al., 2003].

*S.aureus*, который является грамположительной бактерией, был выявлен только в свином языке в 10% исследованных образцов. Обнаружение *S.aureus* в языке может быть объяснено тем, что он может развиваться в носовых пазухах животных [Lowy F. D., 1998].

*E.coli* были заражены печень, почки и сердце, причем в наибольшем количестве – образцы печени. *E.coli* может использоваться в качестве показателя санитарно-гигиенического состояния производства, поскольку в течение многих лет ее обнаружение использовалось, как индикатор фекального загрязнения и возможного присутствия кишечных патогенов [Ghafir Y. et al, 2008].

*Pseudomonas spp* – являются психротрофными грамотрицательными микроорганизмами, влияющими на качество и срок годности мясной продукции при аэробном хранении [Coates K.J. et al, 1995]. В 70% образцов свиной печени были выявлены *Pseudomonas spp*. Псевдомонады были выявлены также в смывах с почек и свиных голов. При проведении исследований в 2-х образцах свиных почек (10%) были обнаружены *Klebsiella spp* и *Ewingella americana*.

*Klebsiella spp* имеют две среды обитания: одна — окружающая среда, где они встречаются в поверхностных водах, сточных водах, почве и на растениях, а другая — поверхности слизистых оболочек млекопитающих - людей, лошадей или свиней, которых они колонизируют. В этом отношении род *Klebsiella* подобен *Enterobacter* и *Citrobacter*, но отличается от *Shigella spp* или *E. coli*, которые распространены у людей, но не в окружающей среде. *Klebsiella* является условно-патогенным микроорганизмом. Однако она может вызывать тяжелые заболевания, такие как септицемия, пневмония и инфекции мягких тканей.

*Ewingella americana* является грамотрицательной, ферментирующей лактозу, оксидазоотрицательной и каталазоположительной бактерией, которая была впервые описана, как новый род и вид семейства *Enterobacteriaceae* в 1983 году. В настоящее время неизвестно, является ли она истинным патогеном или оппортунистическим инфекционным агентом.

Бактерии рода *Clostridium* были идентифицированы в печени и почках. Ряд исследователей указывали на возможность обнаружения бактерий рода *Clostridium* в воде, находящейся в шпарильных чанах [Bauerl F. T. et al, 1981]. В частности, было установлено, что, если период между обескровливанием и погружением в шпарчан слишком короткий, нервная система животного все еще способна реагировать на раздражители, и



погружение вызывает рефлекторный вдох, вследствие чего зараженная вода может попасть в кровеносную систему и, таким образом, распространиться по туше [Thornton H., 1974]. Другая причина обнаружения *Clostridium* на субпродуктах могла быть обусловлена возможностью его присутствия в печени внешне здоровых животных [Canada J. C. et al, 1964].

*Staphylococcus spp* были обнаружены, соответственно, в 30% языков и 40% голов. В этот род входят патогенные и условно патогенные виды. Обнаружение их в указанных субпродуктах соответствует их среде обитания, они колонизируют кожу, слизистые ткани носоглотки и ротовой полости животных.

Представители рода *Acinetobacter spp* были обнаружены на почках и печени. Эти грамотрицательные аэробные микроорганизмы широко распространены в окружающей среде, крайне живучи, выносят длительное высушивание в течение месяца, могут заселять биотические и абиотические поверхности. Все представители этого рода способны вызывать заболевания человека, например, гнойные инфекции [Wong D. et al, 2017].

*Aeromonas spp* были обнаружены в почках и печени. Контаминация *Aeromonas spp* печени подтверждается также китайскими исследователями [Zhao G. et. al, 2020]. Эти микроорганизмы считаются потенциальным кишечным возбудителем пищевого происхождения, вызывающим легкую, самокупирующуюся диарею и периодическую рвоту, в основном, у очень маленьких детей, пожилых людей или у пациентов с ослабленным иммунитетом [Stelmd G. N., 1989]. По мнению некоторых ученых *Aeromonas spp.* можно использовать в качестве индикатора при оценке санитарно-гигиенического состояния технологического и вспомогательного оборудования, инвентаря, спецодежды и средств индивидуальной защиты рабочих. Повышенный уровень *Aeromonas spp.* должен свидетельствовать о необходимости переоценки процедур очистки, мойки и дезинфекции на предприятии [Botcha E. et. al, 1996].

#### **Заключение**

Таким образом, проведенные исследования по выявлению патогенных и условно патогенных микроорганизмов при исследовании субпродуктов в условиях отечественных предприятий показали, что существует риск распространения микроорганизмов с субпродуктами. В ходе проведенной работы установлено, что более контаминированными, по количеству выявленных родов микроорганизмов и по частоте выявления отдельных родов, были печень и почки. В тоже время в отношении большинства микроорганизмов, выявленных на субпродуктах, необходимо констатировать в качестве причин выявления перекрестную контаминацию в процессе первичной переработки животных и санитарно-гигиенические условия производства. Наличие некоторых видов микроорганизмов на субпродуктах могло быть также обусловлено прижизненной контаминацией самых животных.

***Исследования выполнялись по гранту 075-15-2020-775, поддержанному Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.***

#### **Список литературы**

1. EFSA 2007 *Scientific report on the risks associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need for tail docking considering the different housing and husbandry systems.*//*The EFSA Journal*, 611:1-13.
2. Painter, J.A. *Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008/ Painter J.A., Hoekstra R.M., Ayers T., Tauxe R. V., Braden C.R., Angulo F.J., Griffin P.M. // Emerging Infectious Diseases.–2013.-Vol. 19.- № 3.-P. 407–415*
3. Casas, M. *Hepatitis E virus and pigs: A zoonotic risk in Europe?/ Casas M., Martín M.//The Veterinary Journal.–2010.-Vol. 186.-№ 2.-P. 135–136.*
4. Hoffmann, S. *Attribution of global foodborne disease to specific foods: Findings from a World Health Organization structured expert elicitation/ Hoffmann S., Devleeschauwer B., Aspinall W., Cooke R., Corrigan T., Havelaar A., Angulo F., Gibb H., Kirk M., Lake R., Speybroeck N., Torgerson P., Hald T. // PLOS ONE.–2017.-Vol. 12.-№ 9.-P. e0183641*



5. Pearce, R.A. Prevalence of *Campylobacter* within a swine slaughter and processing facility/ R.A. Pearce, F.M. Wallace, J.E. Call, R.L. Dudley, A. Oser, L. Yoder, J.J. Sheridan, J.B. Luchansky // *J. Food Prot.*– 2003.-66.-P. 1550-1556
6. Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* infections./Lowy F.D.//*The New England Journal of Medicine.*–1998.-39(3).-P.520–532
7. Ghafir, Y. Daube Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium/ Y. Ghafir, B. China, K. Dierick, L. De Zutter, G.// *Journal of Food Protection.*– 2008.-71(1) -P. 35-45
8. Coates, K. J. The contribution of carcass contamination and the boning process to microbial spoilage of aerobically stored pork / K.J. Coates, J.C. Beattie, I.R. Morgan, P.R. Widders//*Food Microbiology.*–1995.-12- P. 49-54
9. Bauerl, F.T, Prevalence of *Clostridium perfringens* in Pork during Processing/ F.T Bauerl, J. A. Carpenter, J. O. Reagan//*Journal of Food Protection.*–1981-VOL. 44.-P.279-283. Doi:10.4315/0362-028X-44.4.279
10. Thornton, H. 1974. So-called scalding-water lungs in slaughtered pigs. / Thornton H.// *Veterinary Record.*–1974.-94.-P. 72-77. Doi: 10.1136/vr.94.4.72.
11. Canada, J. C. Response of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells to temperature variation. / J. C. Canada, D. H. Strong and L. G. Scott. // *Appl. Microbiol.*–1964.-12.- P. 273-276. DOI:10.1128/am.12.3.273-276.1964
12. Wong, T. L. Salmonella in uncooked retail meats in New Zealand. / T. L. Wong, C. Nicol, R. Cook, S. MacDiarmid.//*Journal of Food Protection.*–2007.-70.-P. 1360–1365.
13. Zhao, Ge. Identification of enterobacteria in viscera of pigs afflicted with porcine reproductive and respiratory syndrome and other viral co-infections / Zhao, Ge, Lujie Zhang, Charles Li, Jianmei Zhao, Na Liu, Yuehua Li, Junwei Wang, Liheng Liub//*Microbial Pathogenesis.*–2020.-P. 147. Doi: 10.1016/j.micpath.2020.104385
14. Stelmd, G.N. *Aeromonas hydrophila*. In: M.P. Doyle (editor)/ Stelmd, G.N.// *Foodborne Bacterial Pathogens.*–1989.
15. Botcha, E. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria/ Botcha, Elizabet, Truls Nesbakkenb, Hardy Christensen//*International Journal of Food Microbiology.*–1996.-30-P. 9-25

**Сведения об авторах**

**Виктория Викторовна Насонова,**  
кандидат технических наук,  
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбато-  
ва» РАН,  
Москва, Россия

**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

**Анастасия Артуровна Семенова,**  
доктор технических наук,  
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбато-  
ва» РАН,  
Москва, Россия

**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

**Юлия Константиновна Юшина,**  
кандидат технических наук,  
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбато-  
ва» РАН,  
Москва, Россия

**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

**Дэгмара Султановна Батаева**  
кандидат технических наук  
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбато-  
ва» РАН,  
Москва, Россия

**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

**Information about authors**

**Victoria Victorovna Nasonova,**  
PhD,  
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food  
Systems of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia

**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

**Anastasia Arturovna Semenova,**  
D.Sc. (Technology)  
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food  
Systems of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia

**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

**Yulia Konstantinovna Yushina**  
PhD,  
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food  
Systems of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia

**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

**Dagmara Sultanovna Bataeva,**  
PhD,  
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food  
Systems of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia

**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

**Алена Игоревна Синичкина**  
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН,  
Москва, Россия  
**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

**Alena Igorevna Sinichkina**  
V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food  
Systems of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russia  
**E-mail:** v.nasonova@fncps.ru

УДК 577.2  
ГРНТИ 34.15  
DOI  
10.47501/978-5-6044060-2-1.78-86

<sup>1</sup>Т. Н. Ерохина, <sup>1</sup>С. К. Завриев, <sup>1</sup>Д. Ю. Рязанцев, <sup>2</sup>С. Ю. Морозов  
<sup>1</sup>Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
<sup>2</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

## ПЕПТИДЫ, КОДИРУЕМЫЕ ТРАНСКРИПТАМИ - ПРЕДШЕСТВЕННИКАМИ МИКРО - РНК В РАСТЕНИЯХ

*В статье обсуждаются новые данные, полученные при изучении функций консервативного пептида капустных растений, который кодируется при-микроРНК156а. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей промоторных районов этих генов позволил нам выявить высоко консервативный блок длиной 42 остатка, расположенный перед стартовой точкой транскрипции pri-miR156a на расстоянии 210-260 пар оснований. Было обнаружено, что промоторные фрагменты, содержащие высоко консервативный блок, обладают существенно более высокой способностью связывать пептид miPEP156a in vitro. Нами был проведен мутагенез промоторного высоко консервативного блока в центральной его части, включающей тетрамер динуклеотидов TG. Показано, что введение мутаций в промоторный тетрамер динуклеотидов TG заметно снижает сходство ДНК промотора к miPEP156a. Обнаруженные до сих пор miPEP растений найдены только у двудольных. Вопрос о том, насколько широко распространены miPEP в других растительных таксонах, весьма важен для понимания эволюционного происхождения таких микропептидов. В качестве первоначального подхода мы провели поиск таксономически консервативных miPEP у мхов, т.к. микроРНК весьма детально изучены в случае мха Physcomitrium patens. Для двух генов в области, предшествующей последовательности Ppt-pre-miR160a, были обнаружены достаточно короткие ОРТ (открытые рамки трансляции), которые кодировали пептиды, имеющие явное сходство аминокислотных последовательностей в их центральной области. Более того, высоко консервативный пептидный блок из Ppt-miPEP160a был выявлен в коротких белках, закодированных в pri-miR160a у почти 20 других мхов из класса Bryopsida.*

**Ключевые слова:** геном растений, семейство Brassicaceae, длинные некодирующие РНК, микроРНК, при-микроРНК, микропептиды, miPEP

<sup>1</sup>T. N. Erokhina, <sup>1</sup>S. K. Zavriev, <sup>1</sup>D. Y. Ryazantsev, <sup>2</sup>S. Y. Morozov  
<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Science  
<sup>2</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov

## PEPTIDES ENCODED BY PRECURSOR TRANSCRIPTS OF MICRO-RNAs IN PLANTS

*The article discusses new data obtained in the study of the functions of a conservative peptide of cabbage plants, which is encoded by the microRNA156a. Comparative analysis of the nucleotide sequences of the promoter regions of these genes allowed us to identify a highly conserved 42-residue block located before the starting point of pri-miR156a transcription at a distance of 210-260 base pairs. It was found that promoter fragments containing a highly conserved block have a significantly higher ability to bind miPEP156a in vitro. We carried out mutagenesis of a highly conserved promoter block in its central part, which includes a tetramer of TG dinucleotides. It has been shown that the introduction of mutations into the promoter*

*tetramer of TG dinucleotides significantly reduces the affinity of the promoter DNA to miPEP156a. The miPEPs revealed in plants have been found only in dicotyledons. The question of how miPEPs are distributed in other plant taxa is very important for understanding the evolutionary origin of such micropeptides. As an initial approach, we searched for taxonomically conservative miPEPs in mosses, since microRNAs have been studied in a great detail in the case of *Physcomitrium patens* moss. For two genes in the region preceding the *Ppt-pre-miR160a* sequence, rather short open reading frames were found that encoded peptides having a clear similarity of amino acid sequences in the central region. Importantly, such highly conserved peptide block homologous to that encoded by *Ppt-miPEP160a* gene was detected in short proteins encoded in *pri-miR160a* in almost 20 Bryopsida mosses.*

**Keywords:** Plant genome, Family Brassicaceae, Long non-coding RNA, MicroRNA, Pri-miRNA, Micropeptides

### Введение

МикроРНК представляют собой короткие двухцепочечные регуляторные молекулы, полученные из транскриптов-предшественников, называемых первичными микроРНК (при-микроРНК – *pri-miRNA*), которые транскрибируются в ядре с помощью РНК-полимеразы II. Было показано, что эти при-микроРНК содержат “кэп” структуру и поли(А)-хвост, а также включают специфические внутренние несовершенные шпилечные структуры, которые с помощью ферментативных комплексов *DCL* и специальных РНК-метилаз, дают начало зрелым молекулам микроРНК [1-3]. В последние годы пионерские исследования ученых из Франции показали, что некоторые растительные при-микроРНК, которые ранее считались некодирующими, могут транслироваться и продуцировать небольшие пептиды (микрорептиды - *miPEPs*) [4]. Исследования на модельных растениях *Arabidopsis thaliana* и *Medicago truncatula* показали, что некоторые *pri*-микроРНК, включая *At-miRNA165a* и *Mt-miRNA171b*, содержат в своей 5'-концевой части функциональные открытые рамки трансляции (ОРТ), кодирующие так называемые *miPEPs* (*At-miPEP165a* и *Mt-miPEP171b*) (Рис. 1) [4-6]. В целом, недавние исследования привели к идентификации новых пептидов *miPEPs* у целого ряда цветковых растений, включая *Arachishypogaea*, *Vitisvinifera*, *Glycinemax* и ряда растений семейства *Fabaceae*, а также в клетках и тканях человеческого организма [4, 6-15, 17, 18, 24]. Наши недавние работы позволили выявить ранее неизвестный растительный микрорептид *miPEP156a*, который эволюционно консервативен в десятках растений семейства *Brassicaceae* [16, 17].

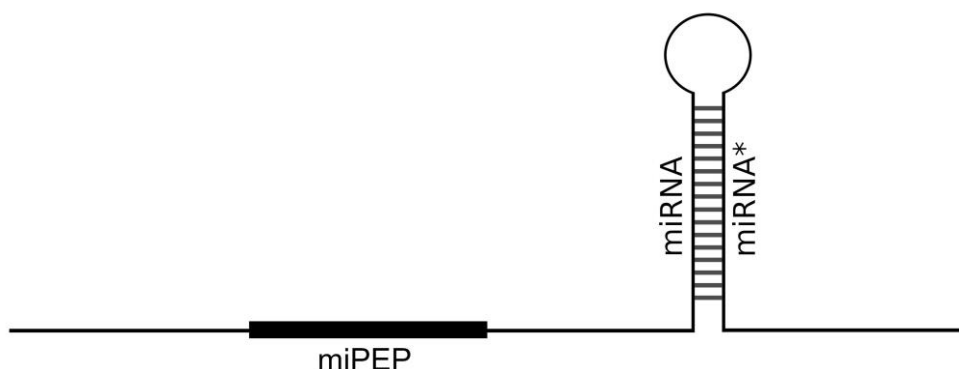


Рис. 1. Схематическое изображение структуры при-микроРНК, содержащей ОРТ (черный прямоугольник), кодирующую *miPEP*, к 5'-концу от шпилечной структуры (*pre-miRNA*), которая включает последовательность зрелой микроРНК. “Кэп”-структура на 5'-конце и поли(А)-последовательность на 3'-конце не показаны.

Данные, полученные при внешней обработке растений синтетическими пептидами *miPEP* или супер-экспрессии последних, показывают, что эти пептиды могут регулировать развитие корней, рост стеблей и параметры цветения [10, 11, 18, 25]. В частности, когда на растения наносили пептиды *At-miPEP164a*, *At-miPEP165a* и *At-miPEP319a*, цветение начиналось раньше, что сопровождалось увеличением длины стебля и соцветия [4-

б)]. Кроме того были обнаружены модификации корней (а именно, стимуляция роста основного корня и уменьшение образования боковых корней) после наружного применения *At-miPEP165a*, *At-miPEP858a* и *Mt-miPEP171b*, что связано с сильно увеличенной клеточной пролиферацией в меристематической зоне, а также удлинением клеток [4, 18, 19]. С другой стороны, известно, что полив растений раствором *Gm-miPEP172c* может влиять на образование клубеньков и вызвать увеличение количества клубеньков у бобовых [15]. Аналогичным образом, *Vvi-miPEP171d1* способствует развитию придаточных корней и ограничивает развитие первичных корней у виноградной лозы, когда он применяется экзогенно [14]

Нокаутующие мутанты по *At-miPEP858a*, полученные с использованием технологий редактирования *CRISPR-Cas9*, показали очевидное уменьшение длины корня. Это коррелирует с тем, что экзогенная обработка мутантных растений этим конкретным *miPEP* приводит к увеличению длины корня [13]. Последующие эксперименты также показали, что *At-miPEP858a* контролирует биосинтез флавоноидов и развитие растений, регулируя экспрессию генов, участвующих в фенилпропаноидном пути и передаче сигналов ауксином [13, 18]. Наши эксперименты с *miPEP156a* также выявили значительное положительное влияние микропептида на первичный рост корней у проростков двух видов из рода *Brassica* [17].

### Цель работы.

В настоящее время появились некоторые дополнительные вопросы в отношении тонких молекулярных и эволюционных механизмов, лежащих в основе функционирования *miPEPs*. Во-первых, совершенно неясно как последовательности промоторных областей распознаются *miPEPs* для активации транскрипции собственной матричной *pri-miRNA*, и если это распознавание действительно происходит, то, как происходит транспорт *miPEPs* через клеточную стенку, плазматическую мембрану и далее в ядро. Важность новых исследований в этих направлениях подчеркивается альтернативными результатами, касающимися, во-первых, субклеточной локализации растительных *miPEPs* и, во-вторых, положительной регуляции экспрессии *pri-miRNA/miRNA* с помощью *miPEPs*. Действительно, недавние исследования с *miPEPs* в клетках человека показали, что индукция транскрипции *pri-miRNA* не является общим правилом функционирования микропротеинов [8]. Кроме того, было показано, что *At-miPEP165a* не перемещается в ядра растительных клеток [19], что, на первый взгляд, несовместимо со способностью *miPEP* активировать транскрипцию собственной *pri-miRNA* [4, 25]. Наоборот, в соответствии с выявленной способностью к активации транскрипции, было обнаружено, что экспрессируемый растениями *Mt-miPEP171b* локализуется в небольших ядерных телах [4], а экзогенный *miPEP156a* у *Brassica sp.* эффективно мигрирует в ядра флоэмы и листовых клеток и связывает молекулы ДНК и РНК [17]. Во-вторых, учитывая обнаружение *miPEPs* у человека, встает вопрос о таксономической распространенности их у растений, т.к. до настоящего времени это явление обнаружено только у цветковых растений. Сравнительный анализ геномных и транскриптомных последовательностей нескольких классов и подклассов мхов послужил основой для подхода для решения этой задачи.

### Материалы и методы

Для ПЦР-амплификации промоторных районов гена, кодирующего *MIR156a* у *Brassica rapa* и арабидопсиса, а также фрагмента гена *PEX4* гриба *Fusarium avenaceum* [20] (контроль), были подобраны праймеры таким образом, чтобы продукты амплификации ДНК арабидопсиса и гриба различались по размеру. Для растений был использован следующий набор праймеров: *Brass-PIS* *d*(5' - *GGTTCGACCATGAATTTAAATACTCATTTTA*-3'), соответствующий консервативной последовательности в промоторе гена *miR156a* в родах *Brassica* и *Arabidopsis*, а также праймер *Brass-R2E* *d*(*GGAATTCGTTTATTGTAACATTTTTGTTAT*), который соответствует

последовательности генома около 5'-конца *pri-miR156a* (стартовая точка транскрипции). ПЦР проводили с использованием готовой смеси (Евроген, Россия) на амплификаторе *DT prime* (ДНК-Технологии, Россия). В реакционной смеси (25 мкл) содержалось 10 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда. Программа амплификации была одинакова и для *MIR156a* и *PEX4*: 95°C - 5 мин; 60°C - 15 сек, 72°C - 15 сек, 45 циклов. После очистки ПЦР фрагментов в агарозном геле они были клонированы в вектор *pUC18*.

Для анализа связывания пептидов с фрагментами ДНК клонированного промотора *MIR156a* (350 пар оснований) и его мутантной версией использовали метод сдвига в агарозном геле. Неспецифический ДНК-фрагмент длиной около 280 пар оснований представлял собой ПЦР продукт гена *PEX4*. Растворы пептида и ДНК смешивали в буфере, содержащем 10 mM *HEPES pH 8,0*, 50 mM *KCl*, 0,1 mM ЭДТА, 5%-ный глицерин. Образцы инкубировали 30 мин при комнатной температуре, смешивали с буфером для нанесения на гель и проводили электрофорез в 1,2% агарозном геле.

Протяженные нуклеотидные и белковые последовательности при-микроРНК растений были собраны из баз данных *NCBI* и *Peatmoss* ([https://peatmoss.online.unimarburg.de/ppatens\\_db](https://peatmoss.online.unimarburg.de/ppatens_db)). Транскриптомные и геномные нуклеотидные последовательности мхов (за исключением *Physcomitrium patens*) были в основном извлечены из баз данных *NCBI*. Сравнения последовательностей проводились с использованием алгоритма *BLAST* (*BLASTn* и *BLASTp*) в Национальном центре биотехнологической информации (*NCBI*). Открытые рамки считывания были идентифицированы с помощью программы *NCBI ORF Finder* ([http://www.bioinformatics.org/sms2/orf\\_find.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html)). Трансляцию генов и предсказание кодируемых белков выполняли также с использованием биоинформатического ресурса *ExpASy* (<http://web.expasy.org/translate/>). Последовательности 40 случайно выбранных пре-микроРНК мха *P. Patens* были получены из базы данных <https://mirbase.org/>, которая включает данные опубликованных последовательностей и аннотаций *miRNA* и *pre-miRNA*, с целью поиска полных генов и их промоторных районов.

### Полученные результаты

Ранее мы выявили способность *miPEP156a* капусты взаимодействовать с изолированной ДНК растений [17]. Кроме того, использование метода сдвига подвижности в агарозном геле подтвердило предсказания, что пептид обладает способностью связывать *in vitro* не только ДНП хроматина, но и очищенную ДНК растений и неспецифический фрагмент ДНК. При этом на высоких концентрациях пептид покрывает, видимо кооперативно, значительную часть длины молекул ДНК, т.к. при этом подвижность ДНП комплекса значительно снижается. Важно, что *miPEP156a* при экзогенной обработке проростков растений локализуется в ядрах клеток проводящей системы и листьев [17]. Эти результаты косвенно поддерживают предположение о прямом активирующем воздействии микропептида на промотор генов *miR156a*. Более того, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей промоторных районов этих генов позволил нам выявить высоко консервативный блок длиной 42 остатка, расположенный перед стартовой точкой транскрипции *pri-miR156a* на расстоянии 210-260 пар оснований (Рис. 2).

```

B. rapaTTTAGGGCTTGTGATGTTGGTCTTCCGCCAACAAAGGAAAG
|||||
A. thalianaTTTAGGGCTTGTGGTGTGGTCTTCCGCCAACAAAGGAAAG
AAAA

```

Рис. 2. Сравнение нуклеотидных последовательностей высоко консервативного блока длиной 42 остатка, расположенного перед стартовой точкой транскрипции *pri-miR156a* у растений капусты и арабидопсиса. Внизу рисунка показаны введенные в промотор мутации. Тетрамер динуклеотидов TG отмечен подчеркиванием.

Мы клонировали фрагменты промоторов *pri-miR156a* арабидопсиса и капусты, содержащие области перед ТАТА-элементом, включая найденные консервативные блоки нуклеотидов, и изучили их взаимодействие с *miPEP156a* капусты в сравнении с фрагментами контрольного гена *PEX4* гриба *Fusarium avenacium*. Было обнаружено, что промоторные фрагменты обладают существенно более высокой способностью связывать

*miPEP156a in vitro* (результаты не показаны). В ходе дальнейшей работы нами был проведен мутагенез промоторного высоко консервативного блока в центральной его части, включающей тетрамер динуклеотидов TG (Рис. 2). Сравнение эффективности связывания *miPEP156a* с мутированным и контрольным фрагментами промотора явно свидетельствует о ее снижении при введении мутаций в динуклеотиды TG (Рис. 3).

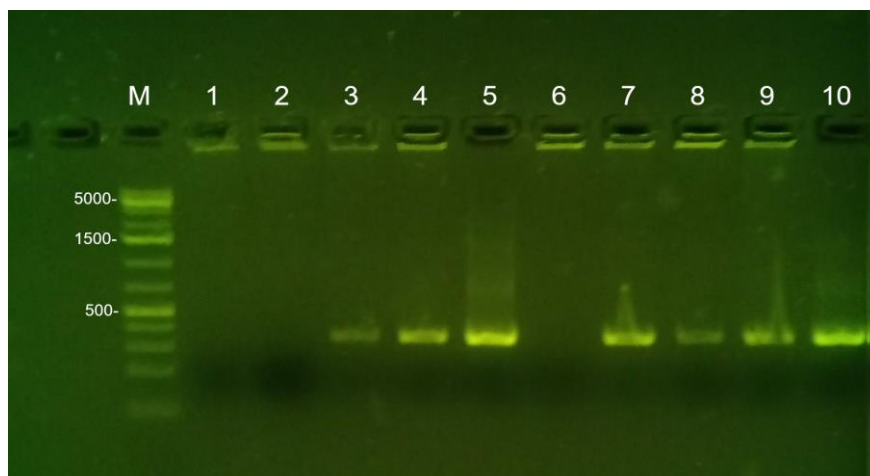


Рис. 3. Выявление комплексов пептид-ДНК в 1,2% агарозном геле после связывания пептида *miPEP156a* и промоторного фрагмента ДНК (0,9 мкг в пробе). (1-5) ДНК дикого типа; (1) Содержание пептида - 1,2 мкмоль; (2) содержание пептида - 0,8 мкмоль; (3) содержание пептида - 0,5 мкмоль; (4) содержание пептида - 0,35 мкмоль; (5) без добавления пептида; (6-10) мутантная ДНК; (6) содержание пептида - 1,2 мкмоль; (7) содержание пептида - 0,8 мкмоль; (8) содержание пептида - 0,5 мкмоль; (9) содержание пептида - 0,35 мкмоль; (10) без добавления пептида. (М) маркерная ДНК (короткие ДНК фрагменты - снизу вверх 100, 200, 300, 400, 500 пн).

Выяснилось, что при использовании метода сдвига подвижности в агарозном геле, добавление в пробу 1,2 мкмоль пептида вызывает для фрагментов промотора переход в малоподвижную высокомолекулярную форму, локализирующуюся на старте. Однако при использовании 0,8 мкмоль пептида большая часть молекул мутантной ДНК остается не связанной с пептидом, тогда как фрагменты ДНК дикого типа полностью переходят в малоподвижную высокомолекулярную форму (Рис. 3). Таким образом, введение мутаций в промоторный тетрамер динуклеотидов TG заметно влияет на сродство к *miPEP156a*.

Обнаруженные до сих пор *miPEP* растений найдены только у двудольных [24, 25]. Вопрос о том, насколько широко распространены *miPEP* в других растительных таксонах, весьма важен для понимания эволюционного происхождения таких микропептидов. В качестве первоначального подхода мы провели поиск таксономически консервативных *miPEP* у мхов, т.к. микроРНК весьма детально изучены в случае мха *Physcomitrium patens* и их последовательности представлены в доступной базе данных <https://mirbase.org/>. Наше внимание привлекли последовательности *Ppt-pri-miR160a*, локализованные в хромосомах 9 и 15. Для этих двух генов в области, предшествующей последовательности *pre-miR160a*, были обнаружены достаточно короткие ОРТ, которые кодировали пептиды, имеющие явное сходство аминокислотных последовательностей в центральной области (Рис. 4А и Табл. 1). Более того, высококонсервативный пептидный блок из *Ppt-miPEP160a* был выявлен в коротких белках, закодированных в *pri-miR160a* у еще трех мхов (*Pohlianutans*, *Ceratodonpurpureus* и *Syntrichiacaninervis*), для которых к настоящему моменту были определены частичные последовательности геномов (Рис. 4Б и Табл. 1). Неожиданным оказался тот факт, что все пять геномных областей мхов, кодирующих *pri-miR160a*, содержат консервативный блок нуклеотидов длиной более 60 остатков в промоторной области гена (Табл. 1). Важно, что дополнительный анализ выявил кодирующий потенциал для высоко консервативного пептидного блока *miPEP160a* в транскриптах и геномных фрагментах у почти 20 мхов из класса *Bryopsida*. Более того, весьма похожие пептидные блоки найдены в коротких белках, кодируемых мхами классов *Polytrichopsida* и *Takakiopsida* (Рис. 4Б). Учитывая, что последний класс является



наиболее древней филогенетической ветвью в отделе *Bryophyta* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), это явно указывает на высокую эволюционную консервацию коротких белков-аналогов *miPEP160a* среди всех мхов. Интересно, что анализ транскриптомных и геномных последовательностей высших растений, животных и грибов не выявил белков, несущих сегменты, сходные с высоко консервативным пептидным блоком мхов.

**А**

Chr.15 (85 aa)

MSGRVCSVCAIVLEPAWPSFVSVAIVPLCDAATTYTMHRLTPINCSFSPSHSVQPSQYFASSLHSLYLPL-RCVWLAHFERCTG  
 R CS V L P+WP S AYVP CDAATTYTM PHLTPH+CS P + P A L+S C L R  
 MRRCSSRVQ-QLVPSWPP-SSAYVPSCDAAATTYTMRPHLTPHCSL-IPLRFI-PIILLRALPLFSSSSSSPYCASLL-GARLLQ

Chr.9 (79 aa)

**Б**

Класс/подкласс	Вид мха	Последовательность пептида
Bryopsida/Funariidae	<i>Physcomitrium patens</i> (chr.15)	AATTYTMHRLTPINCSF
	<i>Physcomitrium patens</i> (chr.9)	AATTYTMRPHLTPHCSL
	<i>Funaria hygrometrica</i>	SATTYTMRPHLTPHCSL
	<i>Encalypta streptocarpa</i>	AATTYTMHRLTPHCSL
Takakiopsida	<i>Takakia lepidioides</i>	AITSYTMHRLTPHCSL
Bryopsida/Diphysciidae	<i>Diphyscium foliosum</i>	AATTYTMHRLTPHCSL
Polytrichopsida	<i>Pogonatum convolutum</i>	ILTTYHWHHPHEVKTLLFS
	<i>Alophosia azorica</i>	LLTTSALHRLTPHCSL
Bryopsida/Dicranidae	<i>Leucobryum glaucum</i>	AFTTYTMHRLTPHCSL
	<i>Ceratodon purpureus</i>	AFTTYTMHRLTPHCSL
	<i>Syntrichia caninervis</i>	VFTTYTMHRLTPHCSL
	<i>Tortula truncata</i>	VFTTYTMHRLTPHCSL
	<i>Leucoloma rehmannii</i>	VLYTPTNHPHLSPLSDR
	<i>Scouleria aquatica</i>	ATATYTSHPHLSPIFTAL
Bryopsida/Bryidae	<i>Pohlia nutans</i>	ATTTYTLHRLTPHCSL
	<i>Pseudotaxiphyllum elegans</i>	ILTRSTLHRLTPHCSL
	<i>Pilotrichum evanescens</i>	VLMTYTLHPSMTPDLTAL
	<i>Plagiothecium laetum</i>	PPLPYSLHRLTPHCSL
	<i>Philonotis vagans</i>	SNCLFPLHRLTPHCSL
	<i>Leptobryum pyriforme</i>	CCTTYTMHRLTPHCSL
	<i>Leptostomum menziesii</i>	MSHTPTQHPHLPAPHTQP
	<i>Schlotheimia ferruginea</i>	KVAFYSRHPHLPSPNCYF

Рис. 4. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей коротких белков, кодируемых *pri-miR160a* из хромосом номер 9 и 15 у *P. patens*. В скобках указаны размеры белков. Пептидные блоки, консервированные у других мхов, отмечены затемнением. (Б) Сравнение аминокислотных последовательностей высоко консервативных пептидных блоков у трех классов мхов. Остатки, идентичные выявленным в последовательностях коротких белков *Prt-miPEP160a*, выделены с помощью затемнения текста.

**Выводы.**

В данной работе мы продолжили изучение возможных функций обнаруженного ранее пептида *miPEP156a*, кодируемого 5'-концевой областью *pri-miR156a* у всех растений семейства капустных. Конец формы как и биогенез мРНК, образование *pri-miRNA* включает те же процессы, включая транскрипцию, эспирование, полиаденилирование и сплайсинг. Гены микроРНК транскрибируются ДНК-зависимой РНК-полимеразой II (*Pol II*) и, таким образом, некоторые факторы, часто связанные с *Pol II*, могут влиять на транскрипцию таких генов [21]. В частности, у растений арабидопсиса белковый комплекс “Медиатор” играет решающую роль в привлечении *Pol II* к промоторам генов микроРНК. В этот комплекс входят МЕДИАТОР 20А (*MED20A*), МЕДИАТОР 17 (*MED17*) и МЕДИАТОР 18 (*MED18*). У этих мутантов уровень транскрипции *pri-miRNA* сильно снижен. Некоторые другие факторы транскрипции, такие как ядерные белки *RBV* (ядерный *WD40* домен-содержащий фактор), *CDC5* и *DOF*, также вызывают модуляцию транскрипции микроРНК. Эти ДНК-связывающие белки положительно регулируют привлечение *Pol II* к промоторам микроРНК и ее активность. Другие белковые факторы, например, *GCN5*, *SWINGER* (*SWN*), *CURLY LEAF* (*CLF*), *CHR2* и *PICKLE* (*PKL*), также регулируют транскрипцию *pri-miRNA* благодаря своей активности в ре-моделировании хроматина в области промотора [21]. Можно предположить, что взаимодействие *miPEP156a* с промоторным высоко консервативным блоком нуклеотидов может регулировать

активность таких транскрипционных факторов, направленно ускоряя и стабилизируя их взаимодействие с промоторными областями генов *pri-miR156a*.

Таблица 1. Организация геномной области, кодирующей *pri-miR160a* у ряда мхов

Вид мха и номер кодирующей хромосомы	Координаты консервативного блока остатков в промоторе	Положение стартовой точки транскрипции	Координаты кодирующего района высоко консервативной аминокислотной последовательности внутри <i>miPEP160a</i>	Положение начальной точки участка <i>pri-miR160a</i>
<i>Physcomitrium patens</i> chr.15 (ABEU02000015*)	1-64	408	616-657	2842
<i>Physcomitrium patens</i> chr. 9 (ABEU02000009)	1-64	427	692-733	3085
<i>Ceratodon purpureus</i> chr.7(JACMSB010000170)	1-64	Не определено	759-800	3115
<i>Syntrichiacaaninervis</i> chr.3(JADDRJ010000003)	1-64	Не определено	533-574	2138
<i>Pohlianutans</i> chr. 7(JADDRJ010000003)	1-64	Не определено	830-871	2286

\* - соответствует номеру NCBI accession

К настоящему времени очевиден тот факт, что у высших растений первичные транскрипты микроРНК (*pri-miRNA*) могут транслироваться с образованием пептидов размером от десяти до нескольких десятков остатков, названных *miPEP*, которые участвуют в регуляторных путях при биосинтезе микроРНК [10, 11]. Однако, до сих пор не совсем ясно, в какой степени такие механизмы сохраняются у других видов эукариот, в частности, у животных, грибов и нецветковых растений.

В последние годы появились доказательства трансляции *pri-miRNA* в клетках человека [7, 8, 22]. Так, ген человека *pri-miR-22* может продуцировать *miPEP*, функция которого неизвестна, а *pri-miR-200* может транслироваться с образованием *miPEP*, который регулирует синтез Виментина, мишень *MIR200*. Кроме того, было выяснено, что *miPEP155* человека контролирует презентацию антигенов, опосредованную комплексом гистосовместимости класса II. Совсем недавно *miPEP133*, кодируемый *pri-miR34a*, был идентифицирован как супрессор туморогенеза, локализованный в митохондриях [22, 23]. Наконец, в одной из последних работ был описан пептид, названный *miPEP31*, который кодируется *pri-miRNA-31*. Этот пептид высокоэффективно экспрессируется в регуляторных Т-клетках и способствует их дифференцировке. Полученные результаты показывают, что *miPEP31* подавляет экспрессию *miR-31* и резко подавляет экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит. Предполагается, что *miPEP31* действует как репрессор транскрипции, ингибирующий экспрессию *miRNA-31*, и участвует в поддержании иммунного гомеостаза путем стимулирования дифференцировки регуляторных Т-клеток. Он может представлять собой потенциальный терапевтический пептид для модуляции экспрессии микроРНК и лечения аутоиммунных заболеваний [23].

Важно, что у насекомого *Drosophila melanogaster* также была обнаружена способность продуцировать *miPEP*. В частности, в *pri-miR-8* обнаружена небольшая ОПТ, кодирующая потенциальный пептид длиной 71 аминокислотный остаток, который назвали *miPEP-8*. Экспрессия этого пептида сильно влияет на развитие и выживание мух [22]. Таким образом, у *Metazoa* *miPEP*-зависимые механизмы встречаются у организмов разных типов. Сходным образом, результаты данной работы указывают на высокую эволюционную консервацию *miPEP* не только у цветковых двудольных растений, но и у мхов. При этом нами было предсказано кодирование белков-аналогов *miPEP160a* для трех классов мхов, включая наиболее древний класс *Takakiopsida*. Механизмы действия таких пептидов предстоит выяснить в дальнейших работах

### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: 1) *miPEP156a* у капустных растений прямо связывается с высоко



консервативной последовательностью промотора *pri-miR156a* и скорее всего участвует в активации этого промотора, взаимодействуя с транскрипционными факторами и/или ДНК-зависимой РНК-полимеразой II; 2) механизмы регуляции транскрипции *pri-miRNA* с помощью *miPEP*, по-видимому, оперируют не только у двудольных растений, но и у мхов. Мы обнаружили высокую консервацию центральной области протяженного пептида *miPEP160a*, кодируемого, по-крайней мере, тремя классами мхов, включая *Bryopsida*, *Polytrichopsida* и *Takakiopsida*.

#### Список литературы

1. Rogers K. and Chen X. *Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs* // *Plant Cell*. 2013.V. 25. No7. P. 2383–2399.
2. Li M. and Yu B. *Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis* // *RNA Biology*. 2021. V. 18. No 12.P. 2087-2096.
3. Wang J, Mei J, Ren G. *Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation*. *Frontiers in Plant Sciences*. 2019.No10. P. 360.
4. Laouressgues D, Couzigou J.M, Clemente H.S, Martinez Y, Dunand C, Bécard G, Combier J.P.// *Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides*.*Nature*. 2015.V.520. No 7545. P. 90-93.
5. Couzigou J.M, Laouressgues D, Bécard G, Combier J.P. // *miRNA-encoded peptides (miPEPs): A new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology*. *RNA Biology*. 2015.V. 12. No11. P. 1178-1180.
6. Yeasmin F, Yada T, Akimitsu N. // *Micropeptides Encoded in Transcripts Previously Identified as Long Noncoding RNAs: A New Chapter in Transcriptomics and Proteomics*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29922328>*FrontiersinGenetics*. 2018. V. 9. P. 144.
7. Fang J, Morsalin S, Rao V.N, Reddy E.S.P. // *Decoding of non-coding DNA and non-coding RNA: pri-micro RNA-encoded novel peptides regulate migration of cancer cells*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology*. 2017.V. 3. No 1. P. 23-27.
8. Prel A, Dozier C, Combier J.P, Plaza S, Besson, A.// *Evidence That Regulation of Pri-miRNA/miRNA Expression Is Not a General Rule of miPEPs Function in Humans*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. No 7. P. 3432.
9. Hellens R.P, Brown C.M, Chisnall M.A.W, Waterhouse P.M, Macknight R.C. // *The Emerging World of Small ORFs*, *Trends Plant Sciences*. 2016. V. 21. No 4. P. 317-328.
10. Ren Y, Song Y, Zhang L, Guo D, He J, Wang L, Song S, Xu W, Zhang C, Lers A, Ma C, Wang S. // *Coding of Non-coding RNA: Insights Into the Regulatory Functions of Pri-MicroRNA-Encoded Peptides in Plants*. *Frontiers Plant Sciences*. 2021. V. 12. No. 641351.
11. Prasad A, Sharma N, Prasad M. // *Noncoding but Coding: Pri-miRNA into the Action*. *Trends in Plant Sciences*. 2021. V. 26. No 3. P. 204-206.
12. Ram M.K, Mukherjee K, Pandey D.M. // *Identification of miRNA, their targets and miPEPs in peanut (Arachis hypogaea L.)*. *Computational Biology and Chemistry*. 2019. V. 83. No. 107100.
13. Sharma A, Badola P.K, Bhatia C, Sharma D, Trivedi P.K. // *Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in Arabidopsis*. *Nature Plants*. 2020. V. 6. No 10. P. 1262-1274.
14. Chen Q.J, Deng B.H, Gao J, Zhao Z.Y, Chen Z.L, Song S.R, et al. // *A miRNA-encoded small peptide, vvi-miPEP171d1, regulates adventitious root formation*. *Plant Physiology*. 2020. V. 183. No. 2. P. 656-670.
15. Couzigou J.M, André O, Guillotin B, Alexandre M, Combier J.P.// *Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean*. *New Phytology*. 2016. V. 211. No. 2. P. 379-381.
16. Morozov S.Y, Ryazantsev D.Y, Erokhina T.E. // *Bioinformatics Analysis of the Novel Conserved Micropeptides Encoded by the Plants of Family Brassicaceae*. *Journal of Bioinformatics and Systems Biology*. 2019. V. 2. No. 2. P. 066-077.
17. Erokhina T.E, Ryazantsev D.Y, Samokhvalova L.V, Mozhaev A.A, Orsa A.N, Zavriev S.K, Morozov S.Y. // *Activity of Chemically Synthesized Peptide Encoded by the miR156A*

- Precursor and Conserved in the Brassicaceae Family Plants. Biochemistry (Moscow).* 2021. V. 86. No. 5. P. 551-562.
18. Badola P.K, Sharma A, Gautam H, Trivedi P.K. // *MicroRNA858a, its encoded peptide, and phytosulfokine regulate Arabidopsis growth and development. Plant Physiology.* 2022. No (ahead of print) kiac138.
  19. Ormancey M, Le Ru A, Duboe C, Jin H, Thuleau P, Plaza S, Combier J.P.// *Internalization of miPEP165a into Arabidopsis roots depends on both passive diffusion and endocytosis-associated processes. International Journal of Molecular Sciences.* 2020. V. 21. No. 7. P. 2266.
  20. Gao F.Y, Li L, Wang J.Y, Wang Y.L, Sun G.C. // *The functions of PEXgenes in peroxisome biogenesis and pathogenicity in phytopathogenic fungi. Hereditas.* 2017. V. 39. No. 10. P. 908-917.
  21. Zhang L, Xiang Y, Chen S, Shi M, Jiang X, He Z, Shuai Gao S. // *Mechanisms of MicroRNA Biogenesis and Stability Control in Plants. Frontiers Plant Sciences.* 2022. V. 13. No. 844149.
  22. Montigny A, Tavormina P, Duboe C, San Clémente H, Aguilar M, Valenti P, Lauressergues D, Combier J. P, Plaza S. // *Drosophila primary microRNA-8 encodes a microRNA-encoded peptide acting in parallel of miR-8. Genome Biol.* 2021. V. 22. No. 1. P. 118.
  23. Zhou H, Lou F, Bai J, Sun Y, Cai W, Sun L, Xu Z, Liu Z, Zhang L, Yin Q, Zhang J, Gao Y, Wang Z, Niu L, Cai X, Deng S, Wang H, Xia L, Ginhoux F, Li Q, Wang H.// *A peptide encoded by pri-miRNA-31 represses autoimmunity by promoting Treg differentiation.* 2022. *EMBO Rep.* No e53475.
  24. de Araújo P. M, Grativol C. // *In silico identification of candidate miRNA-encoded Peptides in four Fabaceae species.* 2022. *Comput. Biol. Chem.* V. 97. No 107644.
  25. Lauressergues D, Ormancey M, Guillotin B, San Clemente H, Camborde L, Duboé C, Tourneur S, Charpentier P, Barozet A, Jauneau A, Le Ru A, Thuleau P, Gervais V, Plaza S, Combier J. P.// *Characterization of plant microRNA-encoded peptides (miPEPs) reveals molecular mechanisms from the translation to activity and specificity.* 2022. *Cell Rep.* V. 38. No 6. P. 110339

**Сведения об авторах**

**Татьяна Николаевна Ерохина**

к.х.н., старший научный сотрудник  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
Москва, Россия

**E-mail:**erokhina@yahoo.com

**Сергей Кириакович Завриев,**

д.б.н., член-корр. РАН, профессор,  
зав. Отделом Институт биоорганической химии им.  
академиков М.М. Шемякина и .А.Овчинникова РАН  
Москва, Россия

**E-mail:**szavriev@ibch.ru

**Дмитрий Юрьевич Рязанцев,**

к.б.н., старший научный сотрудник  
Институт биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
Москва, Россия

**E-mail:** d.yu.ryazantsev@gmail.com

**Сергей Юрьевич Морозов,**

д.б.н., профессор,  
зав. Лабораторией НИИ физико-химической биологии  
им. А.Н. Белозерского, Московский государственный  
университет им. М.В. Ломоносова,  
Москва, Россия

**E-mail:** morozov@genebee.msu.ru

**Information about authors**

**Tatiana Nikolaevna Erokhina,**

PhD,  
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic  
Chemistry, Russian Academy of Science  
Moscow, Russia

**E-mail:**erokhina@yahoo.com

**Sergey Kiriakevich Zavriev,**

professor,  
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic  
Chemistry, Russian Academy of Science  
Moscow, Russia

**E-mail:**szavriev@ibch.ru

**Dmitriy Yurievich Ryazantsev,**

PhD,  
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic  
Chemistry, Russian Academy of Science  
Moscow, Russia

**E-mail:** d.yu.ryazantsev@gmail.com

**Sergey Yurievich Morozov,**

professor,  
Belozersky Institute of Physico-Chemical Biol-  
ogy, Lomonosov Moscow State University  
Moscow, Russia

**E-mail:** morozov@genebee.msu.ru

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОТОПНО-ИЗМЕНЕННОЙ ВОДЫ В  
БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ**

*В обзоре дана краткая история изучения биологических изотопных эффектов, связанных с заменой H<sub>2</sub>O на D<sub>2</sub>O, объяснена квантовая природа кинетических и термодинамических изотопных эффектов дейтерия, а также изотопных эффектов тяжелой воды как растворителя. Рассмотрены некоторые возможные медицинские приложения.*

**Ключевые слова:** тяжелая вода, D<sub>2</sub>O, облегченная вода, регенерация, выживаемость, онкология, метастазы.

V. I. Lobyshev  
Lomonosov Moscow State University

**PROSPECTS FOR THE USE OF ISOTOPE-MODIFIED WATER  
IN BIOLOGY AND MEDICINE**

*The review gives a brief history of the study of biological isotopic effects associated with the replacement of H<sub>2</sub>O by D<sub>2</sub>O, explains the quantum nature of kinetic and thermodynamic isotopic effects of deuterium, as well as isotopic effects of heavy water as a solvent. Some possible medical applications are considered.*

**Keywords:** heavy water, D<sub>2</sub>O, light water, regeneration, survival, oncology, metastases.

Изотопные эффекты тяжелой воды в биологических системах были обнаружены практически сразу после получения концентрированной D<sub>2</sub>O в 1933 г [1-3]. К 1939 г. было опубликовано множество работ, проведенных на живых организмах разных уровней организации от автотрофных одноклеточных водорослей до млекопитающих. Результатом этих исследований стал вывод о несовместимости тяжелой воды с жизнью. С 1940 г. открытые публикации на тему изотопных эффектов дейтерия исчезают по политическим причинам и возобновляются с проведением Международной конференции по мирному использованию атомной энергии в 1955 г. В 1959 г. было установлено, что одноклеточные водоросли могут жить и развиваться в воде, содержащей 99,7% дейтерия, после периода длительной адаптации [4]. Справедливости ради стоит отметить работу [5], в которой французские авторы уже в 1935 г. показали возможность развития высушенных микроорганизмов при помещении их в тяжелую воду. Эта работа оказалась незамеченной в англоязычной литературе и была впервые процитирована лишь в 1981 г. в отечественной публикации [6, с.9]. Возможность выращивания живых организмов в тяжелой воде стимулировала большое количество исследований в этом направлении, включающих медицинские приложения и культивацию микроорганизмов с целью получения дейтерированных метаболитов. Более подробно с результатами исследований изотопных эффектах тяжелой воды до 1978 г. можно ознакомиться в работе [7]. Кратко суммируем основные эффекты, наблюдаемые при смене обычной воды на тяжелую:

- ✓ низшие организмы – водоросли, бактерии, грибы, вирусы, фаги, простейшие могут быть культивированы в тяжелой воде. Высшие растения не выдерживают полного дейтерирования и при 75% дейтерия в воде их рост останавливается. Млекопитающие еще более чувствительны к тяжелой воде и концентрация дейтерия 30% в тканевой жидкости является для них летальной;
- ✓ антимитотическое влияние D<sub>2</sub>O проявляется в нарушении соотношения фаз деления, уменьшения скорости деления и при 75% дейтерия полной блокировке деления клеток;
- ✓ замедляются все биохимические реакции;
- ✓ мутагенное действие практически отсутствует;
- ✓ синтезируются дейтерированные метаболиты;

- ✓ в клетках растений и животных ингибируется синтез ДНК и, в меньшей степени, РНК;
- ✓ в рибосомах синтез белка не меняется;
- ✓ спонтанная подвижность мгновенно останавливается;
- ✓ скорость движения цитоплазмы в клетках имеет адаптационный характер;
- ✓ период циркадного и других физиологических ритмов увеличивается;
- ✓ нарушается состояние центральной нервной системы, гормональная регуляция, сердечная деятельность, водообмен (уменьшается потребление воды и ее выделение), работа почек;
- ✓ увеличивается устойчивость к физическим факторам (давление, температура, излучение, в том числе ионизирующее);
- ✓ увеличивается оптимальная температуры обитания – опыт с мухами дрозофилами;
- ✓ быстрота проявления большинства эффектов говорит о действии воды как растворителя;
- ✓ наблюдаемые эффекты обратимы.

Изотопные эффекты, в частности дейтерия, имеют квантовую природу и связаны с частотой и, соответственно, энергией колебаний протона в химической связи. Поэтому от величины классической энергии активации нужно перейти к квантовому представлению, в котором энергия нулевых колебаний более тяжелого дейтрона вдоль координаты реакции будет в 1,4 раза меньше, чем протона. Поэтому энергия активации для дейтрона будет больше, чем для протона и, как следствие, скорость реакции с переносом дейтрона будет меньше. Кроме описанных первичных изотопных эффектов дейтрона существуют изотопные эффекты воды как растворителя. Электронные и геометрические характеристики молекул  $H_2O$  и  $D_2O$  отличаются незначительно, но вязкость  $D_2O$  и связанные с ней характеристики на 20 процентов больше, а время жизни синглетного кислорода в 16 раз больше, чем в  $H_2O$  [7, 8]. Последний изотопный эффект является рекордным и играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах.

Поскольку  $D_2O$  проявляет себя как антимитотический агент, естественно было выяснить ее влияние на рост злокачественных опухолей. Еще в 1936 г. было показано, что культура ткани карциномы мышей не может расти в среде, содержащей больше 50% тяжелой воды. Были также проведены эксперименты *in vivo*. В качестве примера приведем результаты исследований на мышах, зараженных асцитной опухолью и лейкемией [7]. Как видно из рис.1, употребление  $D_2O$  в качестве питья заметно увеличивает продолжительность жизни зараженных животных. Особенно эффективно оказалось сочетанное действие  $D_2O$  и рентгеновского облучения в лечении лейкемии при котором через 360 суток достигается 80% излечение. Аналогичный синергетический эффект наблюдали при развитии асцитной опухоли Кребс-2 за 14 суток после заражения мышей при использовании циклофосамида и  $D_2O$  [7]. Положительные результаты были получены недавно на модели метастазирующей меланомы мыши и мышинной модели ксенотрансплантата меланомы человека, при этом подчеркивается отсутствие побочных эффектов [8]. Аналогичные положительные результаты были получены при исследовании других опухолей [9-17].

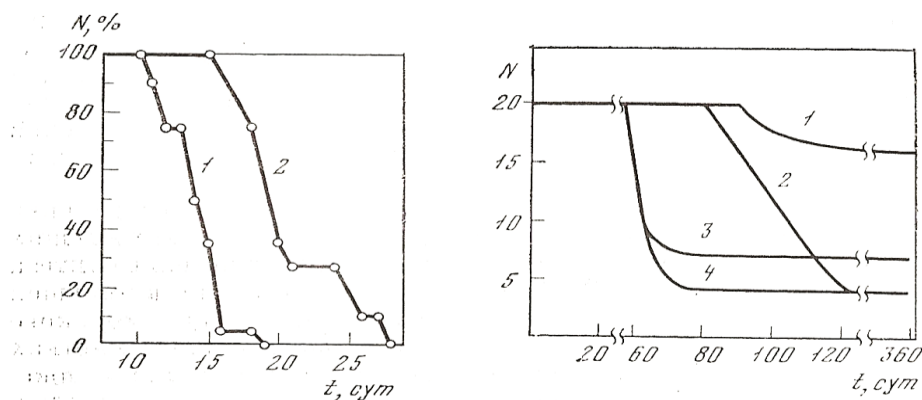


Рисунок 1. Слева –

число выживших мышей, употреблявших в качестве питья ( $H_2O$ -1) и ( $D_2O$ -2) после заражения асцитной опухолью. Справа – число живых мышей, зараженных лейкемией при разных способах лечения (1-3) и в контроле (4). 1- тяжелая вода 25% и рентгеновское облучение, 2-тяжелая вода, 3-рентгеновское облучение.

Раствор  $D_2O$  был успешно использован при консервации органов [18]. Эффективность защиты печени крыс, подвергнутых длительной консервации в холоде и последующей реперфузии, происходит в первую очередь за счет ингибирования отека трансплантата, тем самым улучшая доставку и использование кислорода печенью с ранней фазы реперфузии. Кроме того,  $D_2O$  предотвращал перегрузку цитозоля  $Ca^{2+}$  и последующие вредные события, включая повреждение митохондрий, нарушение цитоскелета и, как следствие, апоптоз и некроз [19].

Большое место занимают исследования количества воды в организмах человека и животных с использованием метода изотопного разбавления. Радиоактивная тритиевая вода  $T_2O$  также используется для этой цели, но стабильный изотоп дейтерия обеспечивает полное отсутствие лучевой нагрузки [20-22].

Увеличенная дегрануляция базофилов и эозинофилов из венозной крови при помещении их в растворы тяжелой воды может использоваться в качестве диагностического теста на аллергическое состояние [23].

Особое место занимают исследование биологических эффектов в воде с небольшими изменениями концентрации дейтерия относительно его нормального содержания, в том числе в воде с обедненным содержанием дейтерия. Показано, что природные вариации изотопного состава при сезонном таянии-замерзании воды приводят к активации роста одноклеточных водорослей [24], а увеличение содержания дейтерия в воде до 0,1% сопровождается неожиданно большим увеличением скорости гидролиза  $Na$ ,  $K$ - $ATPase$ , а также увеличением скорости регенерации гидроидных полипов [25, 26]. Обедненная дейтерием вода (ОДВ) делает более устойчивой терморегуляцию мышей [27], увеличивает продолжительность жизни микроорганизмов при помещении их в среду, содержащую токсичные металлы [28]. Продолжительность жизни пресноводных одноклеточных ингибируется как большими, так и малыми концентрациями дейтерия в воде [29]. При изучении активности гипофиза крыс как в ОДВ, так и 50%  $D_2O$  наблюдали повышение концентрации тироксина и снижение уровня тиреотропного гормона в сыворотке крови [30]. Эффективность работы митохондрий падает в ОДВ [31]. Высказана гипотеза, что малые изменения изотопного состава могут приводить к изменению числа спонтанных открытых состояний в цепочке ДНК [32]. ОДВ замедляет рост опухоли простаты [32]. Методами протеомики показано, что влияние ОДВ связано с возникновением окислительного стресса [33]. К перечисленным широким возможностям применения  $D_2O$  следует добавить еще и применение дейтерированных препаратов.

### Список литературы

1. Lewis G.N. The biochemistry of water containing hydrogen isotope // J. Amer. Chem. Soc., 1933. V.55, No 8, P. 3503-3504.
2. Lewis G.N. The biology of heavy water // Science. 1934. V. 79. No 2042. P. 151-153.
3. Taylor H.S., Swingle W.W., Eyring H., Frost A.A. The effect of water containing the isotope

- of hydrogen upon fresh water organisms // J. Cell. Comp. Physiol. 1933. V. 4. No 1. P.1-8.*
4. Crespi H L., Archer S.M., Katz J.J. *Culture of algae and other microorganisms in deuterium oxide // Nature. 1959. V. 184. No 4687. P.729-730.*
  5. Plantefol L., Champetier G. *Action de l'eau dense (oxide de deutohydrogene) sur les animaux reviviscentes // Comt. Rend. Acad. Sci. (Paris)/ 1935. T. 200. No 7. 587-589.*
  6. *Голдовский А.М. Анабиоз. Изд. АН СССР, Ленинград, 1981. 136 С.*
  7. *Лобышев В.И., Калинин Л.П. Изотопные эффекты D2O в биологических системах // Изд. Наука. Москва. 1978. 215 с.*
  8. Wook Kim, Jae MyungPark, Yoon JinRoh, Ju HeeKim, Myung-GyuChoi, Tayyaba Hasan. *Direct measurement of singlet oxygen by using a photomultiplier tube-based detection system // J. Photochem.Photobiol. B: 2016. V.159. P.14-23.*
  9. Jandova J., Hua A.B., Fimbres J, Wondrak G.T. *Deuterium Oxide (D2O O) Induces Early Stress Response Gene Expression and Impairs Growth and Metastasis of Experimental Malignant Melanoma // Cancers (Basel) 2021. V.13. No 4. P.605. doi: 10.3390/cancers13040605.*
  10. Kleemann J., Reichenbach G, Zöller N., Jäger M., Kaufmann R., Meissner M., Kippenberger S. *Heavy Water Affects Vital Parameters of Human Melanoma Cells in vitro // Cancer Manag Res. 2020. V.12: P. 1199–1209. doi: 10.2147/CMAR.S230985*
  11. Matroule J.Y., Carthy C.M., Granville D.J., Jolois O., Hunt D.W., Piette J. *Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization // Oncogene 2001. V.20. No30. P:4070-84. doi: 10.1038/sj.onc.1204546.*
  12. Uemura T, Moritake K, Akiyama Y, Kimura Y, Shingu T, Yamasaki T.
  13. *Experimental validation of deuterium oxide-mediated antitumoral activity as it relates to apoptosis in murine malignant astrocytoma cells. J Neurosurg. 2002. V.96. No 5. P. 900-908. doi: 10.3171/jns.2002.96.5.0900.*
  14. Soleyman-Jahi S, Zendehdel K, Akbarzadeh K, Haddadi M, Amanpour S, Muhammadnejad S. *In vitro assessment of antineoplastic effects of deuterium depleted water // Asian Pac J Cancer Prev. 2014. V.15. No 5. P.:2179-83. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.5.2179.*
  15. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V. *Time-dependent effect of deuterium depletion on tumor growth and metastasis // Russian Open Medical Journal. 2020. V. 9. Iss. 2. DOI: 10.15275/rusomj.2020.0210*
  16. Hartmann J., Bader Y., Horvath Z., Saiko P., Grusch M., Illmer C., Madlener S., Fritzer-Szekeres M., Heller N., Alken R-G., szekeres T. *Effects of Heavy Water (D2O) on Human Pancreatic Tumor Cells // Anticancer Res. 2005. V.25. P. 3407-3412.*
  17. Bader Y, Hartmann J, Horvath Z, Saiko P, Grusch M, Madlener S, Maier S, Oehler L, Fritzer-Szekeres M, Heller N, Alken RG, Krupitza G, Szekeres T. *Synergistic effects of deuterium oxide and gemcitabine in human pancreatic cancer cell lines // Cancer Lett. 2008. V.259. No 2: P. 231-239. doi: 10.1016/j.canlet.2007.10.010*
  18. Kosenkov A.V., Gulyaev M.V., Lobysh V.I., 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, V. 63, No. 5, P. 820–824. DOI: 10.1134/S0006350918050111*
  19. Wenzel, M.; Fischer, J.H. *Organ preservation with heavy water—Effect of D2O concentration and temperature on organ swelling // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1983. V. 21. P. 83–89.*
  20. Shimada S., Fukai M., Shibata K., Sakamoto S., Kenji Wakayama K., Ishikawa T., Kawamura N., Fujiyoshi M., Shimamura T., Taketomi A. *Heavy Water (D2O) Containing Preservation Solution Reduces Hepatic Cold Preservation and Reperfusion Injury in an Isolated Perfused Rat Liver (IPRL) Model // J. Clin. Med. 2019. V. 8. P. 1818. doi:10.3390/jcm8111818*
  21. Bila WC, Freitas AE, Galdino AS, Ferriolli E, Pfrimer K, Lamounier JA. *Deuterium oxide dilution and body composition in overweight and obese schoolchildren aged 6-9 years // J Pediatr (Rio J). 2016. V. 92. No 1. P. 46-52. doi: 10.1016/j.jpmed.2015.03.007*
  22. Estela Beatriz Behling, José Simon Camelo Júnior, Eduardo Ferriolli, Karina Pfrimer,.,

- Jacqueline Pontes Monteiro. Nutritional status in children with cancer: comparison of deuterium oxide dilution with bioelectric impedance analysis and anthropometry // Comparative Study Rev Paul Pediatr. . 2021. doi: 10.1590/1984-0462/2021/39/2019209.*
23. *Barbosa-Cortés L, Tapia-Rojas M, López-Aguilar E, Mejía-Aranguré JM, Rivera-Márquez H. Body composition by dilution of deuterium oxide in Mexican children with lymphoma and solid tumors // Nutrition. 2007. V. 23. No 10. P. 739-44. doi: 10.1016/j.nut.2007.07.001*
  24. *Palczyński C, Górski P, Grzegorzczak J. Eosinophil and basophil hypersensitivity to deuterium oxide in atopic asthmatic patients // Allergol Immunopathol (Madr). 1989. V.17. No 3. P.137-9.*
  25. *Лобышев В.И., Мельников И.А. Есиков А.Д., Нечаев В.В. Исследование изотопного состава кислорода арктического дрейфующего льда в связи с проблемой активации роста микроорганизмов на границе тающего льда. // Биофизика 1984. № 5. с. 835-839.*
  26. *Лобышев В.И., Фогель Ю., Яковенко Л.В., Резаева М.Н., Твердислов В.А. D2O как модификатор ионной специфичности Na,K-АТФазы // Биофизика 1982. №4. С. 595-603.*
  27. *Лобышев В.И. Аномальное активирующее влияние тяжелой воды малой концентрации на регенерацию гидродных полипов // Биофизика 1983. №4. С. 666-668.*
  28. *Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P., Diatropova M.A., Diatropov M.E., Yaglov V.V. Impact of Reduced Deuterium Intake on Thermoregulation // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2021. Vol. 171. No.5. P. 572-575. DOI 10.1007/s10517-021-05271-8.*
  29. *Avila D.S., Somlyai G., Somlyai I., Aschner M. Anti-aging effect of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a C. elegans model // Toxicology letters. 2012. doi: 10.1016/j.toxiclet.2012.04.014.*
  30. *Syroeshkin A., Pleteneva T., Uspenskaya E., Zlatskiy I., Antipova N., Grebennikova T., Levitskaya O. D/H control of chemical kinetics in water solutions under deuterium concentrations // Chem. Eng. J.2018. doi: 10.1016/cej.2018.08.213.*
  31. *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 // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2021. Vol. 171, No. 2. P. 262-264. DOI 10.1007/s10517-021-05208-1*
  32. *Lobysheva N.V., S. V. Nesterov S.V., Yu. A. Skorobogatova Yu.A., Lobyshev V.I. The Functional Activity of Mitochondria in Deuterium Depleted Water // Biophysics, 2020, Vol. 65, No. 2, P. 272–276. DOI: 10.1134/S0006350920020128*
  33. *Basov A, Fedulova L, Baryshev M, Dzhimak S. Deuterium-Depleted Water Influence on the Isotope 2H/1H Regulation in Body and Individual Adaptation // Nutrients. 2019. V.11. No 8. P. 1903. doi: 10.3390/nu11081903.*
  34. *Kovacs A., Guller I., Krempels K., Somlyai I., Janosi I., Gyongyi Z., Szabo I., Ember I., Somlyai G. Deuterium depletion may delay the progression of prostate cancer // J. Cancer Therapy 2011. V.2. P. 548-556. doi: 10.4236/jct.2011.24075*
  35. *Zhang X, Gaetani M, Chernobrovkin A, Zubarev RA. Anticancer effect of deuterium depleted water—redox disbalance leads to oxidative stress. Mol Cell Proteom. 2019. V.18. No 12. P. 2373–2387. doi: 10.1074/mcp.RA119.001455*

**Сведения об авторах**

**Валентин Иванович Лобышев**

д.ф.-м.н., профессор

Физический факультет

Московский государственный университет имени М.В.

Ломоносова

Москва, Россия

**E-mail:** lobyshev@yandex.ru

**Information about authors**

**Valentin Ivanovich Lobyshev**

professor

Faculty of Physics Lomonosov Moscow State

University

Moscow, Russia

**E-mail:** lobyshev@yandex.ru

УДК 591.128.3:57.034  
ГРНТИ 34.39.43  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.92-95

С. С. Обернихин, Н. В. Яглова, Е. П. Тимохина,  
В. В. Яглов  
НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский науч-  
ный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского»

## СОДЕРЖАНИЕ ДЕЙТЕРИЯ В ВОДЕ КАК ФАКТОР, МОДУЛИРУЮЩИЙ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

*В статье обсуждается роль стабильных изотопов водорода в осуществлении процессов термогенеза и его регуляции. Представлены данные об изменениях температуры тела и параметров терморегуляции у мышей при понижении поступления в организм изотопа водорода дейтерия.*

**Ключевые слова:** терморегуляция, термогенез, изотопы, дейтерий, вода с пониженным содержанием дейтерия

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

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI «Petrovsky NRCS»

## CHANGES IN THE DEUTERIUM WATER CONTENT AS A FACTOR MODULATING HOMEOSTATIC PROCESSES

*The article discusses the role of stable hydrogen isotopes in thermogenesis and its regulation. Data on changes in body temperature and thermoregulation parameters in mice after intake of deuterium depleted water are presented.*

**Key words:** thermoregulation, thermogenesis, isotopes, deuterium, deuterium-depleted water

### Введение

Регуляцию интенсивности обменных процессов в организме можно охарактеризовать посредством такого интегративного показателя как температура тела, динамика которой определяется различными физиологическими факторами: сон/бодрствование, двигательная активность, тонус симпатической нервной системы, концентрация гормонов. Изменение температуры «ядра» организма, имеет циркадианный период и целый спектр ультрадианных ритмов. Поддержание постоянной температуры тела обеспечивается сложной многокомпонентной системой терморегуляции [1, 2]. На сегодняшний день хорошо известна роль гуморальных факторов и центральной нервной системы в поддержании температуры тела. Однако исследования показывают, что наряду с ними существуют и неизвестные факторы, контролирующие динамику температуры тела в течение суток и более коротких интервалов времени. Поскольку постоянная температура тела необходима для поддержания постоянства внутренней среды организма и является фактором устойчивости организма к внешним воздействиям, то развитие этого направления является весьма актуальным. Вода составляет более 70% организма млекопитающих и человека, следовательно, вероятность изменения функций интегрирующих систем при изменении изотопного состава потребляемой воды достаточно высока.

Известно, что понижение содержания дейтерия в организме влияет на параметры метаболизма, улучшает детоксикационную функцию и нейрохимические процессы [3, 4, 5, 6], что потенциально может влиять на регуляцию термогенеза и его интенсивность.

**Цель исследования** – изучить характеристику ультрадианных ритмов температуры тела у мышей при потреблении воды с пониженным содержанием изотопа водорода дейтерия.

### Материалы и методы

Исследование проведено на 20 самцах мышей линии C57Bl/6 массой тела 25-28 г, полученных из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные



контрольной группы получали дистиллированную воду с обычным содержанием дейтерия – 146 ppm, а мыши опытной группы получали воду с пониженным содержанием дейтерия 10 ppm (ИП Селиваненко, Россия). Содержание дейтерия в потребляемой воде определяли с помощью изотопного анализатора «T-LWIA-45-EP» («Los Gatos Research Inc.», США). Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей (Страсбург, 1986 г.). Эксперимент был одобрен биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ морфологии человека». Мышей содержали в индивидуальных клетках при комнатной температуре и естественном освещении. Доступ к воде и пище не был ограничен. Ежедневно учитывался объем потребляемой жидкости.

Температуру тела и двигательную активность и у животных измеряли с интервалом в одну минуту с помощью датчиков ДТН4-28 («ЭМБИ Ресерч», Россия), которые были имплантированы в брюшную полость за 2 нед до проведения эксперимента. Динамику температуры тела анализировали в течение 7-9 суток потребления воды с разной концентрацией дейтерия. Суммарная суточная двигательная активность определялась как сумма ежеминутных показателей датчика.

Интенсивность метаболизма животных определяли по объему потребляемого животным кислорода при температуре комфорта +25°C с помощью анализатора потребления кислорода ("ЭМБИ Ресерч", Россия), представляющего собой закрытую систему [7]. Исследование проводили в вечернее время, когда животные были активны. Каждое животное тестировали в течение 30 мин. Полученные данные нормировали на массу тела мыши.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета *Statistica 7.0* («Statsoft», США). Результаты выражали в виде медианы и интерквартильных размахов Me (Q1–Q3). Спектральную плотность ритмических изменений температуры тела определялась методом быстрого преобразования Фурье. Далее вычисляли среднюю спектральную мощность в диапазонах периодов 10–20 мин и 2–6 мин, и находили их отношение, отражающее выраженность амплитуды и частоты проявления ритмов с периодами 12–20 мин по отношению к ритмам с периодами 2–6 мин. Статистическую значимость различий показателей контрольной и опытной группы оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### Полученные результаты

Объем потребляемого кислорода, характеризующий интенсивность метаболических процессов, не отличался у животных контрольной и опытной групп. Показатели суммарной двигательной активности также не имели статистически значимых отличий и поэтому не могли вносить вклад в изменения ритмов температуры. Анализ суточной динамики температуры тела в начале эксперимента и через 7 сут потребления воды с пониженным содержанием дейтерия, также не выявил отличий между исследуемыми группами. Однако величины ежеминутных изменений температуры тела и средняя величина ежеминутного изменения у мышей, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, сократились.

Спектр динамики ежеминутных колебаний температуры тела у мышей в исследуемых группах мы оценивали с помощью метода быстрого преобразования Фурье. Потребление воды с пониженной концентрацией дейтерия вызывало снижение средней спектральной плотности колебаний температуры тела в диапазоне 2-20 мин. При этом наибольшее ее снижение наблюдалось в диапазоне 2-6 мин. Для оценки выраженности этих изменений было вычислено отношение спектральной мощности колебаний температур тела в диапазоне 10-20 мин к 2-6 мин. У мышей, получающих воду с низким содержанием дейтерия, отношение спектральной мощности ритмов резко увеличилось. Следовательно, высокочастотный диапазон ежеминутных изменений температуры тела более чувствителен к изменению содержания дейтерия в организме.

Существуют два основных механизма поддержания терморегуляции: сократительный, т.е. продукцией тепла за счёт работы мышц, и несократительный – путем усиления реакций катаболизма. Показатель первого механизма является двигательная активность, а интенсивность потребления кислорода – второго. Однако оба эти параметра не отличались от контрольных значений, что указывает на наличие иного механизма, лежащего в основе терморегуляции. Ранее нами было установлено, что кратковременный сдвиг в сторону снижения содержания дейтерия может подавлять активность щитовидной железы, изменяя гормоногенез у мышей и крыс [8, 9], что и может изменять спектр колебаний температуры ядра тела в высокочастотной области. Кроме того, известно, что в митохондриях снижено содержание оксида дейтерия в дыхательной цепи переноса электронов и цикле Кребса, которые являются основными поставщиками тепловой энергии и макроэргических молекул в клетке [1]. Следовательно, поступление в организм воды с меньшим содержанием оксида дейтерия может влиять на параметры биологического окисления. Необходимо учитывать, что колебания температуры тела в диапазоне 2-20 мин отражают баланс активности симпатического и парасимпатического звеньев вегетативной нервной системы [10], тогда их изменения можно трактовать и как перестройку регуляционных механизмов в нервной системе. Возможно, что снижение содержания дейтерия в организме также изменяет синтез гуморальных факторов, влияющих на термогенез, например, гормонов, что требует дальнейших исследований.

### Выводы

Потребление воды с пониженным содержанием дейтерия является фактором, стабилизирующим колебания температуры ядра тела. То есть понижение содержания дейтерия в организме модулирует процессы термогенеза, являющегося одним из основных показателей поддержания гомеостаза.

### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты - впервые показано, что уменьшение поступления дейтерия в организм влияет на процессы терморегуляции, не вызывая значимых сдвигов в параметрах сократительного и несократительного термогенеза, стабилизирует ритмы колебания температуры тела и делает их более устойчивыми к внешним воздействиям.

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00236 А.**

### Список литературы

1. Romanovsky A.A. *Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system* // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007. Vol. 292.P. R37–R46.
2. Tansey E., Johnson C. *Recent advances in thermoregulation* // *Adv. Physiol. Educ.* 2015. Vol. 39. N. 3. P. 139-148.
3. Луцицын А.Б., Барышев М.Г., Басов А.А., Барышева Е.В., Быков И.М., Дыдыкин А.С., Текуцкая Е.Е., Тимаков А.А., Федулова Л.В., Чернуха И.М., Джимаков С.С. *Воздействие воды со сниженным содержанием дейтерия на организм лабораторных животных при различном функциональном состоянии неспецифических защитных систем* // *Биофизика.* 2014. Т.95. №4. С. 757-765.
4. Landowne D. *Heavy water (D2O) alters the sodium channel gating current in squid giant axons.* // *Biol. Bull.* 2000. Vol. 199. P. 164-165.
5. Mladin C., Ciobica C., Lefter R., Popescu A., Bild W. *Deuterium depletion induces anxiolytic-like effects in rats* // *Arch. Biol. Sci., Belgrade.* 2014. Vol. 66. N. 2. P. 947-953.
6. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V. *Time-dependent effect of*

- deuterium depletion on tumor growth and metastasis // Russian Open Medical Journal. 2020. Vol. 9. e0210.*
7. Поликарпов И.А., Кондратюк Е.Ю., Петровский Д.В., Новиков Е.А. Межпопуляционная изменчивость эндокринно-метаболической реакции на холодовой стресс у красной полевки (*Myodesrutilus*) // Журнал общей биологии. 2016. Т. 77. № 4. С. 284-292.
  8. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П. Изменения в функционировании щитовидной железы при кратковременных сдвигах соотношения изотопов водорода // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2020. Весенняя сессия. Москва, 2021. С. 88-91.
  9. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Реакция гипофизарно-тиреоидной оси на кратковременное изменение содержания дейтерия в организме // Бюлл. экспер. биол. 2021. Т. 171. №2. С. 232-234.
  10. Braulke L.J., Heldmaier G. Torpor and ultradian rhythms require an intact signaling of the sympathetic nervous system // Cryobiology. 2010. Vol. 60, N.2. P. 198-203.

**Сведения об авторах**

**Сергей Стаинславович Обернихин**

д.м.н., старший научный сотрудник  
лаборатории развития эндокринной системы НИИ  
морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им.  
акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия  
**E-mail:** ober@mail.ru

**Наталья Валентиновна Яглова**

д.м.н., зав. лабораторией развития эндокринной системы  
НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им.  
акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия  
**E-mail:** yaglova@mail.ru

**Екатерина Петровна Тимохина**

к.б.н., научный сотрудник лаборатории развития эн-  
докринной системы  
НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им.  
акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия  
**E-mail:** rodich@mail.ru

**Валентин Васильевич Яглов**

д.м.н., г.н.с., профессор,  
главный научный сотрудник лаборатории развития  
эндокринной системы  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им.  
акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия  
**E-mail:** vyaglov@mail.ru

**Information about authors**

**Sergey Stanislavovich Obernikhin**

D.Med.Sc., Senior Researcher  
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Mor-  
phology of  
FSBSI "Petrovsky NRCS",  
Moscow Russian  
**E-mail:** ober@mail.ru

**Nataliya Valentinovna Yaglova**

Head of Laboratory  
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Mor-  
phology of  
FSBSI "Petrovsky NRCS"  
Moscow Russian  
**E-mail:** yaglova@mail.ru

**Ekaterina Petrovna Timokhina**

PhD, Research worker  
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Mor-  
phology of  
FSBSI "Petrovsky NRCS"  
Moscow Russian  
**E-mail:** rodich@mail.ru

**Valentin Vasilyevich Yaglov**

D.Med.Sc., Professor  
Principal Research Worker  
FSBSI "Petrovsky NRCS",  
Moscow Russian  
**E-mail:** vyaglov@mail.ru

УДК 577.323  
ГРНТИ 34.17.15, 31.27  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.95-101

<sup>1,2</sup>С.С. Джимаков, <sup>1</sup>М. И. Дроботенко, <sup>1,2</sup>А. А. Свидлов,  
<sup>1,2</sup>А. А. Елкина

<sup>1</sup>Кубанский государственный университет  
<sup>2</sup>ЮНЦ РАН

**ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H СОСТАВА СРЕДЫ НА ВЕРОЯТНОСТЬ  
ВОЗНИКНОВЕНИЯ РАЗРЫВОВ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПАРАМИ  
ОСНОВАНИЙ В МОЛЕКУЛЕ ДНК**

*В работе методами математического моделирования исследована роль единичных замен протия на дейтерий в образовании пузырей открытых состояний. Показано, что вероятность образования пузырей определенной длины (от 12 до 27 нуклеотидов) зависит от локализации атома дейтерия в молекуле ДНК и может существенно отличаться от вероятности возникновения открытых состояний в целом.*

**Ключевые слова:** дейтерий, изотопный обмен, математическое моделирование открытых состояний ДНК, пузырьки ДНК, водородная связь.

S. S. Dzhimak, M. I Drobotenko, A. A. Svidlov, A. A. Elkina  
Kuban State University  
SSC RAS

## **INFLUENCE OF THE $^2\text{H}/^1\text{H}$ ISOTOPE COMPOSITION OF A MEDIUM ON THE PROBABILITY OF BROKENING OF HYDROGEN BONDS BETWEEN BASE PAIRS IN A DNA MOLECULE**

*In this work, the role of single substitutions of protium for deuterium in the formation of bubbles of open states is studied by mathematical modeling methods. It is shown that the probability of formation of bubbles of a certain length (from 12 to 27 nucleotides) depends on the localization of the deuterium atom in the DNA molecule and may differ significantly from the probability of open states in general.*

**Keywords:** deuterium, isotope exchange, mathematical modeling of DNA open states, DNA bubbles, hydrogen bond.

### **Введение**

Несмотря на достаточную прочность структуры двойной спирали ДНК, в ней может происходить расплетение сахарофосфатных цепочек. В молекулярной и клеточной биологии гибридизация и дегибридизация ДНК являются фундаментальными процессами. В физиологическом диапазоне температур самопроизвольное возникновение открытых состояний (разрывов водородных связей между парами азотистых оснований), а также пузырей (областей с несколькими открытыми состояниями подряд) происходит редко. В основном эти процессы инициируют специализированные ферменты в момент, когда генетический код доступен для молекулярных механизмов считывания информации. Возникновение открытых состояний и пузырей происходит во время транскрипции, репликации, рекомбинации, восстановления или связывания любого фермента на отдельных цепях. Например, РНК-полимеразы «читают» одноцепочечную ДНК, и для инициации транскрипции требуется образование так называемого транскрипционного пузыря в начальном участке транскрипции [1].

Известно, что изменение содержания дейтерия в живых системах оказывает влияние на метаболические процессы в них [2, 3]. Это касается как повышенных [4], так и пониженных концентраций дейтерия относительно природного уровня [5–7].

С учетом вышесказанного, попадание атома дейтерия в водородные связи между парами азотистых оснований ДНК может оказывать влияние на термодинамические характеристики как в месте его локализации, так и на отдаленных участках. Провести оценку этих изменений можно только с помощью математического моделирования. Так, ранее нами было показано, что атомы дейтерия, попадая в водородные связи между парами азотистых оснований молекулы ДНК, могут оказывать влияние на вероятности возникновения открытых состояний [8, 9]. Кроме того, в [10] показано, что вероятность возникновения открытых состояний (ОС) зависит как от концентрации дейтерия в окружающей молекулу жидкой среде, так и от критической энергии разрыва водородных связей. Поскольку возникновение пузырьков денатурации в молекуле ДНК имеет ключевое значение для считывания генетической информации, необходимо проведение исследований влияния атомов дейтерия в водородных связях между парами азотистых оснований на этот процесс.

### Цель работы

Целью работы являлось исследование влияния единичных замен протия на дейтерий в молекуле ДНК на вероятность возникновения пузырьков денатурации.

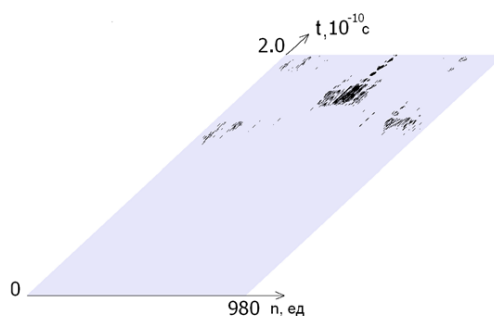
### Материалы и методы

В представленной работе в рамках механической модели Л.В. Якушевич проведены оценочные эксперименты по влиянию изотопного  $^2H/^1H$  обмена на процессы раскрытия пар оснований.

Для моделирования процессов образования открытых состояний и пузырей в двойной спирали ДНК будем использовать математическую модель, описывающую вращательное движение азотистых оснований вокруг сахаро-фосфатной цепочки молекулы ДНК [11]. При построении такой модели используется аналогия между молекулой ДНК и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников: азотистые основания соответствуют вращающимся маятникам, сахарофосфатные цепочки молекулы ДНК – упругой нити, к которой прикреплены эти маятники, а водородной связи пары комплементарных азотистых оснований эквивалентна упругая связь соответствующих маятников. Поведение такой механической системы, состоящей из  $n$  пар маятников, описывается задачей Коши для системы  $2n$  обыкновенных дифференциальных уравнений [1, 9]. Исследование влияния  $^2H/^1H$  обмена на образование и динамику ОС будем проводить на примере гена, кодирующего интерферон *alpha 17*. Для этого гена  $n = 980$ .

### Полученные результаты

На рисунке 1 в качестве примера приведена картина возникновения и исчезновения открытых состояний в гене, кодирующем интерферон альфа 17 при  $E_{кр}^H = 270 \times 10^{-25}$  Н·м при отсутствии атомов дейтерия. Участки открытых состояний выделены черным цветом.



**Рисунок 1. Динамика открытых состояний в гене, кодирующем интерферон альфа 17 при  $E_{кр}^H = 270 \times 10^{-25}$  Н·м.**

На рисунках 2–4 для различных значений критической энергии  $E_{кр}^H$  приведены графики зависимости от  $l$  вероятности  $p_l$  возникновения пузырей длиной не меньше  $l$ . Жирной линией изображены графики для молекулы, содержащей только водородные связи, тонкими линиями – для молекул с единичной заменой водородной связи на дейтериевую. Цифрой 1 выделены графики, соответствующие локализации атома дейтерия в 2-й паре оснований, цифрой 2 – в 353-й, цифрой 3 – в 376-й паре оснований молекулы ДНК.

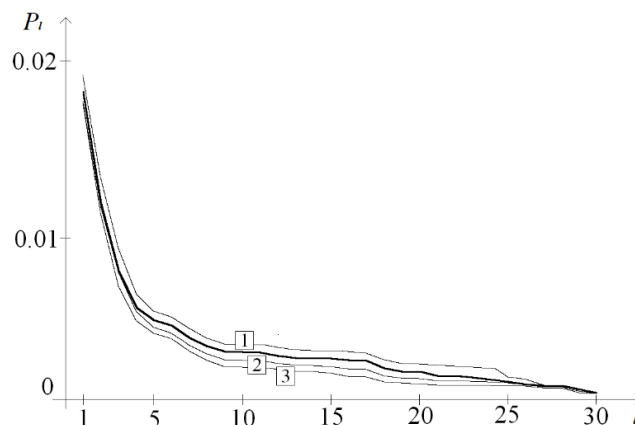


Рисунок 2. Графики зависимости от  $l$  вероятности  $P_l$  возникновения пузырей длиной не меньше  $l$  для  $E_{кр}^H = 270 \times 10^{-25} \text{Н}\cdot\text{м}$ .

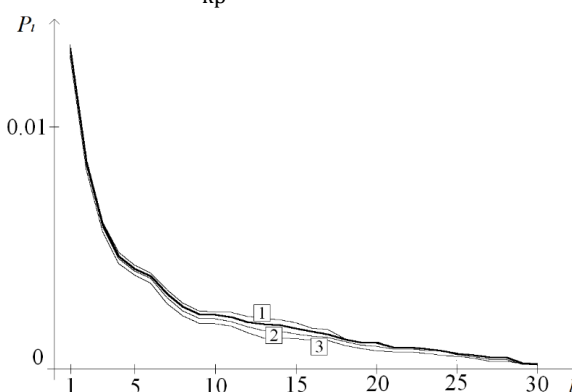


Рисунок 3. Графики зависимости от  $l$  вероятности  $P_l$  возникновения пузырей длиной не меньше  $l$  для  $E_{кр}^H = 280 \times 10^{-25} \text{Н}\cdot\text{м}$ .

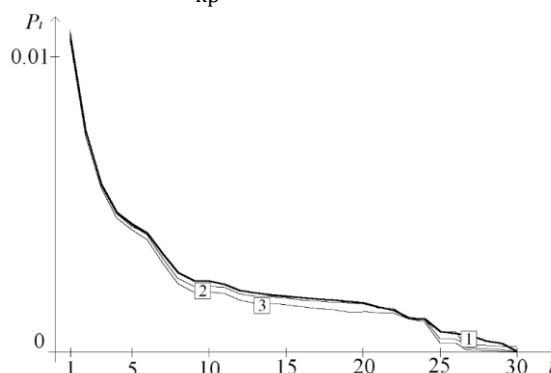


Рисунок 4. Графики зависимости от  $l$  вероятности  $P_l$  возникновения пузырей длиной не меньше  $l$  для  $E_{кр}^H = 290 \times 10^{-25} \text{Н}\cdot\text{м}$ .

В таблице 1 для различных  $E_{кр}^H$  приведены значения  $P_0$  – вероятностей образования открытых состояний при отсутствии дейтериевых связей в молекуле ДНК и  $P_i$  – вероятностей образования открытых состояний при локализации атома дейтерия в  $i$ -й паре оснований.

$E_{кр} \cdot 10^{-25} \text{Н}\cdot\text{м}$	$P_0$	$P_{020}$	$P_{353}$	$P_{376}$
270	0,0173477	0,0178338	0,0168469	0,0170676
280	0,0132254	0,0132540	0,0131500	0,0130869
290	0,0106987	0,0108056	0,0107960	0,0106176

Таблица 1. Значения вероятностей образования открытых состояний при различных  $E_{кр}^H$

В таблице 2 для различных энергий разрыва водородной связи между парами азотистых оснований приведены вероятности образования пузырей различной длины при наличии и отсутствии атома дейтерия в водородных связях. Через  $P_0$  обозначена вероятность возникновения пузыря заданной длины в отсутствии атомов дейтерия, через  $P_i$

– вероятность образования пузыря заданной длины при локализации атома дейтерия в  $i$ -й паре оснований.

$E_{кр} \cdot 10^{-25}$ Н·м	Длина пузыря	$P_0$	$i$	$P_i$	$P_0/P_i$
270	21	0,0002338	20	0,0001488	1,571
	15	0,0000446	353	0,0000685	0,651
	16	0,0000951	376	0,0001476	0,644
280	12	0,0002017	20	0,0001954	1,032
	13	0,0000812	353	0,0001565	0,519
	15	0,0001369	376	0,0000937	1,461
290	24	0,0000079	20	0,0000276	0,286
	17	0,0000426	353	0,0000267	1,595
	27	0,0000702	376	0,0002460	0,284

**Таблица 2. Вероятности образования пузырей при различной локализации атома дейтерия для разных энергий разрыва водородной связи**

Влияние  $^2H/^1H$  обмена на вероятность образования зон открытых состояний характеризуется величиной  $P_0/P_i$ . В таблицах 2 и 3 видно, например, что при  $E_{кр} = 270 \times 10^{-25}$  Н·м величина  $P_0/P_{376} = 1,016$  для вероятности возникновения открытых состояний и  $P_0/P_{376} = 0,644$  для вероятности возникновения пузырей длины 16, т.е. локализация атома дейтерия в 376-й паре оснований приводит к уменьшению вероятности возникновения открытых состояний и к увеличению вероятности возникновения пузырей длины 16. При том же значении  $E_{кр}$  локализация атома дейтерия в 20-й паре оснований приводит к увеличению вероятности возникновения открытых состояний ( $P_0/P_{20} = 0,973$ ) и к уменьшению вероятности возникновения пузырей длины 21 ( $P_0/P_{20} = 1,571$ ).

### **Выводы**

Таким образом,  $^2H/^1H$  обмен в парах азотистых оснований по-разному влияет образование зон открытых состояний, причем это влияние на образование пузырей определенной длины более значительное, чем на образование открытых состояний в целом.

### **Заключение**

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

Проведенный анализ полученных результатов позволяет сделать еще несколько важных выводов, в том числе о селективной чувствительности и специфичной молекулярной динамике ДНК при единичной  $^2H/^1H$  замене в разных участках ее молекулы в условиях определенного по интенсивности внешнего воздействия, например образование открытых состояний было более выражено при  $E_{кр} = 270 \times 10^{-25}$  Н·м, тогда как образование пузырей длиной от 17 до 27 нуклеотидов более часто наблюдалось при  $E_{кр} = 290 \times 10^{-25}$  Н·м.

Последнее также указывает на способность единичной замены протия на дейтерий в определенных (критических) участках ДНК вызывать за счет изменения скорости разрывов водородных связей между отдельными парами азотистых оснований ускорение или замедление считывания генетической информации. Кроме того,  $^2H/^1H$  замены, в зависимости от внешних условий могут снижать или повышать скорость транскрипции путем модификации пространственной напряженности двуспиральной молекулы ДНК при уменьшении или увеличении (последнее в данном случае 1,26 раза чаще) частоты раскрытия денатурационных пузырей. Все это может приводить к существенному изменению сродства промоторных областей молекулы ДНК (прежде всего термодинамических показателей в точках связывания) к конкретным энзимам. Например, на стадии инициации при взаимодействии промотора с ДНК-зависимой РНК-полимеразой и другими белковыми транскрипционными факторами, а также при изменении скорости взаимодействия ДНК и ферментов системы её репарации, что может, к примеру, при замедлении их взаимодействия, повышать вероятность возникновения мутаций в

организме.

**Работа выполнена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда (проект Н-21.1/11) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-2366.2022.1.4)**

**Список литературы**

1. Grinevich A.A., Yakushevich L.V. *The influence of the DNA torque on the dynamics of transcription bubbles in plasmid PTTQ18 // J. Theor. Biol.* 2018. No. 453. P. 68-77.
2. Kravtsov A., Kozin S., Basov A., Baryshev M., Elkina A., Dzhimak S., Malyshko V., Butina E., Moiseev A. *Reduction of deuterium level supports resistance of neurons to glucose deprivation and hypoxia: study in cultures of neurons and on animals // Molecules.* 2022. No. 27 (1). P. 243.
3. Basov A., Fedulova L., Vasilevskaya E., Dzhimak S. *Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during 2H/1H isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes // Molecules.* 2019. No. 24 (22). P. 4101.
4. Лобышев В.Н., Калининченко Л.П. *Изотопные эффекты D2O в биологических системах.* - М.: Наука, 1978.
5. Басов А.А., Козин С.В., Быков И.М., Попов К.А., Моисеев А.В., Елкина А.А., Джимаков С.С. *Изменение показателей прооксидантно-антиоксидантной системы в крови и головном мозге крыс в условиях моделирования острой гипоксии при потреблении питьевого рациона, обедненного дейтерием // Известия Российской академии наук. Серия биологическая.* 2019. № 6. С. 572-576.
6. Kozin S., Kravtsov A., Baryshev M., Elkina A., Dzhimak S., Malyshko V., Skrebitsky V., Kondratenko R., Butina E., Moiseev A. *Electrophysiological activity and survival rate of rats nervous tissue cells depends on D/H isotopic composition of medium // Molecules.* 2021. No. 26 (7). P. 2036.
7. Zhang X., Gaetani M., Chernobrovkin A., Zubarev R.A. *Anticancer effect of deuterium depleted water - Redox disbalance leads to oxidative stress // Molec. Cel. Proteom.* 2019. No. 18 (12). P. 2373.
8. Basov A., Drobotenko M., Svidlov A., E Gerasimenko., 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. No. 25 (16). P. 3753.
9. Дроботенко М.И., Джимаков С.С., Свидлов А.А., Басов А.А., Лясота О.М., Барышев М.Г. *Математическая модель двухцепочечной молекулы ДНК с учетом открытых состояний // Биофизика.* 2018. Т. 63. № 2. С. 258-264.
10. Джимаков С.С., Барышев М.Г., Лясота О.М., Федуллова Л.В., Свидлов А.А., Басов А.А., Дроботенко М.И. *Математическое моделирование возникновения открытых состояний в молекуле ДНК в зависимости от концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде при разных значениях энергии разрыва водородной связи // Доклады Академии наук.* 2018. Т. 483. № 5. С. 564-566.
11. Grinevich A.A., Yakushevich L.V. *О моделировании движения транскрипционного пузыря под действием постоянного торсионного момента// Биофизика.* 2016. Т. 61. № 4. С. 638-646.

**Сведения об авторах**

**Джимаков Степан Сергеевич**  
 к.б.н., доцент  
 Кубанский государственный университет  
 ЮНЦ РАН  
 Россия  
**E-mail:** jimack@mail.ru

**Information about authors**

**Stepan Sergeevich Dzhimak**  
 PhD  
 Kuban State University  
 SSC RAS  
 Russian  
**E-mail:** jimack@mail.ru



**Дроботенко Михаил Иванович**  
к.ф.-м.н., старший научный сотрудник  
Кубанский государственный университет  
Россия  
**E-mail:** mdrobotenko@mail.ru

**Свидлов Александр Анатольевич**  
к.ф.-м.н., научный сотрудник  
Кубанский государственный университет  
ЮНЦ РАН  
Россия  
**E-mail:** svidlov@mail.ru

**Елкина Анна Анатольевна**  
к.ф.-м.н., старший научный сотрудник  
Кубанский государственный университет  
Россия  
ЮНЦ РАН  
**E-mail:** svidlov@mail.ru

**Mikhail Ivanovich Drobotenko,**  
Kuban State University  
PhD  
Russian  
**E-mail:** mdrobotenko@mail.ru

**Alexander Anatolievich Svidlo,**  
Kuban State University  
PhD  
SSC RAS  
Russian  
**E-mail:** svidlov@mail.ru

**Anna Anatolievna Elkina**  
Kuban State University  
PhD  
SSC RAS  
Russian  
**E-mail:** svidlov@mail.ru

УДК 577.344:611.441  
ГРНТИ 34.17.15, 34.17.53  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.101-104

**Е. П. Тимохина, С. С. Обернихин, Н. В. Яглова,**  
НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский науч-  
ный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского»

## **РЕАКТИВНЫЕ И КОМПЕНСАТОРНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ГИПОФИЗАРНО-ТИРЕОИДНОЙ ОСИ ПРИ ПОНИЖЕНИИ ПОСТУПЛЕНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМ**

*В статье приведены результаты исследования реактивных и компенсаторных изменений гормоногенеза в гипофизарно-тиреоидной оси в ответ на уменьшение поступления дейтерия в организм, показавшие, что они связаны с изменением активности периферического, а не центрального звена оси.*

**Ключевые слова:** щитовидная железа, дейтерий, тиреоидные гормоны, вода с пониженным содержанием дейтерия

**E. P. Timokhina, S. S. Obernihina, N. V. Yaglova,**  
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI «Petrovsky NRCS»

## **REACTIVE AND COMPENSATORY CHANGES IN PITUITARY-THYROID AXIS INDUCED BY REDUCED INTAKE OF DEUTERIUM**

*The paper represents the results of the investigation aimed at elucidation of reactive and compensatory changes in pituitary-thyroid axis induced by reduced intake of deuterium, which indicate that both types of changes were developed in peripheral part of the axis.*

**Key words:** thyroid gland, deuterium, thyroid hormones, deuterium-depleted water

### **Введение**

Способность изменения содержания стабильных изотопов биогенных атомов в организме изменять параметры функционирования гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси мало изучена и представляет значительный интерес для физиологии и биохимии. Одним из наиболее распространенных в организме стабильных изотопов является дейтерий [1]. В наших предыдущих исследованиях мы установили, что щитовидная железа чувствительна к изменению содержания стабильных изотопов дейтерия [2]. Остается непонятным, насколько долго наблюдаются изменения в функционировании гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси и развиваются ли в оси компенсаторные процессы, направленные на восстановление эутиреоза.

**Цель исследования** – выявить характер реактивных и компенсаторных изменений гормоногенеза в гипофизарно-тиреоидной оси на уменьшение поступления дейтерия в организм.

### Материалы и методы

Эксперимент выполнен на половозрелых самцах крыс Вистар, которые потребляли в течение 3х суток воду с  $[D] = 10$  ppm (ИП Селиваненко, Россия). Контрольная группа потребляла дистиллированную воду с нормальным содержанием дейтерия 146 ppm.

Животных выводили из эксперимента через 1 и 3 суток передозировкой золетила. В сыворотке крови крыс определяли концентрации общего и свободного тироксина (Т4 и сТ4), общего и свободного трийодтиронина (Т3 и сТ3), тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ) методом иммуноферментного анализа («BioVendor», «Monobind», США). Проводили учет выпитой воды и расчет объема циркулирующей плазмы по формулам [3]. Объем суточного потребления воды в контрольной и опытной группах не отличался и превышал объем циркулирующей плазмы, что обеспечивало изменение содержания дейтерия во внутренней среде организма.

Статистическую обработку данных производили с помощью программы *Statistica 7.0* («Statsoft Inc.», США). Проводили оценку нормальности распределения и вычисляли средние значения. Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Статистически значимыми различия считались при  $p < 0,05$ .

### Полученные результаты

Через сутки у крыс, потреблявших воду с низким содержанием дейтерия, выявлены повышение уровня Т4 и уменьшение его свободной формы, а также значительное снижение концентрации ТТГ в сыворотке крови (рис. 1).

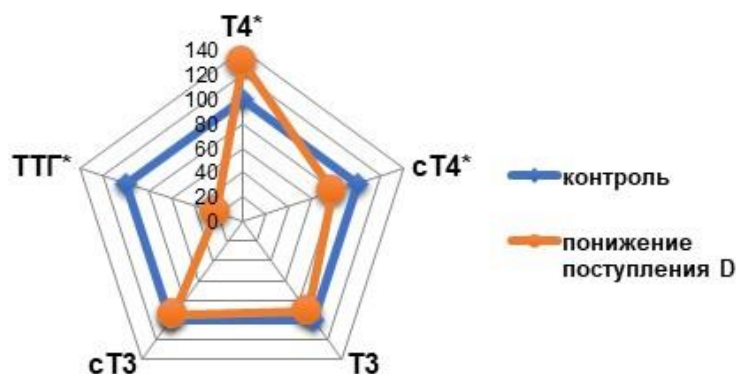


Рис. 1. Изменения функциональных показателей гипофизарно-тиреоидной оси вследствие уменьшения поступления дейтерия в организм через 1 сутки после начала эксперимента.

Примечания: значения контрольной группы приняты за 100%, \* – статистически значимые отличия от контрольной группы.

Через трое суток у крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, выявлено развитие изменений, заключающихся в снижении продукции основного гормона щитовидной железы Т4 до контрольных значений. Уровень свободных фракций Т4 и Т3 был выше контрольных значений. Концентрация ТТГ в сыворотке крови повысилась и достигла значений контрольной группы.

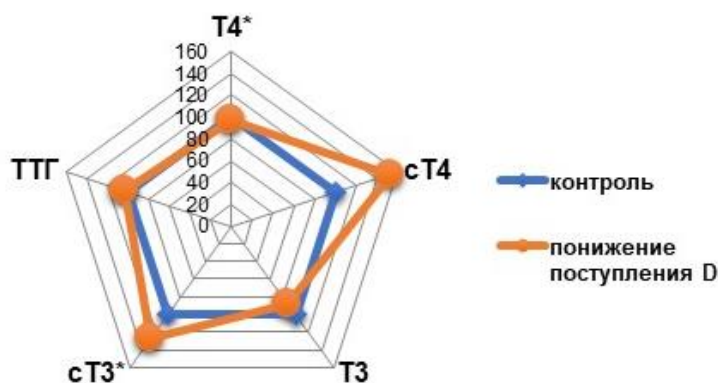


Рис. 2. Изменения функциональных показателей гипофизарно-тиреоидной оси вследствие уменьшения поступления дейтерия в организм через 3 суток после начала эксперимента.

Примечания: значения контрольной группы приняты за 100%, \* – статистически значимые отличия от контрольной группы.

Полученные результаты показывают, что при понижении поступления дейтерия в организм первой в гипофизарно-тиреоидной оси реагирует щитовидная железа, что подразумевает наличие некоего “сensors содержания дейтерия” у фолликулярных тироцитов. Реакция железы заключается в повышении продукции гормонов. Гипофиз в свою очередь реагирует на повышение активности щитовидной железы снижением секреции ТТГ, что свидетельствует о нечувствительности центрального звена оси к изменению содержания дейтерия в организме. На третьи сутки мы наблюдали понижение активности щитовидной железы, сопровождаемое снижением связывания гормонов в кровотоке транспортными белками. Это приводило к повышению продукции ТТГ, то есть в происходящих в гипофизарно-тиреоидной оси компенсаторных изменениях ведущая роль принадлежала именно щитовидной железе. Вполне вероятно, что нормализация продукции основных тиреоидных гормонов являлась следствием истощения запасов макроэргов, поскольку синтез тиреоидных гормонов включает в себя синтез молекулы макромолекулы белка тироглобулина и его йодирование, что требует высокой активности окислительно-восстановительных процессов и затрат энергии. Имеются данные, что изменение концентрации дейтерия *in vitro* не оказывает влияния на продукцию супероксид-аниона комплексами I, II и III дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов, но уменьшает эффективность фосфорилирования [4], что может снижать запасы АТФ в клетках.

### Выводы

При понижении поступления дейтерия в организм отмечается усиление функциональной активности гипофизарно-тиреоидной оси за счет активации гормоногенеза в ее периферическом звене – щитовидной железе. На третьи сутки снижения содержания дейтерия в гипофизарно-тиреоидной оси развиваются компенсаторные изменения, направленные на восстановление эутиреоза. Эти изменения инициируются самой щитовидной железой, а изменения уровня ТТГ гипофиза свидетельствуют лишь о сохранении пассивной роли гипофиза в регуляции секреторных процессов, и нечувствительности гипоталамо-гипофизарного комплекса к понижению содержания дейтерия в организме.

### Заключение:

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: развитие реактивных, а затем компенсаторных изменений в гипофизарно-тиреоидной оси на понижение поступления дейтерия в организм связаны с изменением активности ее периферического, а не центрального звена.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00236 А.*

**Список литературы**

1. 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. No. 2(1). P. 1-7.*
2. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Реакция гипофизарно-тиреоидной оси на кратковременное изменение содержания дейтерия в организме // *Бюлл. экспер. биол. 2021. Т. 171. №2. С. 232-234.*
3. *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals: Eighth Edition. R. Hubrecht and J. Kirkwood Eds. The Universities Federation for Animal Welfare. – 2010.*
4. Лобышева Н.В., Нестеров С.В., Скоробогатова Ю.А., Лобышев В.И. Функциональная активность митохондрий в водной среде с уменьшенным содержанием дейтерия// *Биофизика. 2020. Т.65. №2. С.315-319.*

**Сведения об авторах**

**Екатерина Петровна Тимохина**

к.б.н., научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им.  
акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

**E-mail:** rodich@mail.ru

**Сергей Стаинславович Обернихин**

д.м.н., старший научный сотрудник  
лаборатории развития эндокринной системы НИИ  
морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им.  
акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

**E-mail:** ober@mail.ru

**Наталья Валентиновна Яглова**

д.м.н., зав. лабораторией развития эндокринной системы

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им.  
акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

**E-mail:** yaglova@mail.ru

**Information about authors**

**Ekaterina Petrovna Timokhina**

PhD, Research worker

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of  
FSBSI “Petrovsky NRCS”  
Moscow Russian

**E-mail:** rodich@mail.ru

**Sergey Stanislavovich Obernihkin**

D.Med.Sc., Senior Researcher

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of  
FSBSI “Petrovsky NRCS”,  
Moscow Russian

**E-mail:** ober@mail.ru

**Nataliya Valentinovna Yaglova**

Head of Laboratory

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of  
FSBSI “Petrovsky NRCS”  
Moscow Russian

**E-mail:** yaglova@mail.ru

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК

*В статье проанализирована связь полиморфизма ряда генов с некоторыми особенностями колоректального рака, такими как агрессивность его течения и развития заболевания, эффективностью проведения предоперационной химио-лучевой терапии. Полученные данные могут использоваться для определения индивидуальной тактики лечения пациентов.*

**Ключевые слова:** полиморфизм генов, колоректальный рак, химио-лучевая терапия, лучевой патоморфоз

A. I. Sudakov, E. P. Kulikov, S. A. Mertsalov, A. A. Nikiforov,  
V. A. Grigorenko  
Ryazan State Medical University

## GENETIC POLYMORPHISM AND COLORECTAL CANCER

*The article analyzes the relationship of polymorphism of a number of genes with some features of colorectal cancer, such as the aggressiveness of its course and development of the disease, the effectiveness of preoperative chemoradiotherapy. The data obtained can be used to determine individual tactics for treating patients.*

**Keywords:** gene polymorphism, colorectal cancer, chemoradiotherapy, radiation pathomorphosis.

### Введение

Колоректальный рак (КРР, включающий опухоли, локализующиеся в слепой, поперечно-ободочной, сигмовидной и прямой кишках), является одной ведущих онкопатологий, занимающей 3 место по распространённости в России и в мире в целом. Число ежегодно выявляемых случаев этого рака в РФ приближается к 70 тысячам, всего на диспансерном учёте состоит более 350 тысяч человек [1, с.14; 2 с. 3].

Известно, что возникновение опухолевой патологии во многом ассоциировано с генетической предрасположенностью, которая может обуславливать повышенную чувствительность к канцерогенным веществам, кодирует различные клеточные функции, такие как пролиферация, неоангиогенез, апоптоз, влияет на эффективность работы защитной системы репарации ДНК и иммунитета [3, с. 46].

Современная онкология уже давно опирается на результаты молекулярно-генетических и иммуно-гистохимических исследований при определении оптимальной тактики лечения и персонализированном подходе к терапии пациента. Однако, несмотря на современные достижения молекулярной онкологии, расширение знаний о природе опухоли и мишенях воздействия на неё, остаётся большое число «белых» пятен в определении агрессивности течения заболевания, вопросах в подборе персонализированной терапии у данной категории пациентов [4, с. 68; 5, с. 1].

Также, всё большую актуальность для лечения рака прямой кишки приобретает проведение неoadъювантной химио-лучевой терапии (ХЛТ), задачами которой являются девитализация злокачественных клеток, а также уменьшение размеров опухоли с целью выполнения сфинктеросохранной операции [6, с. 9; 7, с. 129]. Однако, желаемый эффект зачастую не достигается в полной мере. Возможно, что ключом к решению этой и других проблем является исследование генома человека, позволяющего в том числе на основе однонуклеотидного полиморфизма некоторых генов выявить индивидуальную предрасположенность к развитию онкопатологии, чувствительность к различным схемам лечения, а также развитию побочных токсических эффектов [8, с. 2].

**Целью** нашей работы являлась оценка влияния полиморфизма некоторых генов на развитие и течение колоректального рака, а также поиск предикторов индивидуальной чувствительности пациентов с раком прямой кишки к проведению неоадьювантной химио-лучевой терапии.

### Материалы и методы

Нами была подобрана генетическая панель полиморфных генов, которые по данным различных авторов могли играть роль в развитии и течении колоректального рака, а их углубленный анализ мог бы служить для улучшения результатов лечения пациентов [9, с. 1; 10, с. 129; 11, с. 1].

Были отобраны следующие варианты генов: *MTHFR (Ala222Val)*, *XPD (Lis751Gln)*, *XRCC1 (Arg194Trp)*, *XRCC1 (Arg399Gln)*, *XRCC1 (Arg208His)*, *APE1 (Asp148Glu)*, *hOGG1 (ser326Ces)*, *P53 (Pro47Ser)*, *VEGF (C654G)*, *EGFR(A2073T)*, *TNF(G308A)*, *CHEK2 (Ile157Thr)*, *MMP1 (1607 1G/2G)*, *TIMP1(C53CT)*.

Генотипирование выполнялось на базе ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России методом выделения ДНК из лейкоцитов венозной крови обследуемых: кровь в объеме не менее 1 мл собиралась в одноразовую пластиковую пробирку с раствором антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта). В дальнейшем материал доставлялся в лабораторию в течение 2-х часов, где производилась его обработка. В последующем, амплификация материала осуществлялась с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), а полученный результат фиксировался методом электрофоретической детекции "SNP-ЭКСПРЕСС" (производство - НПФ "Литех", Россия) в 3% агарозном геле.

Результатом данного метода генотипирования являлось заключение о наличии у пациента гомозиготного состояния по доминантному или рецессивному аллелю гена, или гетерозиготное носительство.

С учётом многозадачности исследования, в которое были включены 178 пациентов, из которых у 110 имелся верифицированный диагноз аденокарциномы толстой кишки и 68 здоровых добровольцев, нами было сформировано большое количество сравниваемых групп по гендерным, возрастным различиям, стадии опухолевого процесса согласно Международной классификации *TNM* (8-ой редакции, 2017 год), эффективности ХЛТ, которая оценивалась по лучевому патоморфозу согласно классификации *TRG* по *Mandard*.

Большая часть онкобольных имела рак прямой кишки (РПК) – 82 пациент (73,6%), в то время как рак ободочной кишки (РОК) имелся у 28 пациентов (26,4%). I стадия онкологического процесса была у 15 пациентов (13,6%), II стадия наблюдалась у 29 человек (26,4%), III стадия - у 40 пациентов (36,4%), IV стадия - 26 больных (23,6%). Средний возраст пациентов составлял 59,3 года, при этом была оценена частота манифестация рака среди различных возрастных групп (40-50 лет, 50-60 лет и т.д.). Женщины в исследовании составляли 44% от обследованных, лица мужского пола – 56% соответственно.

45 пациентам с раком прямой кишки был проведён курс предоперационной конформной дистанционной ХЛТ (на линейном ускорителе *Elekta Synergy*, 6 МэВ, 3-*DCRT*) в классическом режиме фракционирования (РОД=1,9-2,0 Гр) до суммарной дозы 50,2±2,6 Гр на зону первичной опухоли и 44±1,8 Гр на регионарные лимфоузлы с радиомодификаторами фторпиримидинового ряда согласно рекомендованным схемам лечения [12, с. 162]. Ведущим критерием в оценке индивидуального ответа на проведённое лечение являлась степень лечебного патоморфоза (ЛП) в опухоли, определяемая на основе послеоперационного материала. Среднее время между оперативным лечением и окончанием ХЛТ составляло 8-10 недель. Внутри этой группы сравнения наблюдались 21 пациент (Группа 1) с выраженным эффектом (лечебный патоморфоз *TRG* 1-3 степени по *Mandard*) и 24 человека (Группа 2) со слабым эффектом химиолучевой терапии - патоморфоз 4-5 степени по *TRG*.

По каждому из генов было оценено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга. В двух соответственно независимых группах использовался критерий  $\chi^2$  по Пирсону, при количестве ожидаемых явлений от 5 до 9 - с поправкой Йетса или точного критерия Фишера при значениях менее 5. Также проводилась оценка отношения шансов (ОШ) и его 95%-го доверительного интервала (ДИ). При анализе статистически значимыми считались различия при  $p < 0.05$ .

### Результаты

В связи с большим количеством полученных результатов, мы приведём только основные, наиболее значимые выявленные закономерности.

Носительство рецессивного Gln-аллеля в гетерозиготном состоянии генотипа гена *XRCC1 (Arg/Gln)* было ассоциировано с повышенным шансом развития рака прямой кишки I-III стадии ( $\chi^2=9.333$ ,  $p=0.003$ , ОШ=2.977 (95%ДИ: 1.465-6.050)).

В отношении гена *CHEK2 (Ile157Thr)* было выявлено, что носительство гетерозиготного генотипа ассоциировано с *KPP* у женщин ( $\chi^2=4.595$ ,  $p=0.033$ , ОШ=3.706 (95%ДИ: 1.216-11.290)) и IV стадией опухолевого процесса ( $\chi^2=6.801$ ,  $p=0.010$ , ОШ=5.600 (95%ДИ: 1.630- 19.237)).

Анализ в отношении гена *P53 (Pro47Ser)* выявил, что носительство доминантной аллели повышало шанс развития *KPP* у лиц мужского пола в 7 раз ( $\chi^2=23.327$ ,  $p < 0.001$ , ОШ=7.000 (95%ДИ: 2.982-16.430)), в возрастной группе 60-69 лет в 8,3 раза ( $\chi^2=18.107$ ,  $p < 0.001$ , ОШ=8.307 (95%ДИ: 2.939-23.481)), в возрастной группе пациентов 70 лет и старше в 3,1 раза ( $\chi^2=3.993$ ,  $p=0.046$ , ОШ=3.101 (95%ДИ: 0.994-9.677)). Также данный аллель был ассоциирован с повышенным в 1,9 раз шансом локализации опухоли в прямой кишке ( $\chi^2=4.512$ ,  $p=0.034$ , ОШ=1.927 (95%ДИ: 1.045-3.553)), I-III стадией рака прямой кишки ( $\chi^2=4.124$ ,  $p=0.043$ , ОШ=1.948 (95%ДИ: 1.016-3.733)).

Анализ в отношении гена *TNF (G308A)* выявил ассоциацию рецессивного аллеля с *KPP* у мужчин ( $\chi^2=4.287$ ,  $p=0.039$ , ОШ=3.511 (95%ДИ: 1.004-12.270)) и женщин ( $\chi^2=14.776$ ,  $p < 0.001$ , ОШ=5.516 (95%ДИ: 2.149-14.162)), причем, у первых он увеличивал шанс развития патологии в 3,5 раза, а у вторых в 5,5 раз. Также была выявлена аналогичная ассоциация с возрастом манифестации 50-59 лет ( $\chi^2=10.470$ ,  $p=0.002$ , ОШ=15.500 (95%ДИ: 1.937-124.048)), 60-69 лет ( $\chi^2=4.853$ ,  $p=0.028$ , ОШ=2.877 (95%ДИ: 1.091-7.585)). В отношении I-III стадии процесса носительство рецессивной аллели увеличивало шанс развития опухолевого процесса в 2,3 раза ( $\chi^2=4.536$ ,  $p=0.034$ , ОШ=2.397 (95%ДИ: 1.054-5.454)).

Полиморфные варианты гена *MMP1 (1607 1G/2G)* показали ассоциацию с женским полом, где носительство рецессивной аллели в составе гомозиготного рецессивного генотипа увеличивало шанс развития *KPP* в 2,5 раза ( $\chi^2=9.704$ ,  $p=0.002$ , ОШ=2.528 (95%ДИ: 1.402-4.557)), с возрастом манифестации 60-69 лет, где носительство рецессивной аллели увеличивало шанс развития опухоли в 2,2 раза ( $\chi^2=6.215$ ,  $p=0.013$ , ОШ=2.252 (95%ДИ: 1.184-4.282)), с раком прямой кишки I-III стадии, где носительство этой аллели повышало шанс развития опухоли этих стадий в 1,9 раза ( $\chi^2=7.389$ ,  $p=0.007$ , ОШ=1.963 (95%ДИ: 1.204-3.201)).

Несмотря на небольшую долю пациентов с IV стадией заболевания, включённых в исследование, у 8 из 10 больных этой группы отмечено наличие полиморфизма G/G в гене *VEGF (C654G)*. Данный мутантный гомозиготный вариант встречался значительно реже у пациентов с I (37,5%), II (40%) или III стадией (37,5%) ( $p=0,0147$ , ОШ=5,42 [1,21; 24,32]).

Таким образом, на основании полученных данных, мы можем оценить вероятности возникновения опухолей толстой кишки в определённых возрастных и гендерных группах, что может помочь улучшить имеющиеся скрининговые программы ранней диагностики рака.

При анализе влияния генетического полиморфизма на индивидуальную чувствительность к проведению неоадьювантной ХЛТ наиболее значимые данные при сравнении групп 1 и 2 были получены для вариантов полиморфизма генов *XPD (Lis751Gln)* и

*MMP1* (1607 1G/2G). Так, в группе 1 достоверно чаще встречался полиморфизм *Lis/Lis XPD*. Данный тип встречался у 9 (43%) пациентов против 3 (12,5%) группы 2 соответственно ( $\chi^2=3,84$ ,  $p=0,05$ ). При этом данный полиморфизм также показал прогностическую значимость (в данном случае благоприятную по степени ЛП) в отношении RR [95% ДИ] = 2,06 [1,18; 3,6].

Однако, в целом при оценке общей частоты встречаемости аллелей *Lis* и *Gln* в исследуемой группе подобных различий достоверно не выявлено ( $p>0,05$ ). Чувствительность (*Se*) и специфичность (*Sp*) данного полиморфизма как предиктора прогноза лечебного патоморфоза для аденокарциномы прямой кишки составили - 42,9% и 87,5% соответственно.

Носительство генотипа *MMP1* (1607 2G/2G) также показало положительное влияние на степень ЛП и достоверную корреляцию в сравниваемых группах ( $\chi^2=4,862$ ,  $p=0,0275$ , RR [95% ДИ] = 2,031 [1,054;3,913]). При этом чувствительность составила 61,9%, специфичность - 70,8%. При этом достоверные различия показаны и для общего носительства аллелей 1G и 2G в популяции ( $\chi^2=5,347$ ,  $p=0,021$ ). Однако, при наличии у пациента в генотипе хотя бы одного полиморфного аллеля 1G, наоборот в 1,92 раза увеличивалась вероятность патоморфоза 4 и 5 степени по *Mandard* ( $p=0,021$ ), что является критерием неблагоприятного прогноза и низкой эффективности химиолучевой терапии (чувствительность - 57,1%, специфичность - 60,4%).

Наибольшая прогностическая корреляция со степенью патоморфоза была получена при оценке совместного носительства генов *MMP-1* (-1607 *insG*) и *TNF* (G308A). Данные гены являются взаимосвязанными и имеют ряд однонаправленных генетически кодируемых эффектов. Так, при наличии у пациентов полиморфизма *TNF* (G308A) (G/A) + *MMP-1* (-1607 *insG*) (2G/2G) вероятность выраженного патоморфоза терапии возрастала в 2,436 раза ( $p=0,0105$ ). Другие комбинации полиморфизма этих генов не показали достоверных различий ( $p>0,05$ ). Чувствительность метода для данного сочетания полиморфизмов составила 52,4%, Специфичность - 87,5%.

С учётом вышесказанного, в клинической практике на основании генетического полиморфизма мы можем выделить предикторы благоприятного ответа на неоадьювантную терапию, а в случае прогнозируемого слабовыраженного эффекта – использовать дополнительные методы радиомодификации, изменить режимы и схемы ХЛТ.

Авторы данной статьи считают, что полученные результаты могут использоваться в дальнейшем для совершенствования методов скрининга в определённых возрастных и гендерных группах с целью раннего выявления колоректального рака. Также, благодаря дальнейшему углубленному изучению влияния полиморфизма генов возможно прогнозирование и изменение тактики лечения некоторых пациента, за счёт выявления предикторов индивидуальной чувствительности опухолей к проводимой химио и/или лучевой терапии.

### Список литературы

1. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2021. 239 с.
2. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017–2019 // Atlanta, Ga: American Cancer Society. 2017.
3. Савина Н.В., Никитченко Н.В., Кужур Т.Д., Гончарова Р.И. Полиморфизм генов, кодирующих ДНК-геликазы: влияние на продолжительность жизни // Молекулярная и прикладная генетика. 2016. Т. 20. С. 46-54.
4. Журавлёва Ю.А., Минина В.И., Титов Р.А. Полиморфизм генов ферментов репарации ДНК у больных раком лёгкого // Сибирский онкологический журнал. 2012. Том. 7. Прил. 1. С. 68.
5. Wen M., Zhou B., Lin X., Chen Y., Song J., Li Y., Zacksenhaus E., Ben-David Y., Hao X. Associations between XPD Lys751Gln polymorphism and leukemia: a meta-analysis // Frontiers in genetics. 2018. Vol. 9. 218.



6. Бердов Б.А., Ерыгин Д.В., Невольских А.А., Галкин В.Н., Титова Л.Н., Березовская Т.П., Силантьева Н.К., Звягина И.В., Почуев Т.П., Рухадзе Г.О., Карпов А.А., Бродский А.Р. Неoadъювантная терапия местно-распространенного рака прямой кишки // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2018. 7(3). С. 9-15.
7. Babaei M., Jansen L., Balavarca Y., Sjövall A., Bos A., van de Velde T., Moreau M., Liberale G., Gonçalves A., Bento M., Ulrich C., Schrotz-King P., Lemmens V., Glimelius B., Brenner H. Neoadjuvant therapy in rectal cancer patients with clinical stage II to III across European countries: Variations and Outcomes. *Clin Colorectal Cancer*. 2018. 17. P. 129–142.
8. Dayde D., Tanaka I., Jain R., Tai M., Taguchi A. Predictive and prognostic molecular biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017. 18 (3):573.
9. Sameer A., Nissar S. XPD ± The Lynchpin of NER: molecule, gene, polymorphisms, and role in colorectal carcinogenesis // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2018. 5:23.
10. Куликов Е.П., Судаков А.И., Никифоров А.А., Мерцалов С.А., Григоренко В.А. Значение полиморфизма генов в развитии колоректального рака // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2020. Т. 28, №2. С. 127-134.
11. Jin D., Zhang M., Hua H. Impact of polymorphisms in DNA repair genes XPD, hOGG1 and XRCC4 on colorectal cancer risk in a Chinese Han Population // *Bioscience reports*. 2019. 39(1):BSR20181074.
12. Стандарты лучевой терапии. Под ред. Каприна А.Д., Костина А.А., Хмелевского Е.В. // М.: ГЭОТАР-Медиа. 2019. 384 с.

**Сведения об авторах**

**Алексей Ильич Судаков**

к.м.н., ассистент кафедры онкологии  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,  
Рязань, Россия

Эл. почта: [theleos@inbox.ru](mailto:theleos@inbox.ru)

**Евгений Петрович Куликов,**

д.м.н., профессор, заведующий кафедрой онкологии

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,  
Рязань, Россия

Эл. почта: [e.kulikov@rzgmu.ru](mailto:e.kulikov@rzgmu.ru)

**Сергей Александрович Мерцалов,**

к.м.н., доцент кафедры онкологии  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,  
Рязань, Россия

Эл. почта: [mrst16rzn@yandex.ru](mailto:mrst16rzn@yandex.ru)

**Александр Алексеевич Никифоров,**

к.м.н., доцент кафедры фармакологии  
с курсом фармации ФДПО  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,  
Рязань, Россия

Эл. почта: [a.nikiforov@rzgmu.ru](mailto:a.nikiforov@rzgmu.ru)

**Владимир Андреевич Григоренко**

ассистент кафедры онкологии  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,  
Рязань, Россия

Эл. почта: [moroka1695@yandex.ru](mailto:moroka1695@yandex.ru)

**Information about authors**

**Aleksey Ilyich Sudakov,**

PhD, Assistant of the Chair of Oncology,  
Ryazan State Medical University,  
Ryazan, Russian

E-mail: [theleos@inbox.ru](mailto:theleos@inbox.ru)

**Evgeniy Petrovich Kulikov,**

DMS, Professor,  
Head of the Chair of Oncology,  
Ryazan State Medical University,  
Ryazan, Russian

E-mail: [e.kulikov@rzgmu.ru](mailto:e.kulikov@rzgmu.ru)

**Sergey Alexandrovich Mertsalov,**

PhD, Associate Professor of the Chair of Oncology,  
Ryazan State Medical University,  
Ryazan, Russian

E-mail: [mrst16rzn@yandex.ru](mailto:mrst16rzn@yandex.ru)

**Nikiforov Alexander Alekseevich,**

PhD, Associate Professor of the Chair of Pharmacology with the Course of Pharmacy of the FDPO, Ryazan State Medical University,  
Ryazan, Russian

E-mail: [a.nikiforov@rzgmu.ru](mailto:a.nikiforov@rzgmu.ru)

**Vladimir Andreevich Grigorenko,**

Assistant of the Chair of Oncology, Ryazan State Medical University,  
Ryazan, Russian

E-mail: [moroka1695@yandex.ru](mailto:moroka1695@yandex.ru)

УДК 614.1:575-325  
ГРНТИ 34.23.35  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.110-113

<sup>1</sup>И. Г. Удина, А.С.Грачева<sup>1,2</sup>, <sup>3</sup>Ю.А.Васильев,  
<sup>1</sup>Е.Ю.Победоносцева, <sup>1</sup>О.Л. Курбатова  
<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН  
<sup>2</sup>НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР  
<sup>3</sup>Кубанский государственный медицинский университет

## ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГАПЛОГРУПП Y-ХРОМОСОМЫ В ПОКОЛЕНИЯХ НАСЕЛЕНИЯ МЕГАПОЛИСА ПОД ДЕЙСТВИЕМ МИГРАЦИИ

*В трех поколениях населения Москвы изучены особенности изменений профиля частот гаплогрупп Y-хромосомы под действием миграции. Проведено генетико-демографическое анкетирование и генотипирование по 18 STR Y-хромосомы, определены гаплогруппы Y-хромосомы. Установлены характерные особенности профилей частот гаплогрупп Y-хромосомы в поколениях населения мегаполиса, обусловленные миграцией населения в мегаполис. В самом молодом поколении по сравнению с двумя предыдущими показаны статистически достоверные различия в профилях частот гаплогрупп. Установлено накопление в генофонде населения мегаполиса «южных» по происхождению гаплогрупп, привносимых с потоками мигрантов. Полученные результаты хорошо согласуются с определенным по анкетным данным по этническому составу мигрантов в Москву.*

**Ключевые слова:** мегаполис, гаплогруппы Y-хромосомы, население, миграция, поколение, изменения частот.

<sup>1</sup>I.G. Udina, <sup>1,2</sup>A.S. Gracheva, <sup>3</sup>Yu.A. Vasiliev,  
<sup>1</sup>Pobedonosteva E.Yu, <sup>1</sup>O.L. Kurbatova

<sup>1</sup>N.I. Vavilov Institute of General Genetics  
Russian Academy of Sciences,

<sup>2</sup>V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology

<sup>3</sup>Department of Children's Stomatology, Orthodontic and Orofacial Surgery  
Kuban' State Medical University,.

## PECULIARITIES OF DISTRIBUTION OF Y-CHROMOSOME HAPLOGROUPS IN GENERATIONS OF MEGAPOLIS POPULATION UNDER ACTION OF MIGRATION

*In three generations, peculiarities of changes in the profile of Y-chromosome haplotypes were studied. Genetic demographic questionnaire collecting and genotyping by 18 STR of Y-chromosome were performed, haplogroups of Y-chromosome were detected. In generations of megalopolis population, specific peculiarities of the frequency profiles of Y-chromosome haplogroups were detected, due to migration of population to megalopolis. In the youngest generation, in comparison with two previous generations statistically significant accumulation in the gene pool of megalopolis population "southern" by origin haplogroups bringing to megalopolis with migrant flows. Obtained results are in good agreement with ethnic contents of migrants to Moscow detected by questionnaire data.*

**Key words:** megalopolis, haplogroups of Y-chromosome, migration, population, generation, frequency changes.

### Введение

К основным отличительным особенностям городов-мегаполисов как исторически новых популяционных структур следует отнести: огромную численность (свыше 1 млн. человек), отсутствие в поколениях устойчивого воспроизводства генофонда, преобладающую роль миграции в мегаполис, разнообразный этнический состав населения, много межэтнических браков, внутреннюю подразделенность и искусственную среду обитания, которая требует адаптации к новым условиям [1]. Миграция является

основным генетико-демографическим процессом, влияющим на генофонд мегаполиса и, вследствие неблагоприятия процессов естественного воспроизводства, служит основным источником роста населения [2]. В зависимости от пола потоки населения в мегаполис различаются по интенсивности, этническому составу и дальности миграции. В этой связи, изучение молекулярно-генетических маркеров, которые передаются по женской и мужской линиям, например, гаплогруппы мтДНК и Y-хромосомы, представляют особый интерес. С помощью таких маркеров можно охарактеризовать приток в генофонд мегаполиса не характерных для коренного населения маркеров и рассмотреть динамику маркеров в поколениях под действием миграции (с учетом различий по полу). Для мегаполисов актуальна и проблема создания популяционных референтных судебных баз данных по ДНК-маркерам, включая маркеры, которые передаются только по мужской или женской линии.

**Целью данного исследования** было изучение профиля частот гаплогрупп Y-хромосомы в трех поколениях населения Москвы и установление особенностей изменения частот гаплогрупп в поколениях под действием миграции.

### **Материалы и методы**

Изучены выборки жителей Москвы из трех поколений. Выборка АМ содержит данные о москвичах, средний год рождения которых –  $1949 \pm 2$  для мужчин и  $1948 \pm 1$  для женщин; выборка БМ содержит данные о новорожденных, родившихся в Москве в 2017-2018 гг.; выборка ВМ содержит данные о мужчинах в среднем 1985 года рождения. Эти три выборки представляют три поколения москвичей, которые можно рассматривать как поколения: «деды» (АМ), «родители» (ВМ) и «дети» (БМ). Проведено генетико-демографическое анкетирование и генотипирование по 18 STR Y-хромосомы, по которым с помощью Интернет-предиктора определены гаплогруппы Y-хромосомы [4]. Установлены характерные особенности профилей частот гаплогрупп Y-хромосомы в поколениях населения мегаполиса, обусловленные миграцией населения в мегаполис. Статистическая обработка проведена по алгоритмам программы “*Statistica*.”

### **Результаты и обсуждение**

К гаплогруппам по Y-хромосоме, выявленным во всех выборках Москвы, следует отнести следующий спектр гаплогрупп: *R1a*, *R1b*, *E1b1b*, *N*, *T*, *I1b* и *I2*, а также *J1* и *J2*. В целом, выявленные частоты в выборках из жителей г. Москвы соответствуют частотам, характерным для русского населения [4]. В отношении спектра присутствующих гаплогрупп и их частотного профиля изученные выборки из населения г. Москвы различаются.

Для двух старших поколений, между которыми не было достоверных различий по профилю частот рассматриваемых гаплогрупп, при сравнении с самым молодым поколением установлены достоверные значения, которые подтверждают гетерогенность старших и молодого поколений по профилю частот гаплогрупп Y-хромосомы ( $G=18,0593$ ,  $d.f.=8$ ,  $P<0,025$ ). Помимо установленных достоверных различий между двумя старшими и младшим поколением по частотам крупных гаплогрупп, выявлены достоверные различия по присутствию гаплогруппы *N* ( $G=7,2455$ ,  $d.f. = 1$ ,  $P<0,01$ , а также гаплогрупп Y-хромосомы (*C3*, *G2a*, *G2c*, *H*, *J1*, *J2*, *L*, *O2*, *O3*, *Q*, *R2* и *T*), «южных» по происхождению ( $G = 9,6243$ ,  $d.f. = 1$ ,  $P < 0,005$ ).). Обнаруженные различия обусловлены миграционными процессами. Полученные результаты хорошо согласуются с определенными по анкетным данным оценками коэффициентов миграции в поколениях г. Москвы и с данными анкет об этнической принадлежности жителей мегаполиса [5].

Проведенное исследование позволило установить характерные спектры и профили частот Y-хромосомы для выборок жителей Москвы из разных поколений жителей Москвы и продемонстрировало очевидную гетерогенность разных поколений москвичей в отношении разнообразия гаплогрупп Y-хромосомы, а также позволило проследить динамику накопления в поколениях не характерных ранее гаплогрупп Y-хромосомы -

«южных» по происхождению гаплогрупп (*C3, G2a, G2c, H, J1, J2, L, O2, O3, Q, R2 и T*). К изменениям в профиле частот и спектре гаплогрупп *Y*-хромосомы в поколениях следует отнести снижение в генофонде мегаполисов в поколениях присутствия широко распространенных гаплогрупп, что показано на примере гаплогруппы *N*. Следовательно, в поколениях мегаполиса с помощью изучения гаплогрупп *Y*-хромосомы можно проследивать специфические изменения в генофонде как по спектру, так и по профилю частот гаплогрупп под действием миграции, которые обуславливают замену исходного генофонда населения мегаполиса под действием миграции.

С помощью генетико-демографических параметров, характерных для каждого мегаполиса, возможно в дальнейшем прогнозировать динамику частот конкретных гаплогрупп *Y*-хромосомы в генофонде мегаполиса в поколениях с учетом миграционных процессов. Определение частот *Y*-хромосомы в отдельных поколениях населения мегаполиса важно для формирования популяционных референтных баз данных, необходимых для вычисления оценок вероятности при проведении ДНК-идентификации личности для жителей мегаполиса. Референтные популяционные базы данных по судебным молекулярным маркерам востребованы как для решения задач по определению родства и установлению отцовства, так и для задач криминалистики, включая не только уголовные случаи, но и установление личности жертв техногенных и природных катастроф [6]. При создании популяционных референтных баз ДНК-данных в мегаполисах следует учитывать выявленные особенности изменений в генофонде под действием миграционных процессов. При создании популяционных референтных баз данных для проведения ДНК-идентификации в мегаполисах необходимо проведение генетико-демографического анкетирования одновременно с молекулярно-генетическим анализом для изучения ДНК-маркеров, а также учитывать возрастной фактор.

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 ИО-Ген 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 реализации Мероприятия 10 Научно-технической программы Союзного государства «Разработка инновационных геногеографических и геномных технологий идентификации личности и индивидуальных особенностей человека на основе изучения генофондов регионов Союзного государства» («ДНК-идентификация»).

### Список литературы

1. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю. Урбанизированные популяции // Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. Гл. 5.2. / Ред. Ю.П. Алтухов. М.: Наука, 2004. С. 433-516.
2. Курбатова О.Л., Янковский Н.К. Миграция – основной фактор популяционной динамики городского населения России // Генетика. 2016. Т. 52. № 7. С. 831-851. (Вариант. 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
3. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на русской равнине. –М: Луч, 2007. – 416 с.
4. Курбатова О.Л., Грачева А.С., Победоносцева Е.Ю., Удина И.Г., Генетико-демографические параметры населения г. Москвы. Миграционные процессы. Генетика. 2021. Т. 57. № 12. С. 1438-1449. (Вариант. Kurbatova O.L., Gracheva A.S., Pobedonostseva E.Yu., Udina I.G. Genetic demography of the population of Moscow: migration processes // Russian Journal of Genetics, 2021. - Vol. 57 – N. 12. - p. 1443-1453.

DOI: 10.1134/S1022795421120085)

5. Whit Athey's Haplogroup Predictor. – URL: <http://www.hprg.com/hapest6/hapest6G2a/hapest6.htm?order=orig> (дата обращения 29.08.2019).
6. 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. (Вариант. Tsybovskii I.S., Veremeichik V.M., Kotova S.A., Kritskaya S.V., Evmenenko S.A., and Udina I.G. Developing Forensic Reference Database by 18 Autosomal STR for DNA Identification in Republic of Belarus. *Russian Journal of Genetics*, 2017, Vol. 53, No. 2, pp. 275–284. DOI: 10.1134/S1022795417020132)

**Сведения об авторах**

**Ирина Геннадьевна Удина**

д.б.н., доцент, гл. научн. сотрудник Группы популяционной иммуногенетики, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Москва, Россия

E-mail: [irina\\_udina@mail.ru](mailto:irina_udina@mail.ru)

**А.С.Грачева**

к.б.н., ст. научн. сотрудник лаб. популяционной генетики

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

научн. сотрудник лаб. клинической патофизиологии критических состояний

НИИ общей реаниматологии им.

В. А. Неговского ФНКЦ РР

Москва, Россия

E-mail: [palesa@yandex.ru](mailto:palesa@yandex.ru)

**Ю.А.Васильев**

ассистент кафедры оощественного здоровья, здравоохранения и истории медицины Кубанский государственный медицинский университет,

Краснодар, Россия

E-mail: [yurii-59@mail.ru](mailto:yurii-59@mail.ru)

**Е.Ю.Победоносцева**

к.б.н., ст. научн. сотрудник лаб. популяционной генетики, Институт общей генетики им. Н.И.

Вавилова РАН

Москва, Россия

E-mail: [pobeda1401@gmail.com](mailto:pobeda1401@gmail.com)

**О.Л.Курбатова**

д.б.н., доцент, гл. научн. сотрудник лаб. популяционной генетики, Институт общей генетики

им. Н.И. Вавилова РАН

Москва, Россия

E-mail: [okurbat@list.ru](mailto:okurbat@list.ru)

**Information about authors**

**I.G.Udina**

DBS

N.I. Vavilov Institute of General Genetics,

Russian academy of sciences Russian Academy of Sciences

Moscow, Russian

E-mail: [irina\\_udina@mail.ru](mailto:irina_udina@mail.ru)

**A.S.Gracheva**

PhD

N.I. Vavilov Institute of General Genetics

Russian Academy of Sciences

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology

Moscow, Russian

E-mail: [palesa@yandex.ru](mailto:palesa@yandex.ru)

**Yu.A.Vasiliev**

Department of Children's Stomatology

Orthodontic and Orofacial Surgery,

Kuban' State Medical University, Federal Agency for Public Health and Social Development

Krasnodar, Russian

E-mail: [yurii-59@mail.ru](mailto:yurii-59@mail.ru)

**E.Yu.Pobedonosteva**

PhD

N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian

academy of sciences Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russian

E-mail: [pobeda1401@gmail.com](mailto:pobeda1401@gmail.com)

O.L.Kurbatova

DBS

N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian

academy of sciences Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

E-mail: [okurbat@list.ru](mailto:okurbat@list.ru)

УДК 57.045

ГРНТИ 34.51.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.113-118

ФГБОУ высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

М. М. Асланян

**ПРОБЛЕМЫ КОСМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ**

В статье обсуждаются основные проблемы и этапы развития космической биологии, медицины и генетики. Биологические испытания на разных видах животных и

*растений, в условиях космического полета, позволили ученым предсказать безопасность полета человека в космос.*

**Ключевые слова:** *космические факторы (перегрузка, вибрация, невесомость, космическая радиация, электростатические и электромагнитные поля), замкнутое пространство, автономное жизнеобеспечение.*

**M.M. Aslanyan**

M.V.Lomonosov Moscow State University

### **PROBLEMS OF SPACE BIOLOGY AND GENETICS**

*The article discusses the main problems and stages of the development of space biology, medicine and genetics. Biological tests on different species of animals and plants, in the conditions of space flight, allowed scientists to predict the safety of human flight into space. The existence of a negative influence of space factors on biological processes and morphophysiological structure of organisms requires further research to ensure the biological safety of a long-term human stay in space.*

**Keywords:** *space factors (overload, vibration, weightlessness, cosmic radiation, electrostatic and electromagnetic fields), enclosed space, autonomous life support*

Полеты в космос по праву относятся к величайшим завоеваниям человечества. Они были начаты с полета Юрия Алексеевича Гагарина 12 апреля 1961 года. Наряду с техническими задачами при освоении космического пространства человек решает проблемы из области биологии и генетики. Человек в космическом полете сталкивается с влиянием факторов, нетипичных для условий планеты Земля, таких, как перегрузки, вибрация, невесомость, космическая радиация, электростатические и электромагнитные поля.

Первая попытка послать живые организмы в космос принадлежит советскому ученому Г.Г. Фризену. В 1935 г. в стратосферу были отправлены самцы дрозофилы (линии Нальчик) — на стратостате «СССР-1-бис». Позже, в том же году, американские исследователи послали в стратосферу дрозофилы и споры грибов на аэростате «Эксплорер-2». Результаты этих экспериментов показали отсутствие генетических изменений. Современный этап исследований по космической генетике начался с 1960 г. и был обусловлен появлением первых советских искусственных спутников Земли. С тех пор оформились новые научные дисциплины — космическая биология и космическая генетика.

В течение первого периода осуществлялся поиск соответствующих биологических объектов, а также методов исследования, пригодных для опытов в специфических условиях космоса. Важнейшей научно-практической задачей стала оценка возможной опасности воздействия космических условий на космонавтов. Исследования по космической генетике проводились на пилотируемых и автоматических космических летательных аппаратах, имеющих разные параметры орбит (орбитальные полеты, полеты по трассе Земля – Луна – Земля) и разную продолжительность полета – от нескольких часов до нескольких месяцев. Большое значение имело то, что в Советском Союзе, начиная с 1960 г., появились специализированные биологические спутники. Работы по космической биологии ведутся на различных видах живых организмов, начиная с вирусов и кончая млекопитающими. Для исследований в космическом пространстве в СССР уже использовано свыше 56, а в США – свыше 36 видов биологических объектов. Основными объектами исследований по космической генетике были следующие: бактерии, низшие растения (хлорелла, хламидомонада), высшие растения (крепис, арабидопсис, ячмень, салат, горох), насекомые (дрозофила, хабробракон, триболиум), амфибии (ксенопус), рыбы (гуппи, данио рерио), мыши и крысы.

Для второго периода биологических космических исследований характерны свои особенности проведения полетных опытов – возросли длительность экспериментов, габаритно-весовые возможности, доля участия космонавтов в проведении экспериментов.

Активное участие космонавтов позволяет по-иному осуществлять эксперименты в космосе. Примером успешной работы при участии космонавтов на станции «Салют» являются исследования, проведенные на научных комплексах «Салют-6», «Союз-26», «Союз-27», «Прогресс-1». Биологические исследования для этих полетов разрабатывались рядом советских институтов и включали в себя две международные программы.[1]

Коренным образом изменилось техническое оснащение экспериментов, в частности, на советских спутниках было налажено термостатирование биологических объектов, что было обусловлено созданием приборов типа «Биотерм», «Биокат», «Термоконт». Были сконструированы приборы для культивирования микроорганизмов, разработана аппаратура, позволяющая проводить фиксацию развивающихся икринок рыб и прорастающих семян в условиях невесомости, создана бортовая оранжерея «Оазис».

В опытах на борту космических кораблей используются искусственные облучатели и центрифуги для изучения влияния невесомости и ее взаимодействия с ионизирующей радиацией.

Институт медико-биологических проблем Российской академии наук является ведущей организацией по проведению фундаментальных исследований в области космической биологии и медицины; медико-биологическому обеспечению пилотируемых космических полетов; методов и средств обеспечения безопасности и жизнедеятельности, сохранения здоровья и поддержания работоспособности человека в экстремальных условиях. В разные годы ИМБП возглавляли академики: А.В.Лебединский (1963—1965), В.В.Парин (1965—1968), О.Г. Газенко (1969—1988), А.И. Григорьев (1988—2008), И.Б. Ушаков (2008—2015), О.И. Орлов (с 2015 г. по н.в.). [4]

Полет советского беспилотного космического корабля Космос-1667 («Бион-7»), продолжавшийся с 10 по 17 июля 1985 г. обеспечил проведение большого числа разноплановых биологических и медицинских экспериментов.[2] На борту в специальных отсеках были размещены две макаки (Гордый и Омка), также находились десять крыс-самцов и десять тритонов; семена кукурузы, крокуса и аквариумных рыбок (гуппи); на 1500 мухах *Drosophila melanogaster* исследовался энергетический обмен. В этом полете наша лаборатория экспонировала 50 самцов *Drosophila melanogaster* линии *mei-911* для выявления характера индуцированной рекомбинации под действием факторов космического полета. Параллельно в лаборатории ИОГЕН им. Н.И. Вавилова на центрифуге на самцах той же линии имитировалось ускорение силой 6-8 g при экспозиции 9 мин. x 2 с интервалом 8 суток. Было показано достоверное увеличение частот рекомбинации под действием факторов космического полета. [5]

Генетические методы должны были дать ответ на вопрос, доступны ли условия пребывания в космосе для людей в отношении их безопасности на клеточном уровне и на уровне молекул ДНК. Длительные эксперименты, проведенные под руководством академика Н.П. Дубинина дали положительный результат, на основании которого космическая генетика взяла на себя ответственность за то, что генетический код человека и биосинтез на клеточном уровне во время полетов кораблей (по околоземным орбитам) не испытывают поражений при небольшой длительности (до трех месяцев) полета. [1]

Особое значение следует придать тому факту, что все типы генетических последствий, наблюдавшихся в клетках и организмах в результате их пребывания в космосе, возникали как редкие события (в количественном отношении они не воспроизводятся от полета к полету). Это обстоятельство явилось причиной того, что в пределах различий, достигнутых в осуществленных космических экспериментах, генетические эффекты не показали корреляции ни с длительностью пребывания организмов в условиях невесомости, ни с дозой ионизирующей радиации при различных полетах.

Полетные эксперименты показали, что как отдельные факторы космического полета, так и их комплексное воздействие способны вызывать различные изменения в строении и функционировании наследственного аппарата организмов разного уровня организации. Были обнаружены следующие изменения: инактивация клеток; появление генных и хромосомных мутаций; возникновение потенциальных повреждений, которые лишь спустя некоторое время реализуются в мутации; нарушения протекания митоза.

Примечательной особенностью генетических поражений, возникающих в условиях космоса, была их пространственная неравномерность. Среди живых объектов в полете на фоне общего сохранения нормальных состояний были зарегистрированы высокие уровни поражений у отдельных клеток или групп клеток.

Анализ полученных материалов показал, что влияние факторов космического полета на наследственные структуры следует различать по характеру их действия. Такое влияние может быть и прямым и косвенным. Прямым действием обладали тяжелые ионы космической радиации – при инактивации клеток и при индукции мутаций хромосом и генов. То же можно сказать и о действии условий невесомости на протекание процессов клеточного деления. Косвенно факторы полета влияли на репарационные системы клеток, что оказывало модифицирующий эффект на процессы появления мутаций. При предварительном облучении семян креписа поражение репарационных систем создавало условия, при которых факторы полета усиливали радиационный эффект.

Факторы космического полета способны вызывать различные изменения в строении и функционировании наследственного аппарата. Были обнаружены следующие изменения: инактивация клеток; появление генных и хромосомных мутаций; возникновение потенциальных повреждений, которые могут реализоваться в мутации; нарушения протекания митоза.

Институт общей генетики АН СССР при участии космонавтов Ю.В. Романенко и Г.М. Гречко провел следующие эксперименты.

1. В ходе эксперимента с плодовой мушкой (дрозофилой) предполагалось исследовать состояние ее наследственного аппарата после длительного пребывания в условиях космического полета. Длительность эксперимента составляла 91 сутки. На борту «Салюта-6» находился контейнер с личинками дрозоды линии Д-32 в возрасте около 48 ч, который размещался в термостате «Биотерм-2М», созданном ленинградскими учеными. После полутора месяцев пребывания космонавты провели пересадку их в новый контейнер со свежей питательной средой. Эти мухи дали хорошее потомство в невесомости – 38 самцов и 30 самок, которые и были доставлены на Землю для исследования.

2. Следующий эксперимент проводился с проростками растения *Crepis capillaris* с целью изучить влияние невесомости на клеточное деление и частоту перестроек хромосом. Сухие семена после пребывания в условиях космического полета в течение 33 суток были пророщены, для чего космонавты в специальном приборе «Биофиксатор-1» смочили их водой. Через 35 ч после замачивания семян проростки были зафиксированы специальной смесью и после приземления доставлены в лабораторию. Операции проращивания и фиксации семян в невесомости позволяют вычленить этот фактор и изучить влияние невесомости на частоту перестроек хромосом. Опыт проводился в термостате «Биотерм-4»;

3. На орбитальной станции «Салют-6» в течение 49 суток экспонировались воздушно-сухие семена креписа и арабидопсиса с целью изучить модифицирующее влияние экстремальных факторов полета на радиационный эффект. Для этого одна часть семян перед полетом, а другая – после полета были подвержены облучению: крепис-дозой 3 кР, а арабидопсис - дозой 30 кР.

На кафедре генетики под руководством профессора С.А. Гостимского в течение ряда лет проводились эксперименты на горохе посевном, высаженном в космосе. Испытание роста и развития растений двух генетически маркированных карликовых линий гороха (102 и 131) в космической оранжерее "Лада" и последующая проверка потомства этих растений в наземных условиях позволили отобрать генетически и фенотипически стабильную линию гороха (линия 131), отвечающую всем требованиям к растениям, используемым в длительных космических полетах. Использование семян линии 131 позволило в оранжерее "Лада" на борту МКС получить четыре непрерывных цикла выращивания последовательных поколений гороха. Часть семян этих поколений доставлена на Землю для продолжения исследований генетических последствий длительного выращивания растений в условиях космического полета. Рост и развитие растений в оранжерее «Лада» и в наземных условиях существенно не отличались. Эти



эксперименты открывают широкие возможности для жизнеобеспечения будущих астронавтов в длительных автономных космических путешествиях. Авторы выразили особую благодарность российским космонавтам за превосходную операторскую деятельность при проведении данной серии полетных исследований на борту МКС в октябре 2002 года. [6]

По современным представлениям различают три вида космической радиации: галактические космические лучи, солнечные космические лучи и радиационный пояс Земли. Галактические космические лучи (ГКЛ) – наиболее высокоэнергетическая составляющая корпускулярного потока в межпланетном пространстве – представляет собой ускоренные до высокой энергии ядра химических элементов, среди которых преобладают ядра водорода, гелия и других легких элементов. ГКЛ по своей проникающей способности превосходят все другие виды радиации, кроме нейтрино. Для полного поглощения ГКЛ потребовался бы свинцовый экран толщиной около 15 м.

Радиационный пояс Земли (РПЗ) – это потоки заряженных частиц (протонов и электронов), захваченных геомагнитным полем и образующих области повышенной радиации. РПЗ оказывается основным постоянным источником радиационной опасности при полетах в околоземном пространстве. Рассматривают две области РПЗ: внутреннюю и внешнюю. Энергия протонов, составляющих внутреннюю область РПЗ, достигает нескольких сот мегаэлектрон-вольт. Эта область простирается на расстояние от нескольких сот до нескольких тысяч километров от поверхности Земли/ [3]

Итак, степень радиационной опасности сильно зависит от траектории и продолжительности полета космического корабля. При полетах длительностью в один–три месяца в околоземном космическом пространстве ниже РПЗ радиационное воздействие на экипаж за год сравнимо с уровнями облучения при профессиональной деятельности в земных условиях, связанной с ядерно-техническими установками.

Так, при 84-суточном полете на орбитальной станции «Скайлэб» доза облучения экипажа достигала 10 – 15 бэр, а при 96-суточном полете на станции «Салют-6» эта доза составила около 3 бэр. Для сравнения укажем, что годовая допустимая доза облучения, регламентируемая нормами радиационной безопасности для профессиональной деятельности в земных условиях, составляет 5 бэр. [1]

В ходе биологических экспериментов мы сталкиваемся с рядом загадок:

1) Большинство экспонируемых растений не плодоносит!/? Единственное растение, давшее плоды в космосе – орхидея.

2) Странности в развитии растений. Горох на земле ищет подпорки для своего роста вверх, а в космосе он держится прямо по направлению к источнику света, зеленый лук наоборот изгибается вниз.

3) Под влиянием невесомости и космических лучей у микроорганизмов резко возрастает темп мутирования. Так, на станции «Мир», именно мутировавшие микроорганизмы стали угрожать прочности и износостойкости ее конструкций.

4) Космонавт Александр Серебров при очистке приборов от микроорганизмов обнаружил желтого червя полуметровой длины с коричневой крапункой.

В связи с прекращением в 1996г. запусков российских биологических спутников «Бион» основные биологические эксперименты стали проводиться на аппаратах «Фотон-М». 31 мая 2005г. был запущен «Фотон-М», который окрестили «Ноев ковчег». На спутнике было размещено 385 кг различной аппаратуры и было поставлено около 20 опытов над животными (тритоны, скорпионы, ящерицы и др.). Затем были осуществлены запуски космических аппаратов с символическим названием «Ноев ковчег»: «Фотон-М3», 14.09.2007 г., длительность полета-12 суток, проведено 45 экспериментов; «Бион-М», 19.04.2013 г. с экипажем дублеров- самцов мышей, длительность полета-30 суток. Проведено 70 физиологических и молекулярно-генетических экспериментов.

Исследование, проведенное американским антропологом Джоном Муром совместно со специалистами по космическим полетам, позволило выработать методики космических путешествий продолжительностью в сотни лет. Он предложил организовать экипаж в качестве семьи — института, обеспечивающего воспроизводство

населения на протяжении миллионов лет. Удалось установить, что для космического путешествия продолжительностью 200 лет, или от 8 до 10 поколений, необходим экипаж численностью 160 человек. Экипаж должен состоять на момент старта из молодых бездетных пар, и, во-вторых, откладывать появление потомства до 35-40 лет, что позволит снизить численность экипажа до 80 человек. На мой взгляд этот проект сверх утопический и чреват медицинскими, генетическими и социально-культурными рисками.

#### **Заключение**

Существование отрицательного влияния космических факторов на биологические процессы и морфофизиологическую структуру организмов требует дальнейших исследований для обеспечения биологической безопасности длительного пребывания человека в космосе.

#### **Список литературы**

1. Н.П. Дубинин. *Генетика и космос. Космическая медицина и биология. Сборник статей.* М., «Знание», 1978. 64 с. (Новое в жизни, науке, технике). Серия «Космонавтика, астрономия», 10.
2. Е. А. Ильин, Г.П. Парфенов. *Исследования на биоспутниках серии «Космос».* Там же.
3. Е.Е. Ковалев. *Защита экипажей от ионизирующей радиации.* Там же.
4. Ю.Г. Григорьев, И.Б. Ушаков, Е.А. Красавин и др. *Космическая радиобиология за 55 лет (к50-летию ГНЦ РФ-ИМБП РАН) / Российская академия наук. Институт медико-биологических проблем.* М.: Экономика. 2013. 303 с.
5. М.М. Асланян, В.А. Смирнова, Л.П. Прокофьева. *Характер индуцированной рекомбинации у самцов *Drosophila melanogaster* линии mei-911 под действием факторов космического полета.* *Генетика.* 1987, т. XXIII, №2, с. 283-286.
6. С.А. Гостимский, З.Г. Кокаева, О.П. Дрибноходова, Г.А. Хартина, М.А. Левинских, В.Н. Сычев, Г. Биндхем. *Исследование генетических эффектов в потомстве растений гороха, выращенных в течение полного цикла онтогенеза в космической орбитальной станции на борту РС МКС.* *Генетика,* 2007, т.43, №8.

#### **Сведения об авторах**

**Марлен Мкртичевич Асланян,**  
д.б.н., проф., профессор  
ФГБОУ высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»  
Москва, Россия  
E-mail:marlen32@mail.ru

#### **Information about authors**

**Marlen Mkrtichevich Aslanyan**  
DBS, Professor  
M.V.Lomonosov Moscow State University  
Moscow, Russian  
E-mail:marlen32@mail.ru

УДК 611.018:611.453  
ГРНТИ 76.03.35, 76.29.37  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.119-123

Н. В. Яглова  
НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии  
им. акад. Б.В. Петровского»

## РАЗВИТИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ

*Проведено исследование развития и функционирования мозгового вещества надпочечников при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах. Установлено, что ДДТ нарушает морфогенетические и секреторные процессы, что приводит к снижению продукции катехоламинов.*

**Ключевые слова:** хромоаффинные клетки, катехоламины, эндокринный дисраптор, ДДТ, надпочечник

N. V. Yaglova  
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of  
FSBSI "Petrovsky NRCS"

## DEVELOPMENT AND FUNCTION OF THE ADRENAL MEDULLA IN EXPOSED TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT ORGANISMS

*Development and function of the adrenal medulla in exposed to endocrine disruptor DDT organisms was studied. The investigation revealed disrupted by DDT morphogenesis and secretion of adrenal medulla resulted in decreased production of catecholamines.*

**Key words:** chromaffin cells, catecholamines, endocrine disruptor, DDT, adrenal gland

Воздействие эндокринных дисрапторов традиционно связывают с нарушениями секреции половых и тиреоидных гормонов, нарушением развития и функционирования половой системы мужчин и женщин [1,2]. В то же время в последние десятилетия наблюдается устойчивый рост нарушений в функционировании центральной нервной системы, психических расстройств, когнитивных расстройств, пограничных состояний. Эти изменения характерны не только для взрослого, но и для детей. Начало 21-го века ознаменовалось увеличением частоты аутизма, синдромов Аспергера, синдрома гиперактивности и дефицита внимания, что стало новой социальной проблемой для общества [3,4,5]. Вклад антропогенных факторов в рост психических и психосоматических расстройств очевиден, но какие конкретные воздействия инициируют данные виды патологий не понятно. Роль эндокринных дисрапторов в изменениях функционирования нервной системы изучена в значительно меньшей степени. Одним из ключевых вопросов является способность дисрапторов нарушать синтез катехоламинов – веществ, одновременно являющихся и гормонами, и нейромедиаторами. Наиболее крупным продуктом катехоламинов в организме является мозговое вещество надпочечников, которое формирует 80% кровяного пула адреналина.

**Цель исследования** – изучить развитие и функционирование мозгового вещества надпочечников при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ.

### Материалы и методы

Для моделирования воздействия ДДТ на развивающийся организм самки крыс потребляли раствор ДДТ с концентрацией 20 мкг/л вместо воды в течение всего срока беременности, а также периода лактации. Затем потомство самостоятельно потребляло аналогичный раствор ДДТ. Дополнительно была сформирована группа сравнения, в которой потомство подвергалось воздействию дисраптора с первых суток постнатального развития. Животных выводили из эксперимента в возрасте 42 суток и 70 суток. 42-ые

сутки соответствуют пубертатному периоду, а 70-ые сутки – это постпубертатному периоду, когда надпочечник крысы по литературным данным достигает максимума своего морфологического развития [6]. Проведено морфологическое исследование надпочечников, иммуногистохимическое определение экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих морфогенетические процессы, показателя функциональной активности хромаффинных клеток тирозингидроксилазы, пролиферативной активности *Ki-67*, иммуноферментное определение концентрации адреналина и норадреналина в плазме крови. Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение *Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США)*. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,01$ .

### **Полученные результаты**

В пубертатном возрасте у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ, отмечалось снижение концентрации адреналина и норадреналина в системном кровотоке. Известно, что содержание норадреналина в плазме отражает активность периферической симпатической нервной системы, в то время как содержание адреналина указывает на активность мозгового вещества надпочечников. Следовательно, выявленные изменения позволяют заключить, что снижение синтеза адреналина обусловлено не уменьшением метилирования норадреналина, а связано со снижением продукции его более ранних предшественников, и что этот процесс происходит как в хромаффинных клетках надпочечников, так и в нейронах периферической нервной системы.

Для исследования причин было проведено морфологическое исследование мозгового вещества надпочечников и иммуногистохимическое исследование тирозингидроксилазы. Изучение строения мозгового вещества показало, что к пубертатному периоду степень его развития не отличается от возрастного контроля, так как значимых различий не в площади мозгового вещества в экваториальных срезах, ни общей площади хромаффинных клеток не обнаружено. Но отмечалось значительное снижение экспрессии тирозингидроксилазы.

После достижения половой зрелости снижение продукции катехоламинов стало еще более выраженным, показывая, что надпочечник не сформировал компенсаторные изменения. Исследование причин, вызвавших усугубление функциональной активности показало следующее. Пренатальное и постнатальное воздействие дисраптора приводит к отставанию его развития после пубертатного периода. Причем связано это именно с замедлением развития хромаффинных клеток. Так как наблюдаемый на 70-ые сутки рост пролиферативной активности хромаффинных клеток указывает на задержку, а не на раннее прекращение развития мозгового вещества. Эти изменения обусловлены пренатальным воздействием, так как у крыс, подвергавшихся только постнатальному воздействию ДДТ, эти особенности были менее выражены. Для изучения нарушения темпов развития была проведена оценка параметров транскрипционной регуляции морфогенетических процессов. Экспрессия  $\beta$ -катенина хромаффинными клетками и роль канонического *Wnt*-сигналинга в морфогенезе мозгового вещества также очень мало изучена. Исследование контрольной группы показало, что развитие мозгового вещества надпочечников в норме сопровождается активацией канонического *Wnt*-сигналинга. У животных, подвергавшихся воздействию дисраптора, независимо от сроков начала воздействия, активация *Wnt*-сигналинга была менее выражена. Следовательно, более поздняя активация канонического *Wnt*-сигналинга, обусловленная воздействием ДДТ, является одной из причин замедления развития мозгового вещества. Сравнение крыс опытных групп оказывает, что ДДТ оказывает ингибирующее воздействие на эти процессы еще в пренатальном периоде, что и обуславливает пониженный уровень экспрессии этого белка и в пубертатном, и в постпубертатном периоде.

Вторым изученным нами транскрипционным фактором был богатый пролином гомеодомен или *Nhex*. Он является мощным репрессором пролиферации. Ранее считалось, что этот транскрипционный фактор экспрессируют нейроны головного мозга, в то

время как нейроны периферической нервной системы, являющиеся производными ганглиозной пластинки, являются *Hhex*-негативными [7]. В настоящем исследовании впервые показана экспрессия *HNhex* в хромаффинных клетках. Полученные нами данные доказывают, что и производные ганглиозной пластинки, которыми являются хромаффинные клетки, также экспрессируют *Hhex* в постнатальном развитии, и что он также участвует в регуляции постнатального морфогенеза мозгового вещества, подавляя пролиферацию хромаффинных клеток, но в меньшей степени, чем в корковом веществе. *Hhex* в хромаффинных клетках демонстрирует тесную кооперацию с каноническим *Wnt*-сигналингом в регуляции пролиферативных процессов. Воздействие эндокринного дисраптора, начавшееся в пренатальном развитии, является фактором, нарушающим кооперацию в экспрессии *Hhex* и активации канонического *Wnt*-сигналинга.

Исследование тирозингидроксилазы показало, что после наступления половой зрелости ее уровень снижается. Таким образом, снижение продукции адреналина надпочечниками могло быть обусловлено двумя причинами: замедлением роста мозгового вещества и снижением экспрессии тирозингидроксилазы. Однако снижение продукции катехоламинов с возрастом происходило не только у подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, но и у интактных крыс, несмотря на увеличение численности хромаффинных клеток в мозговом веществе и высокий уровень синтеза тирозингидроксилазы.

Помимо интенсивности синтеза в хромаффинных клетках дополнительным фактором, определяющим выделение адреналина в кровотоки, является скорость выделения секреторных гранул, содержащих адреналин. Анализ научной литературы показывает, что выделение секреторных гранул во-многом обеспечивается митохондриями, располагающимися под наружной цитоплазматической мембраной хромаффинных клеток [8, 9, 10]. Для уточнения роли митохондрий в секреции адреналина мы провели оценку возрастных изменений ультраструктуры адреналоцитов. В адреналоцитах отмечалось значительное уменьшение численности митохондрий, особенно располагающихся под плазмолеммой. Таким образом, данные об участии митохондрий в обеспечении выделения адреналина подтверждаются и уменьшение числа митохондрий можно рассматривать как механизм снижения выброса адреналина в кровь.

В пубертатном возрасте у крыс хромаффиноциты имели меньшие размеры, число митохондрий и количество секреторных гранул, содержащих адреналин, было снижено по сравнению с контролем, что указывает на два равноправных механизма уменьшения выделения адреналина в кровь. После наступления половой зрелости наряду со снижением синтеза тирозингидроксилазы отмечались деструктивные изменения в митохондриях, что в свою очередь еще больше уменьшало продукцию адреналина.

При сравнении групп животных, которые подвергались воздействию ДДТ в пре- и постнатальном периоде и только в постнатальном обнаружено, что у крыс подвергавшиеся воздействию эндокринного дисраптора после рождения не было задержки роста мозгового вещества и, но наблюдалось скопление секреторных гранул в цитоплазме. Уровень адреналина при этом был минимальным в сравниваемых группах, а поскольку уровень тирозингидроксилазы у этих животных не изменялся с возрастом, следовательно снижение продукции адреналина было обусловлено нарушением секреторной машинерии, обеспечивающей выделение адреналина из клеток. Это подтверждается усилением молекулярной секреции, то есть оводнения секреторных гранул и растворения их содержимого [11]. Это явление может рассматриваться как альтернативный путь выделения адреналина.

#### **Выводы:**

1. Воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ, предусмотренных нормативами его содержания в пищевых продуктах, на развивающийся организм в пренатальном и постнатальном периодах вызывает изменения у крыс постнатального морфогенеза мозгового вещества надпочечников и нарушает его секреторную деятельность как в пубертатном периоде, так и после достижения половой зрелости.

2. Дисморфогенетическое действие низких доз ДДТ на мозговое вещество надпочечников заключается в снижении пролиферативной активности хромоаффиных клеток и замедлении темпов развития мозгового вещества при переходе от пубертатного периода к половой зрелости, что связано с нарушением кооперации в экспрессии PRH/Nhex и активации канонического *Wnt*-сигналинга.

3. Снижение темпов роста мозгового вещества надпочечников, уменьшение числа митохондрий, в адреналocyтах, особенно под наружной цитоплазматической мембраной, деструктивные изменения митохондрий и прогрессирующее снижение синтеза тирозингидроксилазы можно рассматривать основные механизмы дисрапторного действия ДДТ, приводящие к снижению секреции адреналина в системный кровоток. Сравнительный анализ показывает, что нарушение секреторных процессов, связанное в том числе и с нарушениями перестройки митохондрий, играет центральную роль в снижении продукции адреналина.

### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм является фактором нарушения морфогенетических и секреторных процессов в мозговом веществе надпочечников и приводит к прогрессирующему снижению продукции катехоламинов в организме.

*Исследование выполнено по теме государственного задания FGFZ-2022-0035.*

### Список литературы

1. Sifakis S., Androutopoulos V. P., Tsatsakis A. M., Spandidos D. A. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2017. V. 51. P. 56-70.
2. Яглова Н.В., Следнева Ю.П., Яглов В.В. Морфофункциональные изменения щитовидной железы крыс в пубертатном и постпубертатном периодах развития при воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2016. Т. 162. № 8. С.227-231.
3. Biederman J, Kwon A, Aleardi M, et al. Absence of gender effects on attention deficit hyperactivity disorder: findings in nonreferred subjects // *Am. J. Psychiatry.* 2005. N. 162(6). P. 1083-1089.
4. Зиновьева О., Роговина Е., Тыринова Е. Синдром дефицита внимания с гиперактивностью у детей // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 2014. N. 6(1). P. 4-8.
5. Elsabbagh M., Divan G., Koh Y.J., Kim Y.S., Kauchali S., Marcín C., Montiel-Nava C., Patel V., Paula C.S., Wang C., Yasamy M.T., Fombonne E. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders // *Autism Res.* 2012. N. 5(3). P. 160-179.
6. Pignatelli D., Xiao F., Gouveia A., Ferreira J., Vinson J.P. Adrenarche in the rat. *J. Endocrinol.* 2006. N. 191(1) P. 301-308.
7. Simpson M., Venkatesh I., Ben Callif L., Thiel L., Coley D., Winsor K., Wang Z., Kramer A., Lerch J., Blackmore M. The tumor suppressor HHEX inhibits axon growth when prematurely expressed in developing central nervous system neurons // *Mol. Cell Neurosci.* 2015. V. 68. P. 272-283.
8. Garcia-Sancho J., de Diego A., Garcia A. Mitochondria and chromaffin cell function // *Pflugers Arch.* 2012. V. 464. P. 33-41.
9. Villalobos C., Nuñez L., Montero M., Garcia A., Alonso M.T., Chamero P., Alvarez J., Garcia-Sancho J. Redistribution of Ca<sup>2+</sup> among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells // *FASEB J.* 2002. N. 16(3) P. 343-353.
10. Villanueva J., Viniegra S., Gimenez-Molina Y., Garcia-Martinez V., Exposito-Romero G., del Mar Frances M., Garcia-Sancho J., Gutierrez L. The position of mitochondria and ER in relation to that of the secretory sites in chromaffin cells // *Journal of Cell Science.* 2014.

V. 127. P. 5105–5114.

11. Яглова Н.В., Яглов В.В. Ультраструктурные проявления молекулярного способа выделения секреторного материала тучными клетками щитовидной железы при воздействии липополисахарида. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155. № 2. С.229-232.

**Сведения об авторах**

**Наталья Валентиновна Яглова**

д.м.н., зав. лабораторией развития

эндокринной системы

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына

ФГБНУ «Российский научный центр хирургии

им. акад. Б.В. Петровского»,

Москва, Россия

**E-mail:** yaglova@mail.ru

**Information about authors**

**Nataliya Valentinovna Yaglova**

Head of Laboratory

A.P. Avtsyn Research Institute

of Human Morphology

of FSBSI "Petrovsky NRCS"

Moscow Russia

**E-mail:** yaglova@mail.ru

УДК 615.038; 615.222  
ГРНТИ 34.45.05, 76.31.29  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.123-126

**Н. К. Давыдова**  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки  
Институт элементоорганических соединений  
им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук

**ВЗАИМОСВЯЗЬ «СТРУКТУРА – АКТИВНОСТЬ» АНТИАРИТМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НИБЕНТАНА И НИФЕРИДИЛА**

*В статье обобщены данные о связи химической структуры активных действующих веществ нибентана и ниферидила с их антиаритмической активностью.*

**Ключевые слова:** нибентан, ниферидил, рефралон, антиаритмические препараты III класса, взаимосвязь «структура – активность»

**N.K. Davydova**  
A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian  
Academy of Sciences (INEOS RAS)

**«STRUCTURE – ACTIVITY» RELATIONSHIP OF ANTIARRHYTHMIC DRUGS NIBENTAN AND NIFERIDYL**

*The paper summarizes data on the relationship between the chemical structure of nibentan and niferidyl pharmaceutical ingredients and their antiarrhythmic activity.*

**Keywords:** nibentan, niferidyl, refralon, class III antiarrhythmic drugs, "structure - activity" relationship

Создание новых высокоэффективных антиаритмических препаратов (ААП) основано на фундаментальных исследованиях по дизайну, синтезу, изучению свойств биологически активных соединений и на модификации структуры известных лекарственных средств.

Лечение сердечных аритмий, в особенности мерцательной аритмии, является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Важной составляющей лечения пациентов с мерцательной аритмией является назначение ААП III класса.

В настоящее время особую значимость приобретают исследования по поиску эффективных и безопасных антиаритмических лекарственных средств в связи с тем, что аритмии сердца часто наблюдаются у пациентов с COVID-19 [1-4].

При создании ААП с позиций доказательной медицины («evidence based

*medicine*») в первую очередь ставится комплексная задача по изучению влияния биологически активных веществ на так называемые «конечные точки»: эффективность и безопасность в клинических исследованиях, побочные реакции и т.д.

Целенаправленный синтез биологически активных соединений с желаемой антиаритмической активностью и наименьшей токсичностью является сложной задачей.

Ранее нами был получен гидрохлорид (*RS*)-4-нитро-N-[1-фенил-5-(диэтиламино)пентил]бензамида (**1**, рис.1), показавший высокую антифибрилляторную активность. На его основе был создан первый российский оригинальный ААП III класса нибентан, удостоенный Государственной премии РФ [5,6].

В связи с тем, что при применении нибентана возможно проявление побочных и проаритмических эффектов, был продолжен поиск биологически активных соединений, потенциально пригодных для создания новых высокоэффективных и безопасных ААП.

С целью изучения взаимосвязи «структура-активность» авторами была синтезирована и исследована большая группа новых соединений - производных пиперидил-4-этана общей формулы **2** (рис.2).

Антифибрилляторную активность соединений **2** изучали на аконитиновой и хлоридкальциевой моделях аритмий у крыс и на строфантиновой модели аритмии у морских свинок. Показано, что уровень антифибрилляторной активности зависит от природы заместителей в соединениях **2** и от расстояния между двумя фармакофорными центрами: асимметрическим атомом углерода и третичной аминогруппой (рис.3).

Наибольшая активность и продолжительность действия была выявлена у гидрохлорида 4-нитро-N-[(1*RS*)-1-(4-фторфенил)-2-(1-этилпиперидин-4-ил)этил]бензамида (**2a**), в структуре которого присутствуют пиперидиновый цикл в конформации «кресло», атом фтора и нитро группа в положении 4 одного и второго бензольного кольца соответственно (рис.3) [7-10]. ААП, созданный на основе **2a**, получил название ниферидил.

После углубленного фармакологического исследования был проведен комплекс доклинических и клинических испытаний ниферидила на базе ФГБУ "НМИЦ кардиологии".

Было показано, что у ниферидила отсутствуют мутагенные и аллергизирующие свойства (тесты общей анафилаксии - аллергический шок, реакция активной кожной анафилаксии, реакция гиперчувствительности «замедленного» типа, псевдоаллергическая реакция на конканавалин А), ДНК-повреждающее действие [7].

Установлено, что ниферидил в дозе, в 6 раз меньшей, чем нибентан, увеличивает рефрактерность в 2-3 раза больше, и влияет преимущественно на рефрактерность предсердий, что резко снижает вероятность развития полиморфной желудочковой тахикардии. Ниферидил также восстанавливает синусовый ритм в меньших дозах (10, 20 и 30 мкг/кг), чем нибентан (62.5 и 125 мкг/кг). [11-14].

На основании полученных данных ниферидил был внедрен в медицинскую практику для купирования фибрилляции и трепетаний предсердий под торговым названием рефралон [15].

Автор считает, что такой результат свидетельствует об успешном выборе направления в поиске новых биологически активных соединений для создания новых ААП.

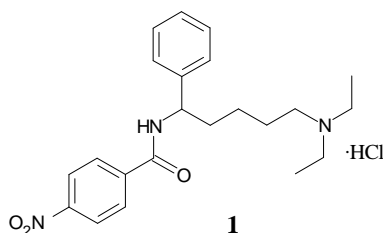
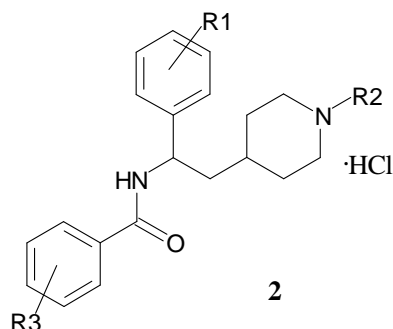


Рис.1. Структурная формула субстанции нибентана (1)





**2a:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-NO<sub>2</sub>; **2b:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=H; **2c:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=3-NO<sub>2</sub>; **2d:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=2-NO<sub>2</sub>; **2e:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-F; **2f:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=3-pyridyl; **2g:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=2-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; **2h:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=4-NO<sub>2</sub>; **2i:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>Ph, R<sub>3</sub>=4-NO<sub>2</sub>; **2j:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>Ph, R<sub>3</sub>=H; **2k:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>Ph, R<sub>3</sub>=4-F; **2l:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>=4-NO<sub>2</sub>; **2m:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>=H; **2n:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=4-F; **2o:** R<sub>1</sub>=4-F, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H; **2p:** R<sub>1</sub>=4-Cl, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-NO<sub>2</sub>; **2q:** R<sub>1</sub>=4-Cl, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=H; **2r:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=H; **2s:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-NO<sub>2</sub>; **2t:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-Cl; **2u:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=2-Cl; **2v:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-F; **2w:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-NH<sub>2</sub>; **2x:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-OCH<sub>3</sub>; **2y:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-CF<sub>3</sub>; **2z:** R<sub>1</sub>=4-OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>=4-NO<sub>2</sub>; etc.

Рис.2. Структурная формула производных пиперидил-4-этана

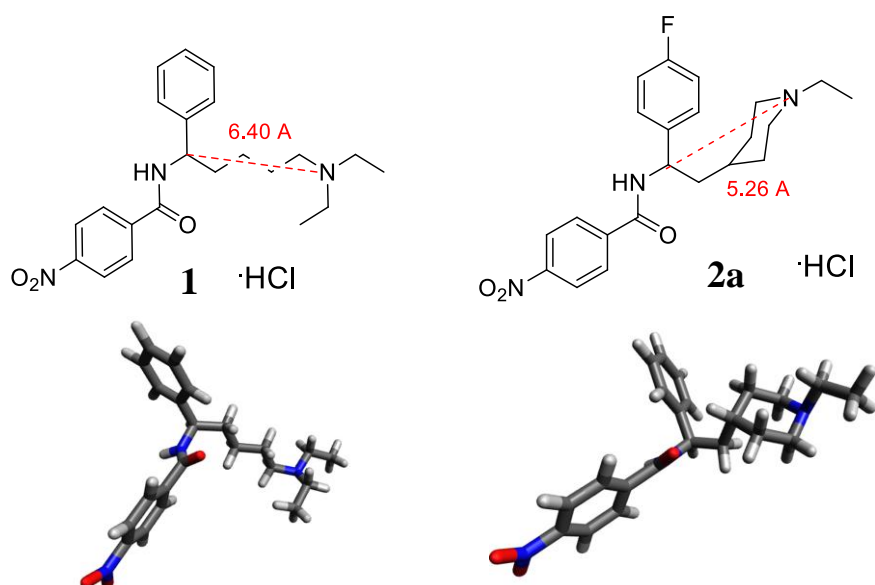


Рис.3 Структуры и модели нибентана (1) и ниферидила (2а)

### Благодарности

Давыдова Н.К. благодарит за поддержку Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

### Список литературы

1. Yueying W., Zhaojia W., Gary T., et al. Cardiac arrhythmias in patients with COVID-19 // *Journal of Arrhythmia*. 2020. 36(5): 827-836.
2. Gopinathannair R., Merchant F.M., Lakkireddy D.R., et al. COVID-19 and cardiac arrhythmias: a global perspective on arrhythmia characteristics and management strategies // *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 2020. 59: 329–336.
3. Ghrair F., Mansour A., Luebbering Z., et al. Addressing polymorphic ventricular tachycardia in COVID-19 patients - a broad differential // *Journal of the American College of*

- Cardiology*. 2021. 77. (18\_Suppl.\_1): 1990.
4. Duckheim M, Schreieck J. COVID-19 and Cardiac Arrhythmias // *Hamostaseologie*. 2021. 41(5): 372-378.
  5. Способы получения гидрохлорида 1-фенил-1-п-нитробензоиламино-5-N,N-диэтиламинопентана и 1-фенил-1-амино-5-N,N-диэтиламинопентана: патент 2059612 Российская Федерация / Глушков Р.Г., Львов А.И., Давыдова Н.К. и др., заявл. 25.02.1993, опубл. 10.05.1996, Бюл. "Изобретения". №13. С.177.
  6. Davydova N.K., Sizova O.S., Vinogradova S.M. et al. Synthesis and antifibrillatory activity of nibentan and its analogues // *Eur. J. Med. Chem.* 2000. 35(2): 205-215.
  7. Гидрохлорид N-1-[(4-фторфенил)-2-(1-этил-4-пиперидил)этил]-4-нитробензамид, проявляющий антиаритмическую и антифибрилляторную активность: патент 2415128 Российская Федерация / Глушков Р.Г., Южаков С.Д., Давыдова Н.К. и др., заявл. 07.05.2009, опубл. 27.03.2011. Бюл. "Изобретения". №9. С.1-9.
  8. Глушков Р.Г., Южаков С.Д., Львов А.И. и др. Новая группа антиаритмических средств III класса - производных пиперидил-4-этана // *Хим. фарм. журн.* 2011. 45(2). С. 3-12; *Pharm. Chem. J.* 2011. 45(2). P.65-74.
  9. Давыдова Н.К. Разработка субстанций оригинальных антиаритмических препаратов III класса нибентана и ниферидила // *Хим.-фарм. журн.* 2019. 53(9). С.15-19; *Pharm. Chem. J.* 2019. 53(9). P.792-796.
  10. Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Желтухин Н.К. и др. Лекарственные препараты, разработанные АО «ВНЦ БАВ» под руководством академика М.Д. Машиковского (обзор) // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019. 8(1). С.7-13.
  11. Юричева Ю.А., Соколов С.Ф., Голицын С.П. и др. Новый антиаритмический препарат III класса ниферидил как эффективное средство восстановления синусового ритма при персистирующей форме мерцательной аритмии // *Вестник аритмологии*. 2012. №70. С. 32-43.
  12. Миронов Н.Ю., Голицын С.П., Соколов С.Ф. и др. Электрофизиологические и антиаритмические эффекты нового отечественного антиаритмического препарата III класса ниферидила. Сообщение I: Электрофизиологические эффекты ниферидила у больных пароксизмальными наджелудочковыми тахикардиями // *Вестник аритмологии*. 2012. №70. С.5-13.
  13. Майков Е.Б. Автореферат диссертации доктора мед.наук. – Москва, 2014. – 49с.
  14. Юричева Ю.А. Автореферат диссертации кандидата мед.наук. – Москва, 2012.– 25с.
  15. Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для медицинского применения ЛП-002510 от 24.06.2014. <http://refralon.ru/regdoc>

**Сведения об авторах**

**Надежда Константиновна Давыдова,**  
кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки А. Н. Несмеянов Институт элементорганических соединений  
им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук  
Москва, Россия  
**E-mail:** [davydova@ineos.ac.ru](mailto:davydova@ineos.ac.ru)

**Information about authors**

**Dr. Davydova Nadejda,**  
PhD  
Senior Research Scientist,  
Organoelement Compounds Russian-Academy of Sciences (INEOS RAS)  
Moscow Russia  
**E-mail:** [davydova@ineos.ac.ru](mailto:davydova@ineos.ac.ru)

УДК 616-092  
ГРНТИ 76.03.53  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.127-137

А. Д. Черкасов, Е. Н. Петрова  
Федеральное государственное бюджетное научное  
учреждение «Научно-исследовательский институт общей  
патологии и патофизиологии» ФГБНУ «НИИОПП»  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки  
Институт проблем передачи информации им.  
А.А. Харкевича  
Российской академии наук (ИППИ РАН)

## ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА

*В статье обсуждаются методы увеличения продолжительности жизни человека. С помощью МРТ диагностировано состояние мышечного корсета позвоночника с локализацией дистрофических проявлений в позвонках и межпозвонковых дисках. Остеохондроз позвоночника рассматривается как преждевременное старение костно-хрящевых тканей, вызванное спастическими состояниями в межпозвонковых мышцах.*

**Ключевые слова:** *остеохондроз, мышцы, спастические состояния, болевые синдромы, хронические заболевания.*

D. Cherkasov, E. N. Petrova  
FGBNU «НИОПП»  
IPPI RAN

## PATHOPHYSIOLOGICAL FACTORS OF PREMATURE HUMAN AGING

*The article discusses methods for increasing human life expectancy. Using MRI, the condition of the muscular corset of the spine was diagnosed with localization of dystrophic manifestations in the vertebrae and intervertebral discs. Osteochondrosis of the spine is considered as premature aging of bone and cartilage tissues caused by spastic conditions in the intervertebral muscles.*

**Key words:** *osteochondrosis, muscles, spastic conditions, pain syndromes, chronic diseases.*

### Введение

Ключевым вопросом многочисленных теорий старения является связь возрастных заболеваний со старением, так как подавляющее большинство людей умирает не от старческой немощи, а от хронических (ИБС, сердечная недостаточность, сердечные приступы, диабет, нефрит, язвенная болезнь) и катастрофических заболеваний (инфаркт миокарда, инсульт, внезапная остановка сердца). Статистика этих заболеваний однозначно связывает их с возрастом. Теории старения предполагают, что возрастные заболевания вызваны именно старением организма. В то же время ряд геронтологов полагает, что старение и «возрастные заболевания» это два независимых процесса. Имеется также третий взгляд. Он принадлежит И.И. Мечникову [6]. Его суть заключается в том, что «возрастные заболевания» развиваются задолго до начала старения организма человека и приводят к его преждевременному старению.

Болезненное и преждевременное старение И.И. Мечников рассматривал как болезнь и связывал с аутоинтоксикацией организма. Аутоинтоксикация или самоотравление вызывается развитием патологической микрофлоры в кишечнике человека и так называемым «синдромом дырявого кишечника» - частичной утратой барьерных свойств слизистой оболочки толстого кишечника. Причина аутоинтоксикации состоит не столько в структуре питания, сколько в нарушении функций желудочно-кишечного тракта. С нашей точки зрения аутоинтоксикация вызвана нарушениями проводимости симпатических нервов, управляющих метаболическими и регенеративными процессами в тканях внутренних органов. А.Д. Сперанский ещё в тридцатые годы прошлого века разработал доктрину нейродистрофических процессов, согласно которой нарушение состояния симпатических нервов – компрессия, повреждение или воздействие продуктами воспалительного процесса, приводят к дистрофическим явлениям, кровоизлияниям и некрозам в тканях внутренних органов [1]. Нашими многолетними

исследованиями показано, что ряд хронических заболеваний связан с многолетними спастическими состояниями мышц позвоночника. Жесткие спазмированные мышцы приводят к компрессии симпатических нервов, выходящих через межпозвоночные отверстия и иннервирующих внутренние органы. Именно эти причины приводят к развитию хронических заболеваний и преждевременному старению человека.

На Земле существует 14 так называемых голубых зон, продолжительность средней жизни людей, проживающих в этих зонах на 15–20 лет превышает среднюю продолжительность жизни в нашей стране. Генетический потенциал человека по мнению ведущих геронтологов составляет 120 - 140 лет. Мы разрабатываем концепцию преждевременного старения человека, согласно которой подавляющее число людей не доживает до настоящей старости по причине хронических заболеваний. Многочисленные исследования, проведенные во Всесоюзном институте Экспериментальной Медицины (ВИЭМ) и его преемнике НИИ Общей Патологии и Патофизиологии, доказали, что основные факторы, приводящие к сокращению продолжительности жизни по отношению к генетическому потенциалу, находятся в сфере физиологических нарушений внутри организма. Одна из этих причин – остеохондроз позвоночника.

Проблема остеохондроза волнует не только врачей, лечащих болевые синдромы спины и суставов, но и каждого человека. Остеохондроз позвоночника был впервые описан в 1933 г. А. Хильдебрандтом. Первоначально под остеохондрозом позвоночника предлагалось понимать истончение межпозвоночных дисков, их обезвоживание, снижение тургора, фрагментацию пульпозного ядра, истончение гиалиновых пластинок, радиальные и концентрические трещины, внедрение пульпозного ядра в тела позвонков - грыжа Шморля. По теории проф. Я.Ю. Попелянского остеохондроз позвоночника является нейро-ортопедическим заболеванием и вызван прямохождением человека [6]. Именно он вызывает боли в спине и конечностях. Согласно этой теории, каждый человек обречен страдать болями в спине. Этот фатальный характер заболевания определил на 60 лет стратегию лечения болевых синдромов в спине – приём болеутоляющих препаратов и хирургические операции. Альтернативный взгляд принадлежит П.Л. Жаркову. По его мнению, боли в спине и пояснице не могут быть вызваны остеохондрозом или грыжами дисков, которые якобы приводят к компрессии сенсорных нервов в составе нервных корешков, вызывая такое заболевание как радикулит [2,3,10]. В последние 2 десятилетия взгляды на причины болевых синдромов в спине пересмотрены. Диагноз «радикулит» в 1997 году был исключен из Международной классификации болезней одиннадцатой редакции (МКБ-10). Диагноз «Остеохондроз позвоночника» в 2020 году был исключен из Международной классификации болезней одиннадцатой редакции (МКБ-11). Но остеохондроз как дистрофический процесс не исчез, более того, он из «бича человечества XX века» превратился «Домоклов меч XXI века» как символ неотвратимой опасности. Эта опасность состоит в нарушении симпатических нервных путей, проходящих в позвоночнике и выходящих через межпозвоночные отверстия в каждом сегменте позвоночника. Из медицинской практики известно, что травматические повреждения позвоночника приводят к развитию заболеваний ЖКТ [7], а болевые синдромы в спине связаны с вертебрально-кардиальными синдромами [4].

Современный уровень диагностики с помощью КТ и МРТ позволяет нам обнаруживать патофизиологические факторы до того, как они перерастают в хронические заболевания [8]. А разрабатываемая нами в течение 25 лет система оздоровления позволяет устранять эти патофизиологические нарушения [11]. Мы развиваем концепцию преждевременного старения человека. Согласно этой концепции, человек может жить без хронических заболеваний до возраста 90 лет, с которого и должно начинаться настоящее старение организма – плавное снижение активности физиологических и регенеративных механизмов. Наши двадцатипятилетние исследования показали, что физиологические процессы, приводящие к преждевременному старению, непосредственно связаны с остеохондрозом позвоночника.

**Цель работы:** 1. Изучить состояние тканей позвоночника с помощью МРТ для выявления аномалий тканевых структур, приводящих к возникновению болевых

синдромов позвоночника и развитию остеохондроза позвоночника. 2. Изучить связь хронических заболеваний, сокращающих продолжительность жизни человека, с остеохондрозом позвоночника.

### Результаты

#### 1. Исследование причин остеохондроза позвоночника

Проведено комплексное обследование состояния мышечного корсета позвоночника: 30 МРТ позвоночника и 100 мануальных обследований позвоночника методом пальпации, с измерением подвижности сегментов позвоночника при функциональных пробах.

Состояние мышечного корсета позвоночника исследовано у 70 человек в возрасте от 6 до 80 лет, проходивших реабилитацию в рамках Школ Здоровья. Статистические данные по изучению закономерностей развития остеохондроза с помощью МРТ получены по результатам обследования 600 амбулаторных больных.

Анализировали распространение вдоль позвоночника и протяженность зон дистрофических изменений межпозвонковых дисков (изменение качества, плотности и толщины дисков, грыжи дисков, тела позвонков, наличие разрастаний или изменение формы позвонков), грыжа Шморля, гемангиомы, компрессионные переломы).

По результатам анализа построены диаграммы частот проявления всех видов дистрофических изменений для каждого сегмента позвоночника. Анализ дистрофических проявлений по данным МРТ проведен для трех отделов позвоночника: поясничный (n = 141), грудной (n = 294) и шейный (n = 165) для четырех возрастных групп: 13 - 21 год, 22 года - 35 лет, 36 - 50 лет, старше 50 лет (рис 1)

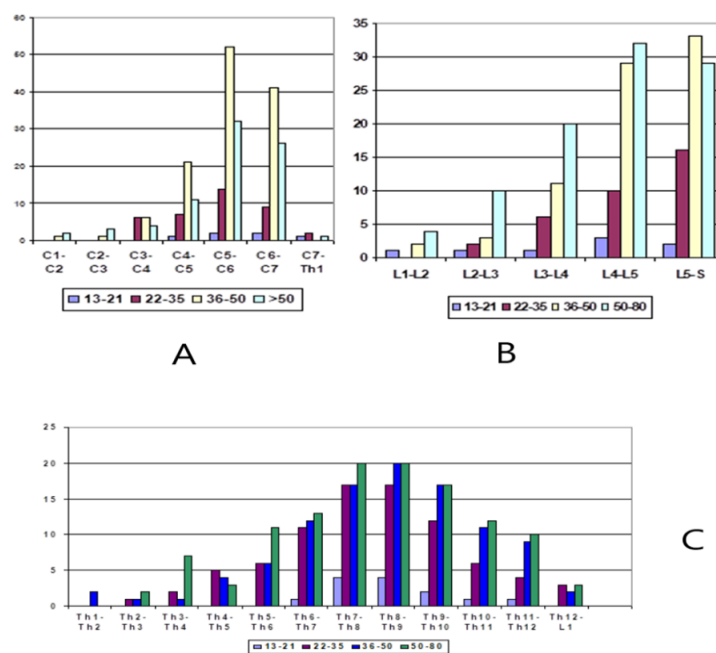


Рис. 1. Графики частоты проявления дистрофических проявлений в шейном (А), поясничном (В) и грудном (С) позвоночнике для 4 возрастных групп.

Установлены общие закономерности развития дистрофических изменений позвоночника. Сравнение диаграмм для каждой из возрастных групп показало, что максимальное количество дистрофических проявлений во всех возрастных группах локализуется на следующих участках позвоночника: в шейном отделе на С4, С5 позвонках, в грудном отделе позвоночника на Th7, Th8 позвонках, в поясничном отделе позвоночника L4, L5. Закономерности распределения дистрофических проявлений совпадают по всем возрастным группам. Дистрофические процессы в позвоночнике начинают развиваться уже в подростковом возрасте и нарастают на протяжении всей жизни.

Изучая состояние позвоночника у больных с болями в позвоночнике при МРТ-

#### Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

обследовании подростков, мы обнаруживаем изменения в картине интенсивности реакции межпозвонковых мышц в болезненных зонах.

Вот три типичных примера обследования позвоночника при болях в спине. Во-первых, рассмотрим изображение МРТ нашей 17-летней пациентки. Она три года страдала от болей в спине в грудном отделе (рис. 2).

В зоне болевого синдрома 6-9 грудных позвонков обнаруживается изменение интенсивности рисунка мышц позвоночника в сторону потемнения, а также истончение подкожно-жировой клетчатки. Дистрофические изменения в межпозвонковых дисках находятся в начальной стадии. Тесты функциональной подвижности сегментов позвоночника показывают, что грудной отдел позвоночника заблокирован (рис. 3).

Боковые изгибы позвоночных сегментов по отношению к соседним сегментам менее 1 градуса, при этом отмечается гипермобильность грудопоясничного перехода, достигающая 12 градусов (рис. 4). Зона гипермобильности охватывает область 4 позвоночных сегментов и компенсирует неподвижность верхне- и среднегрудных отделов.



Рис. 2. МРТ грудного отдела позвоночника 17-летней девушки с болью в среднегрудном отделе позвоночника. Темный тон изображений соответствует жидкости без жировых компонентов, а яркий белый тон соответствует жирам без белковых компонентов.





Рис. 3. Тесты на подвижность сегментов позвоночника у девушки 17 лет с болью в среднегрудном отделе позвоночника.

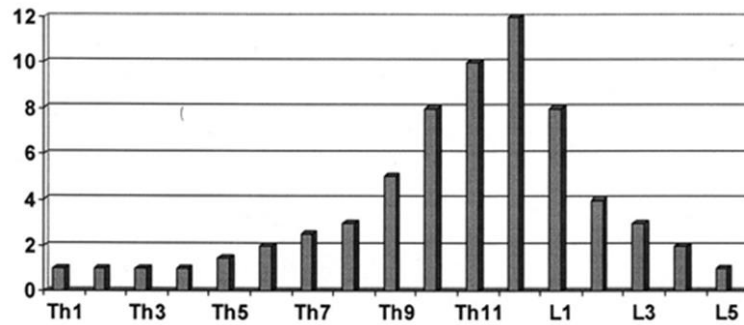


Рис. 4. Диаграмма подвижности грудного отдела позвоночника девушки 17 лет.

Рассмотрим второй пример.

В области болевого синдрома у юноши 23 лет в среднегрудном отделе позвоночника обнаружена начальная стадия остеохондроза позвоночника - три межпозвонковых диска с уменьшенной толщиной и исчезновением пульпозного ядра в области 4—6 и 8—9 грудных позвонков (рис. 5).



Рис. 5. МРТ грудного отдела позвоночника мужчины 23 лет с болью в среднегрудном отделе позвоночника.

Рассмотрим третий пример. Пациент 60-ти лет обратился с жалобами на боли в пояснице. При МРТ-обследовании выявлены множественные дистрофические изменения позвоночника (рис. 6). При осмотре внимание врачей привлекают 6 дисков измененного строения (без светлого пульпозного ядра) и уменьшенной толщины диска.

Это три диска между 9-м и 12-м грудными позвонками и три диска между 3-м поясничным позвонком и крестцом. Поверхности позвонков, прилегающие к дискам (гиалиновые пластинки), имеют значительные неровности, обусловленные дистрофическими процессами в телах позвонков. Диски между 12-м грудным позвонком и первым поясничным, а также между первым и вторым, вторым и третьим поясничными позвонками имеют нормальную толщину и имеют пульпозное ядро (светлое образование в середине диска). Между 11-м и 12-м грудным позвонком имеется грыжа диска - выпячивание диска в позвоночный канал, внутри которого проходит спинной мозг.



Рис. 6. МРТ поясничного отдела позвоночника пациента 60 лет.

Это изображение может служить полезным обучающим примером для неврологов и терапевтов, так как содержит все основные временные этапы развития дистрофических процессов в позвоночнике.

Формулировка медицинского диагноза: остеохондроз грудного отдела позвоночника на уровне 9-12 грудных позвонков, протрузии дисков на уровне 10-11 грудных позвонков и 4-5 поясничных позвонков, грыжа диска на уровне 11-12 грудных позвонков, остеохондроз поясничной области третьего поясничного позвонка - крестца, смещение 5-го поясничного позвонка относительно крестца.

В области 12-го грудного - 4-го поясничного позвонков мышцы спины темного тона без белых жировых прослоек. Интенсивность мышечного изображения сильно снижается. Это область болевого синдрома, в которой имеются 3 нормальных межпозвоноковых диска с пульпозными ядрами. В этой зоне остеохондроз отсутствует, но имеются межпозвоночные мышцы с тёмной структурой и без жировых прослоек. Это признак содержания большого количества воды непосредственно в мышечной ткани, что является следствием воспалительного процесса, отёка или интенсивной работы. Это область хронического мышечного спазма.

Выше и ниже этой области находятся мышцы с белыми полосами. Это жировые прослойки между пучками мышечных волокон. Их наличие является признаком пассивности этих мышц и потери их сократительной способности. Парадоксально, но состояние мышц позвоночника всегда находится вне поля зрения врачей.

Наши многолетние наблюдения показывают, что спастические состояния мышц позвоночника вызваны избыточным потреблением продуктов, содержащих крахмал и сахар при недостатке витамина В1 – тиамина, отвечающего за усвоение углеводов. Это вариант болезни «бери-бери» - полиневрита. Эпидемия болезни «бери-бери» разразилась в юго-восточной Азии в конце XIX века и уносила ежегодно сотни тысяч жизней. Эпидемия была вызвана употреблением в пищу очищенного от оболочки риса, содержащего 95% крахмала. Главный врач голландских тюремных больниц на острове Ява Кристиан Эйкман обнаружил, что употребление коричневого риса с оболочкой и



шелухой приводит к выздоровлению от заболевания. Эйкман задался вопросом: может ли очищенный и неочищенный рис играть роль в возникновении болезни «бери-бери» у людей? Выяснилось, что у заключенных, получавших белый очищенный рис, заболеваемость была в 300 раз выше, чем у тех, кто использовал для приготовления пищи нешлифованный рис.

Вернувшись в Голландию в 1896 году, Эйкман написал отчет о своем опыте. В 1911 году работа Эйкмана случайно попала в руки молодого польского исследователя Казимира Функа. Функ выделил из рисовой шелухи вещество, препятствующее развитию этого заболевания. Это вещество, называемое сейчас тиамином или витамином В1, не содержится в очищенном рисе. Функ ввел для этих веществ термин «витамины» — от латинских слов «вита» (жизнь) и «амин» (азот). Однако первым человеком, кто сказал, что есть продукты, без которых невозможна жизнь, был Фредерик Хопкинс. В 1929 году Эйкман и Фредерик Хопкинс получили Нобелевскую премию за вклад в открытие витаминов.

После возвращения к питанию неочищенным рисом, в оболочке которого содержался витамин В1, эпидемия прекратилась. В Европе в отличие от юго-восточной Азии имеются продукты, содержащие витамин В1, а рис не является основным продуктом питания. Тем не менее болезнь «бери-бери» встречается и у нас в виде болей в суставах и позвоночнике.

**Вывод.** Локализация дистрофических изменений в позвонках и дисках - остеохондроза позвоночника не совпадает с локализацией болевого синдрома. Болевой синдром вызван хроническим спастическим состоянием мышц позвоночника.

## **2. Исследование связи хронических заболеваний ЖКТ с нарушениями симпатической иннервации органов пищеварения**

Нами было проведено 40 обследований состояния мышечного корсета позвоночника участников восстановительной группы: мануальная диагностика и измерение подвижности сегментов позвоночника при функциональных пробах на латерофлексию. Из 40 человек 29 имели хронические заболевания: неврологические синдромы в спине (12), хронический гастрит (8), язвенная болезнь желудка (4), язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки (1), нефрит (2), энтероколит (1), колит (1).

При обследовании обнаружено, что у всех обследованных лиц в позвоночнике имеются области с пониженной подвижностью или полной неподвижностью сегментов позвоночника. Анализ локализации заблокированных участков позвоночника у лиц, страдающих хроническими заболеваниями ЖКТ, включая язвенную болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, показал наличие у этих обследованных спастических состояний в межпозвонковых мышцах в области шестого – восьмого грудных позвонков Th6-Th8. Именно в этой области из позвоночника выходят симпатические нервы, иннервирующие желудок.

В рамках Школ Здоровья восстановительной гимнастикой для позвоночника занималось 40 человек. Мануальную терапию прошло 11 обследованных. Курсы мануальной терапии включали в себя 10 сеансов массажа мышц позвоночника по типу миофасциального релизинга для устранения имевшихся у пациентов нарушений в мышечном корсете позвоночника.

В данном исследовании с помощью восстановительных практик были исцелены все 11 человек, страдавших хроническим гастритом, и 3 - язвенной болезнью желудка, 1 - энтероколитом и 1 - колитом. На избавление от гастрита уходило 2 месяца, язвенной болезни желудка - 3 и более месяцев. Единственные случаи устранения многолетних заболеваний энтероколитом и колитом потребовали 3 и 9 месяцев соответственно. Эти лица впоследствии наблюдались и посещали курсы массажа мышечного корсета позвоночника в течение 13 и 14 лет, рецидивов заболеваний не было.

**Вывод:** Причина отдельных хронических заболеваний ЖКТ – нарушение симпатической иннервации органов вследствие многолетних спастических состояний межпозвонковых мышц.

### 3. Исследование состояния позвоночника при коронарографии пациентов с кардиологическими синдромами

Хронические формы вертебрально-кардиальных синдромов и их статистические закономерности мы изучали на основе анализа 60 коронарографических обследований, проведённых на ангиографической системе *Innova 2000* фирмы *GeneralElectric*.

Было исследовано состояние позвоночника у пациентов, направленных на обследование по коронарографии с симптомами стенокардии, ИБС и хронической сердечной недостаточности. Среди них были пациенты, особенностью которых было полное отсутствие поражений коронарных артерий, вызываемых атеросклерозом, и пациенты с умеренным поражением коронарных артерий, которое не могло вызвать существенное нарушение кровообращения в миокарде. Общим для двух этих групп обследованных является наличие сильных проявлений остеохондроза в области верхне-грудного отдела позвоночника *Th3-Th5*.

Было проанализировано состояние верхне-грудного отдела позвоночника у 60 пациентов, проходивших коронарографию с диагнозами стенокардия и ИБС. У 10 пациентов атеросклеротические образования и ишемия отсутствовали. В 18 случаях пациенты имели незначительные проявления атеросклероза, не нарушающие кровообращение в сердце и не требующие применения ангиопластики. В остальных случаях имелись серьёзные проявления атеросклероза. Во всех случаях с хорошим и в 18 случаях с удовлетворительным состоянием коронарных артерий пациенты имели сильные проявления остеохондроза позвоночника в области позвоночника *Th3-Th5* (рис. 7 – 9).

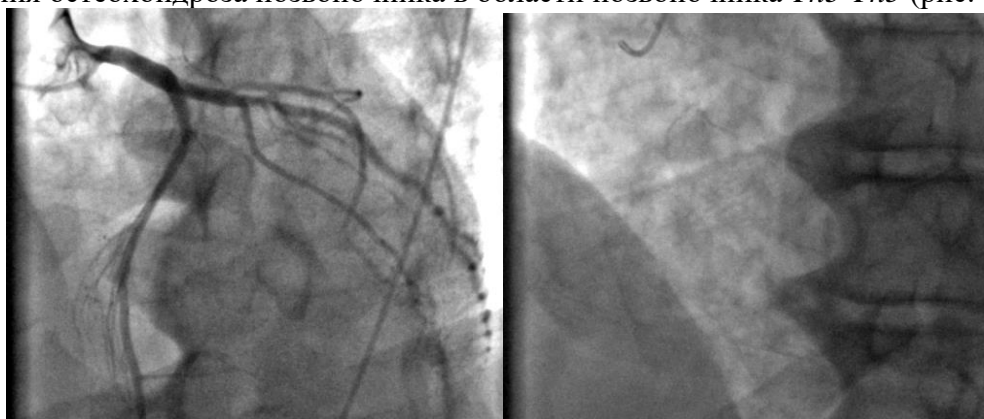


Рис. 7. Пациент Т.К. 1. Обследование коронарных артерий у пациента с показателями ИБС. Снимок слева: контрастное вещество в коронарной артерии. По заключению ангиохирургов атеросклероз отсутствует. Снимок справа: тот же участок сердца в отсутствии контраста в артериях. Форма позвонков сильно изменена. Видны значительные остеофиты в 3-м – 5-м грудных позвонках. Диагноз: остеохондроз позвоночника.

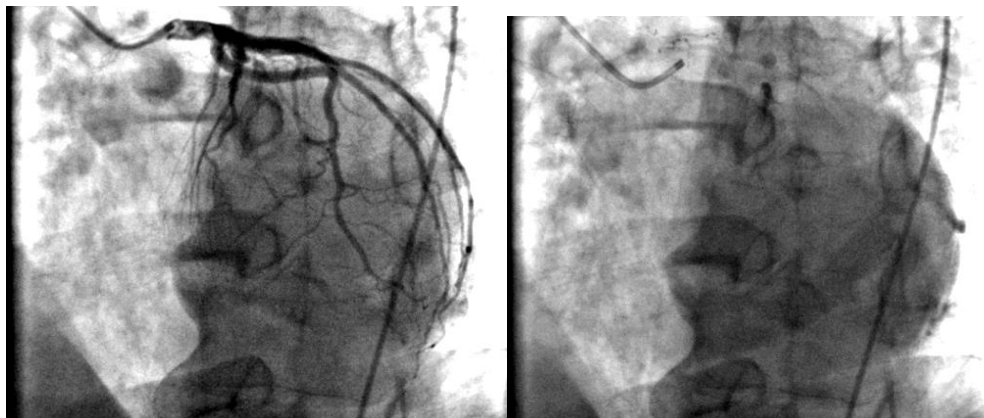
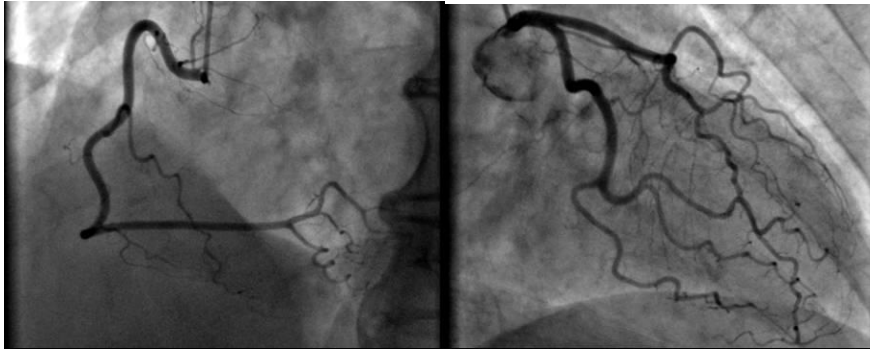


Рис. 8. Пациент Т.К. 2. Обследование коронарных артерий у другого пациента со стенокардией. Снимок слева: контрастное вещество в коронарной артерии. По заключению ангиохирургов атеросклероз отсутствует. Снимок справа: тот же участок сердца в отсутствии контраста в артериях. Форма позвонков сильно изменена. Видны значительные остеофиты в 3-м – 5-м грудных позвонках. Диагноз: остеохондроз позвоночника.



**Рис. 9.** Рентгенограмма правой коронарной артерии (снимок слева) и левой коронарной артерии (снимок справа) пациентки 46 лет с остеохондрозом верхнегрудного отдела позвоночника. На основании ЭКГ при нагрузочном тесте на беговой дорожке был поставлен диагноз ИБС. По заключению ангиохирургов атеросклероз отсутствует. На левом снимке видны проявления остеохондроза позвоночника – остеофиты, уменьшение диаметра позвонка в средней части и снижение толщины межпозвонковых дисков.

В рамках проведения реабилитационных мероприятий мы проводили наблюдения над участниками Школ Здоровья. В ходе реабилитационных практик была проведена мануальная терапия от 1 до 10 сеансов по устранению проблем с позвоночником для 10 пациентов со стенокардией (1), сердечной недостаточностью (3), желудочковой экстрасистолой (4), предсердной экстрасистолой (1), брадикардией (2), тахикардией (1). Мануальная терапия – массаж глубоких мышц позвоночника по типу миофасциального релизинга – полностью устраняли проявление перечисленных нарушений в работе сердца. Гимнастика полностью устраняла приступы стенокардии и предсердной экстрасистолы.

**Вывод** Наши исследования, наблюдения и практики реабилитации показывают, что до 30% кардиологических больных страдают вертебрально-кардиальными синдромами, которые в большинстве случаев поддаются реабилитационным мероприятиям.

### Обсуждение

Имеется ряд общеизвестных факторов, приводящих к хроническим заболеваниям, сокращающим продолжительность жизни человека:

Стрессы. Недостаток в питании незаменимых биологических компонентов: незаменимых аминокислот, микроэлементов и витаминов. Аутоинтоксикация. Смещение рН крови и тканевых жидкостей в сторону кислотности (снижение щелочного показателя крови - алкалоза). Эти факторы хорошо изучены и представлены в учебных материалах медицинских вузов. Но имеется ещё один фактор, который был изъят из медицинских курсов после разгрома «буржуазных» научных течений: генетики в 1948 году и раздела физиологии висцеральных систем – нервной трофики или трофической функции нервной системы в 1950 году.

Наши двадцатилетние исследования проблем с позвоночником доказывают, что нарушения нервной трофики проявляются не только в острых экспериментах на животных, что доказал А.Д. Сперанский со своей научной школой, но и в жизни каждого человека. Спастические состояния межпозвонковых мышц и вызванный ими остеохондроз позвоночника приводят к развитию нейродистрофических нарушений во внутренних органах. Спазмированные мышцы создают компрессию спинномозговых нервов, выходящих из позвоночника через межпозвонковые отверстия. В составе спинномозговых нервов имеются моторные и сенсорные нервы, нервные волокна которых – аксоны обёрнуты 40 слоями мембран, образованных Швановскими клетками, так называемые миелиновые оболочки. Эти нервные волокна передавить практически невозможно (по мнению патологоанатомов). Но в структуре спинномозговых нервов имеются также нервные волокна, принадлежащие симпатической нервной системе и иннервирующие внутренние органы. Симпатические нервы не имеют прочной миелиновой оболочки и подвержены компрессии. В состав нервов, иннервирующих сердце, имеются нервы,

иннервирующие синусный узел сердца. Синусный узел задаёт частоту сердечных сокращений. Компрессия синусного нерва вызывает брадикардию – снижения частоты сердечных сокращений до собственной частоты синусного центра 42 – 45 ударов в минуту. Другим симпатическим нервом является усиливающий нерв, открытый И.П. Павловыми – Ционом. Компрессия этого нерва приводит к снижению величины сердечного выброса, сердечной недостаточности и компенсаторной тахикардии при сохранении функций синусного нерва. Компрессии обоих этих нервов приводят к сердечной недостаточности при полностью здоровом сердце, т.е. здоровы миокард, коронарные артерии и клапаны. В своей практике мы встречались с двумя первыми состояниями и успешно их устраняли путём массажа, устраняющего спастические состояния межпозвонковых мышц. За 20 минут массажа мы устраняли брадикардию и тахикардию [9].

Разработанная нами в течение 25 лет система оздоровления позволяет устранять эти нейродистрофические нарушения. Один из участников наших экспериментов по устранению нарушений нервной трофики дожил здоровым до возраста 91 год и 8 месяцев. Этот эксперимент длился 17 лет и на протяжении этого срока у этого участника отсутствовали хронические заболевания, и он не пользовался услугами медиков за исключением оздоравливающих методов: гимнастики и массажа.

Подробно с научными основами предлагаемых практик и практическими занятиями можно ознакомиться на нашем научном сайте [www.healthsys.ru](http://www.healthsys.ru).

### **Выводы**

Остеохондроз позвоночника – это преждевременное старение костно-хрящевой ткани. Спастические состояния мышц позвоночника и остеохондроз позвоночника запускают цепь дистрофических процессов во внутренних органах, вызывая их преждевременное старение. Стратегия увеличения продолжительности здоровой и плодотворной жизни состоит в предотвращении спастических состояний в мышцах позвоночника, начиная с подросткового возраста на протяжении всей жизни.

### **Заключение**

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

1. Дистрофические проявления в тканях позвоночника являются не заболеванием, а необратимыми последствиями нарушения трофики, причиной которых являются спастические состояния межпозвонковых мышц, нарушающие кровообращение в позвонках.

2. Спастические состояния межпозвонковых мышц возникают уже в подростковом возрасте вследствие гиповитаминоза витамина В1 – тиамина и питания продуктами, содержащими крахмал и сахар в больших количествах.

3. Спастические состояния межпозвонковых мышц приводят к компрессии и нарушению проводимости симпатических нервов, иннервирующих внутренние органы, вызывая нарушение функций, нейродистрофические процессы и преждевременное старение внутренних органов.

### **Список литературы**

1. Ажипа Я.И. Трофическая функция нервной системы / Я.И. Ажипа. – М.: Наука, 1990.
2. Жарков П.Л. Актуальные вопросы мануальной терапии // Бюллетень №5. XIII-я конференция мануальных терапевтов. М. 2003. С. 97-98.
3. Жарков П.Л. Актуальные вопросы мануальной терапии // Бюллетень №7. XV-я конференция мануальных терапевтов. М. 2005. С. 132-134.
4. 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.
5. Мечников И.И. Этюды оптимизма / И.И. Мечников. – М. Наука, 1988. – 328 с.

6. Попелянский Я.Ю. *Болезни периферической нервной системы*. М. Медицина. 1989.
7. Послов М.П. *Изменения в некоторых внутренних органах при травмах спинного мозга: (Клин.-эксперим. исслед.)*. Ташкент, 1963. 120 с. (по Ажипа, 1990).
8. Черкасов А.Д. *Реальные пути увеличения продолжительности жизни человека. Издательские решения. По лицензии Ridero*. 2020. 515 с.
9. Черкасов А.Д. *Опыт наблюдения и устранения вертебрально-кардиальных синдромов в клинической практике и при занятиях физической культурой и спортом*. Ж. «Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований». №6. 2011 г. С. 104 – 107. Электронная конференция. Новые медицинские технологии. Актуальные вопросы науки и образования, 18-20 апреля 2011, Москва. 2011-03-02.
10. Brailsford J.F. *Lessons of the in vertebral disks. Some personal reflections*. Brit. Journ. Radiol., 1995. №28. P. 415 – 431.  
<http://healthsys.ru>.

**Сведения об авторах**

**Анатолий Данилович Черкасов**

*к.б.н., с.н.с.*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» ФГБНУ «НИИОПП

Москва, Россия

**E-mail:** [healthsys@mail.ru](mailto:healthsys@mail.ru)

**Елена Николаевна Петрова,**

*к.ф.-м.н. с.н.с.* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича

Российской академии наук (ИППИ РАН)

Москва, Россия

**E-mail:** [petrova@iipr.ru](mailto:petrova@iipr.ru)

**Information about authors**

**Anatoly Danilovich Cherkasov,**

*PhD*

*senior researcher*

*FGBNU«NIIOPP»*

*Moscow Russia*

**E-mail:** [healthsys@mail.ru](mailto:healthsys@mail.ru)

**Elena Nikolaevna Petrova,**

*senior researcher*

*PhD*

*FGBNU«NIIOPP»*

*Moscow Russia*

**E-mail:** [petrova@iipr.ru](mailto:petrova@iipr.ru)

УДК 577.126

ГРНТИ 76.03.31, 34.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.137-142

М. Л. Золотавина, Е. А. Гайдабура

КубГУ

**КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ В ОЦЕНКЕ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА У БОЛЬНЫХ ТЯЖЁЛОЙ СТЕПЕНЬЮ COVID 19**

Статья посвящена определению корреляционной связи между биохимическими показателями сыворотки крови больных COVID-19. Определены концентрации основных биохимических маркеров воспаления повреждения легочной ткани новой коронавирусной инфекцией с дальнейшим корреляционным анализом показателей крови. Эксперимент исследования показал, что между биохимическими показателями крови существует высокая корреляционная связь. Её значение помогает определить последовательность манифестации биохимических маркеров воспаления и доказывает предполагаемый нами механизм изменения биохимической картины крови при COVID-19.

**Ключевые слова:** С-реактивный белок, ферритин, интерлейкин-6, лактатдегидрогеназа, лактат, калий, COVID-19.

**CORRELATION ANALYSIS OF THE MAIN BIOCHEMICAL MARKERS OF INFLAMMATION IN COVID-19**

*The article is devoted to determining the correlation between the biochemical parameters of the blood serum of patients with COVID-19. Concentrations of the main biochemical markers of inflammation at different stages of lung tissue damage by a new coronavirus infection with further correlation analysis of blood parameters were determined. The experiment of the study showed that there is a high correlation between the biochemical parameters of blood. Its significance helps to determine the sequence of the manifestation of biochemical markers of inflammation and proves the mechanism of changes in the biochemical picture of blood in COVID-19, which we assume.*

**Keywords:** C-reactive protein, ferritin, interleukin-6, lactate dehydrogenase, lactate, potassium, COVID-19.

**Введение.**

Пандемия новой коронавирусной инфекции охватила многие страны, ухудшив эпидемиологическую обстановку мира и унеся немало жизней. По статистике COVID-19 часто становился причиной тяжелых осложнений, острого респираторного синдрома и в нередких случаях – летального исхода, в особенности у пациентов более взрослой возрастной категории, для которой являлось характерным наличие сопутствующих заболеваний [1, с.4-9]. Потому на данный момент крайне важной все ещё остается задача понимания механизма протекания заболевания для предотвращения и раннего прогнозирования тяжелой формы COVID-19.

Манифестация биохимических маркеров воспаления происходит, как правило, последовательно, в зависимости от стадий развития заболевания, оцениваемых нами по показаниям снимков компьютерной томографии [2, с.69-77]. Исследование биохимических показателей сыворотки крови больных является крайне важным для оценки рисков осложнений, а определение взаимосвязи биохимических маркеров воспаления позволила бы выявить особенности механизма заболевания и наличие корреляции показателей и их роль в развитии воспалительного процесса при новой коронавирусной инфекции.

В связи с этим нами была выбрана **цель работы** – определить последовательную зависимость появления и манифестации биохимических маркеров воспаления в крови больных при COVID-19.

**Материалы и методы.**

Исследовательская работа проводилась на базе ГБУЗ «НИИ-Краевая больница № 1 им. С.В. Очаповского» с использованием биохимических анализаторов и их реагентов американской фирмы Abbott, немецкой фирмы Siemens, а также испанской фирмы Wefen. Для исследования в качестве биологического материала применялась сыворотка крови больных COVID-19 от 45 до 68 лет с отсутствием сопутствующих заболеваний.

Всего было исследовано 488 сывороток крови больных с последующим определением концентраций таких биохимических маркеров воспаления как С-реактивный белок (СРБ), ферритин с применением метода турбидиметрии, интерлейкин 6 (ИЛ-6) – иммунохемилюминесцентного метода, лактат – колориметрического метода, калий – метода ион-селективного исследования; определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – УФ-кинетического метода. Больные находились в реанимационной отделении и имели подтвержденный методом ПЦР диагноз COVID-19. Статистическая обработка данных проводилась с применением пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2013».

**Полученные результаты.**

В результате исследования нами были определены концентрации в крови больных основных маркеров воспаления при COVID-19 на четвертом этапе течения заболевания. Тяжесть заболевания определялась по показаниям компьютерной томографии, где первой степени COVID-19 соответствовало поражение легочной паренхимы до 25 % (КТ-1), второй – до 50% (КТ-2), третьей – от 50 до 75% (КТ-3), и четвертой, самой тяжелой – превышающее 75% (КТ-4) [3, с.45-52].

После оценки изменения исследуемых биохимических показателей нами был проведен корреляционный анализ маркеров воспаления. Для работы использовался коэффициент корреляции Пирсона (таблица 1).

**Таблица 1 – Коэффициент корреляции биохимических показателей крови**

	Биохимические показатели крови														
	СРБ					Ферритин				ИЛ-6			ЛДГ		Лактат
	Ферритин	ИЛ-6	ЛДГ	Лактат	Калий	ИЛ-6	ЛДГ	Лактат	Калий	ЛДГ	Лактат	Калий	Лактат	Калий	Калий
Коэффициент корреляции, $r_{xy}$	-0,83	-0,66	-0,58	0,89	0,10	0,96	0,94	0,99	0,60	0,98	0,93	0,77	0,89	0,85	-0,52

Примечания: критерии по шкале Чеддока:

- 0.1 <  $r_{xy}$  < 0.3: слабая корреляционная связь показателей;
- 0.5 <  $r_{xy}$  < 0.7: заметная корреляционная связь показателей;
- 0.7 <  $r_{xy}$  < 0.9: высокая корреляционная связь показателей;
- 0.9 <  $r_{xy}$  < 1: весьма высокая корреляционная связь показателей;

(+/-) – прямая зависимость значений показателей/отрицательная зависимость.

Повышение концентрации ферритина в крови, свидетельствует о начале развития воспалительного процесса в организме при COVID-19, что подтвердилось в исследовании высокой корреляционной связью между уровнем ферритина и концентрацией ИЛ-6 ( $r=0,96$ ), концентрацией лактата ( $r=0,99$ ), а также с определением корреляционной зависимости с активностью ЛДГ ( $r= 0,94$ ). Высокая концентрация ферритина очевидно оказывала на клетки организма провоспалительный эффект, тем самым запуская механизмы иммунного ответа, схожие с аутоиммунным эффектом, и вызывая гибель клеток. Это проявлялось в появлении в крови больных с тяжелой формой течения новой коронавирусной инфекции высокой активности ЛДГ и повышении уровня лактата – показателей разрушения клеток паренхимы лёгких. Между показателями была отмечена прямая корреляционная связь. Обратная высокая корреляционная связь была отмечена между концентрацией ферритина и концентрацией СРБ ( $r=-0,83$ ), концентрация последнего из которых в терминальную фазу развития COVID-19 понижалась до значений превышающих референсные значения не более чем в два раза или находилась в пределах нормы, что возможно связано с особенностями появления в кровеносном русле СРБ – показатель обладающий свойствами как провоспалительными, так и противовоспалительными.

Корреляция между уровнем калия и уровнем ферритина оказалась несколько ниже и соответствовала  $r=0,6$ , имела обратную зависимость. Концентрация ферритина в сыворотке крови больных оказалась обратно пропорциональна уровню калия, который в свою очередь понижался, выходя за пределы нижней границы референсных значений. Можно предположить, что невысокая корреляционная связь могла указывать на косвенную взаимосвязь показателей и влияние сторонних факторов, таких как прием глюкокортикоидных гормональных препаратов, на понижение уровня калия в крови больных с поражением лёгких более 75% [4, с.38-43]. Описанные корреляционные связи свидетельствует о том, что изменение концентрации ферритина в крови очевидно являлось одним из основных «рычагов», запускающих изменение метаболических путей при

*COVID-19*. Таким образом, можно предположить, что уровень ферритина манифестировал раньше других и был предиктором начала тяжелой формы течения новой коронавирусной инфекции.

Другой биохимический маркер воспаления, имевшим высокую корреляционную зависимость с большинством показателей – ИЛ-6. Его концентрация имела наиболее высокие значения в терминальную стадию *COVID-19*, и в ходе исследования была обнаружена высокая корреляционная связь с ростом активности ЛДГ ( $r=0,98$ ) и концентрацией лактата ( $r=0,93$ ). Так как показатель ИЛ-6 может свидетельствовать о формировании «цитокинового шторма» и оказывать цитотоксическое действие, приводившее к пропорциональному росту активности клеточных ферментов в кровеносном русле – ЛДГ. Разрушение клеточных мембран может влиять на увеличение в сыворотке крови кислых продуктов обмена веществ – лактата [5, р.1-10].

Между концентрацией калия и уровнем ИЛ-6 в сыворотке крови была отмечена обратная корреляционная связь ( $r=-0,77$ ). Невысокие значения корреляционной связи могут свидетельствовать о совместной ответной реакции, однако, оказывающие друг на друга не прямое, а косвенное влияние через показатель-посредник, которым, с учетом полученных данных, являлся ферритин [6, р. 30082–30087; 7, с. 499-501]. Таким образом, стоит предположить, уровень СРБ изменялся неспецифично в начале воспалительного процесса, концентрация его понижалась при переходе заболевания в терминальную стадию, на фоне роста концентрации ферритина, имеющей высокую корреляционную связь с концентрацией ИЛ-6.

Высокая корреляционная связь отмечена между концентрацией ферритина с активностью ЛДГ ( $r=0,94$ ), между активностью ЛДГ и уровнем ИЛ-6 в сыворотке крови ( $r=0,98$ ), возможно следствием являлся рост концентрации лактата в сыворотке крови.

Коэффициент корреляции между концентрацией ферритина и концентрацией лактата составил ( $r=0,99$ ); а между концентрацией лактата и ЛДГ – ( $r=0,89$ ); между концентрацией лактата и концентрацией калия была обнаружена заметная отрицательная корреляционная связь.

Повышение уровня лактата в крови у больных *COVID-19* в терминальной стадии происходило на фоне понижения СРБ, о чем также свидетельствовал корреляционный коэффициент, указывающий на наличие между показателями высокой корреляционной связи, и имеющим отрицательное значение.

#### **Выводы.**

Исходя из полученных в ходе корреляционного анализа данных, следует отметить, что невысокий уровень корреляции и наличие отрицательной взаимосвязи между концентрацией СРБ и концентрацией ИЛ-6 ( $r=-0,66$ ) в крови больных свидетельствует о неспецифичном проявлении СРБ в процессе воспаления, постепенном понижении в терминальную стадию течения новой коронавирусной инфекции и манифестации его на более ранних этапах *COVID-19*.

Изменения концентрации ферритина имели высокие корреляционные связи с основными маркерами воспаления. Такие результаты указывают на значимость данного биохимического показателя в оценке развития нарушения метаболизма при *COVID-19* и возможном влиянии на метаболические пути, происходящие в клетке. Уровень ферритина, вероятнее всего манифестировал и появлялся в периферической крови больных одним из первых, демонстрируя включение провоспалительного действия в клетке, о чем свидетельствует высокий коэффициент корреляции между концентрацией ферритина и концентрацией ИЛ-6.

Уровни ИЛ-6 и ферритина имели высокую корреляционную связь с активностью ЛДГ ( $r=0,98$ ).

Между концентрацией ИЛ-6 и концентрациями других маркеров воспаления коэффициент корреляции был ниже, что возможно связано с образованием косвенной взаимосвязи, осуществляемой через посредника. Концентрация калия и концентрация лактата демонстрировали повышения в поздние сроки, позже остальных.



Высокая корреляционная связь по системе Чеддока была обнаружена между показателями уровня ферритина и ИЛ-6 ( $r=0,96$ ), между концентрациями ферритина и активностью ЛДГ ( $r=0,94$ ), между активностью ЛДГ и уровнем ИЛ-6 ( $r=0,98$ ). Высокий коэффициент корреляции был обнаружен при корреляционном анализе концентрации ферритина и концентрации лактата ( $r=0,99$ ).

Высокая корреляционная связь была выявлена между содержанием ферритином и концентрацией СРБ, концентрацией ИЛ-6 и содержанием калием, а также между активностью ЛДГ и концентрацией лактата.

При исследовании заметная корреляционная связь была обнаружена между уровнем СРБ и активностью ЛДГ и концентрациями СРБ и ИЛ-6.

Обратная взаимосвязь была обнаружена между показателями концентрации СРБ и остальными исследуемыми биомаркерами воспаления.

### **Заключение**

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

Во-первых, высокая корреляционная связь была обнаружена между концентрациями показателей ферритина и ИЛ-6. Их высокая корреляционная связь между собой и активностью ЛДГ свидетельствует о их скором появлении в кровеносном русле и важной роли в оценке развития воспалительного процесса при тяжелой форме *COVID-19*;

Во-вторых, обратная корреляционные связи между концентрациями СРБ, калия и других биохимических показателей имеются, однако имеют заметные и слабые значения, что свидетельствует о косвенном влиянии показателей друг на друга в оценке нарушения метаболизма клетки. Таким образом, определение концентрации калия и СРБ имеет значение, но несет неспецифический характер, позволяющий оценить общую биохимическую картину крови при тяжелой форме *COVID-19*.

### **Список литературы.**

1. Мареев Ю. В. Роль возраста, сопутствующих заболеваний и активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в проявлениях *COVID-19*. Эффекты ингибиторов АПФ и блокаторов ангиотензиновых рецепторов //Кардиология. 2020. №4. С.4-9.
2. Горбунов А. А., Сорокина Л. Е., Чегодарь Д. В. Кубышкин А.В., Фомочкина И.И. Диагностика *COVID-19*: Современное состояние проблемы и перспективы в отрасли //Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2020. №10 (2). С. 69-77.
3. Роколян З. П. Компьютерная томография в исследовании поражений лёгких при *COVID-19* //Вестник КазНМУ. 2013. №2(3). С.45-52.
4. Иванова В. В. Особенности биохимических изменений в клетках и плазме крови при *COVID-19* // Педиатрия. 2020. №9. С. 38-43.
5. Articles Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study //Lancet Infect Dis. 2020. No. 3099. P. 1-10. doi:10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
6. Mousavizadeh L. Genotype and phenotype of *COVID-19*: Their roles in pathogenesis // Journal of Microbiol. Immunol. Infect. 2020. No. 1182(20). P. 30082-30087.
7. Baig A.M. Neurological manifestations in *COVID-19* caused by SARS-CoV-2 //CNS Neurosci Ther. 2020. No.26(5): P.499-501. DOI: 10.1111/cns.13372.

#### **Сведения об авторах**

**Мария Леонидовна Золотавина**  
кандидат биологических наук, доц.  
КубГУ  
Краснодар, Россия  
**E-mail:** zolotavina\_m@mail.ru

#### **Information about authors**

**Maria Leonidovna Zolotavina**  
Professor  
Kuban State University  
Krasnodar, Russian  
**E-mail:** zolotavina\_m@mail.ru

*Елена Александровна Гайдабура*  
магистр биологических наук  
КубГУ  
Краснодар, Россия  
E-mail: alena.gajdabura@mail.ru

*Elena Aleksandrovna Gaidabura*  
master of Biology  
Kuban State University  
Krasnodar, Russian  
E-mail: alena.gajdabura@mail.ru

УДК 616.61: 616-005.1-08:547.458.88  
ГРНТИ 76.29.39, 31.21.23  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.142-145

Д. С. Бердыш, С.Г. Павленко, Е. Ю. Марченко  
НОЧУ ВО «Кубанский медицинский институт»  
ФБГОУ ВО «Кубанский государственный аграрный  
университет»

### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОСТАЗА РАНЫ ПОЧКИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПЕКТИНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

*В статье приведены данные о гемостатических свойствах яблочного и цитрусового пектинов на модели резаной раны нижнего полюса почки (паренхиматозное кровотечение). Время полного гемостаза при использовании пектинов равняется 10 секундам. Объем кровопотери не превышает 0,3 мг на один орган.*

**Ключевые слова:** пектины, резаная рана почки, стазы, фибрин, система, статистика, гемостаз.

D. S. Berdysh, S. G. Pavlenko, E. Marchenko  
Kuban Medical Institute  
Kuban State Agrarian University

### **COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF KIDNEY WOUND HEMOSTASIS WHEN USING PECTINS IN AN EXPERIMENT**

*The article presents data on the hemostatic properties of apple and citrus pectins on the model of an incised wound of the lower pole of the kidney (parenchymal bleeding). The time of complete hemostasis when using pectins is 10 seconds. The volume of blood loss does not exceed 0.3 mg per organ.*

**Keywords:** pectins, incised kidney wound, stasis, fibrin, system, statistics, hemostasis.

**Цель исследования:** Сравнить гемостатические свойства яблочного и цитрусового пектинов в эксперименте на резаной ране почки.

#### **Методы и материалы**

В исследовании использовано 60 крыс линии «Wistar». Все животным была проведена срединная лапаротомия с дальнейшей резекцией нижнего полюса левой и правой почки без захвата почечной лоханки. Рану наносили путем тангенциального отсечения края таким образом, чтобы ее длина составляла 0,3 см, а глубина – 0,2 см. После рассечения паренхимы почек развивалось капиллярно-паренхиматозное кровотечение. На область раны накладывали гемостатическое средство сопоставимых размеров: порошок яблочного и цитрусового пектина (партии № 3993-05 и № 4027-01). Далее проводилась визуальная временная оценка наступления абсолютного гемостаза. Длительность кровотечения регистрировали секундомером. Величину кровопотери измеряли по методу Е.М. Левитэ. Контролем служили животные с применением термокоагуляции. По окончании опытов животных выводили из эксперимента путем декапитации.

Перспективными способами остановки кровотечения на сегодняшний день является использование локальных гемостатиков, которые эффективно, быстро и с минимальной потерей крови вызвали стойкий гемостаз. Используются гемостатики на основе желатина, метилцеллюлозы, микрофибриллярный коллаген, крахмал

(аминопектин) и др. Имеются немногочисленные сведения об использовании пектина как гемостатика [1, с.14].

В последние годы вещества на основе биополимеров, таких как полисахариды и белки, активно изучаются в связи с перспективой их использования в биотехнологии, фармакологии и регенеративной медицине. Модификация материалов различной геометрии тонкими пленками позволяет изменять такие свойства их поверхности, как шероховатость, гидрофобность, проводимость, биосовместимость и др.

Пектины обладают широким спектром физиологической активности, проявляют гипохолестеринемические, энтеросорбционные, антибактериальные, противоопухолевые, противовоспалительные, гемостатические, антиадгезивные и др. свойства [2, с.72, 3, 4, 5].

Сравнительный анализ времени остановки кровотечения в условиях применения аппликационных кровоостанавливающих материалов – пектинов показал, что все средства, включенные в исследование, обладают гемостатическими свойствами (табл. 1). Статистически достоверными по отношению к контролю кровоостанавливающими свойствами ( $p < 0,05$ ) обладают все опытные образцы.

В эксперименте изучения кровоостанавливающих свойств пектинов, у них выявлен выраженный гемостатический эффект. Среднее время остановки кровотечения составляет  $10 \pm 0,1$  секунд, при этом объем кровопотери минимален ( $9,1 \pm 0,15$  мг).

Полученные данные были обработаны статистически с вычислением средних величин, определением равномерности распределения признака в выборочной совокупности. Достоверность различий оценивали по критериям Стьюдента, Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса (существенными считали отличия при  $p \leq 0,05$ ).

Таблица 1  
Время остановки кровотечения из правой и левой почки в условиях применения исследуемых образцов материалов ( $M \pm m$ )

Материалы	n	Время (С)				
		Почка левая	Почка правая	P*	P**	P***
Контроль	215	$6 \pm 0,1$	$7 \pm 0,1$	-	-	$p < 0,001$
Пектин яблочный	215	$10 \pm 0,1$	$11 \pm 0,1$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	
Пектин цитрусовый	215	$10 \pm 0,1$	$11 \pm 0,1$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	
Губка гемостатическая	15	$600 \pm 0,1$	$600 \pm 0,1$	$p < 0,05$	$p > 0,05$	

Примечание: 1)  $p^*$  – достоверность различий средних величин по отношению к контролю (использован критерий Стьюдента). 2)  $p^{**}$  – достоверность различий средних величин по отношению к термокоагуляции (использован критерий Манна-Уитни) 3)  $p^{***}$  – достоверность различий средних величин при комплексном сравнении (использован критерий Крускала-Уоллиса).

Данные величины кровопотери, полученные при остановке кровотечения из левой и правой почки в условиях применения аппликационных гемостатических материалов, представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, все исследуемые гемостатические материалы статистически достоверно по отношению к контролю уменьшают кровопотерю из раны левой и правой почки, при этом по отношению к контролю, паренхима почек не подвергается термическому шоку. Время наступления гемостаза при использовании гемостатической губки составила 10 минут ( $600 \text{ сек} \pm 0,1$ ), на каждую почку, что значительно отличается от пектинов и контроля.

Таблица 2. Масса кровопотери при остановке кровотечения из раны левой и правой почки ( $M \pm m$ )

Материалы	№п	Масса кровопотери (мг)				
		Левая почка	Правая почка	P*	P*	P***
Контроль	215	$1,3 \pm 0,15$	$1,4 \pm 0,15$	-	-	$p < 0,001$
Пектин яблочный	215	$1,6 \pm 0,15$	$1,5 \pm 0,15$	$p < 0,001$	$p > 0,05$	

Материалы	№п	Масса кровопотери (мг)				
		Левая почка	Правая почка	P*	P*	P***
Пектин цитрусовый	215	1,7±0,15	1,4±0,15	p<0,001	p>0,05	
Губка гемостатическая	15	9,2±0,15	9,2±0,15	p<0,001	p>0,05	

Примечание: 1) p\* – достоверность различий средних величин по отношению к контролю (использован критерий Стьюдента). 2) p\*\* – достоверность различий средних величин по отношению к термокоагуляции (использован критерий Манна-Уитни). 3) p\*\*\* – достоверность различий средних величин при комплексном сравнении (использован критерий Крускала-Уоллиса).

Минимальные показатели кровопотери отмечаются при изучении материалов с использованием термокоагуляции, но при этом наблюдается термическое повреждение ткани органа на 0,2 см в глубину от места воздействия термокоагуляции, разница между кровопотерей при термокоагуляции и использование пектинов незначительна и равна 0,3 мг на один орган. Достоверность по отношению к контрольной группе (p<0,001) и ГКГ (p<0,05). Губка гемостатическая на ране почки показала неудовлетворительные результаты, объем потери крови составил 9,2 мг на левую и правую почку, что в сумме составляет 18,4 мг на одно животное.

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

1. Гемостаз с использованием цитрусового и яблочного пектина незначительно уступает (0,3 мг на один орган) по отношению к термокоагуляции, но при этом не наблюдается термического повреждения паренхимы органа, что является весомым аргументом в использовании данного метода.

2. Отношение времени наступления коагуляции при использовании пектинов незначительно отличается от термокоагуляции, но при этом так же устраняет термическое повреждение. Применение гемостатической губки на ране почки нецелесообразно, так как время наступления гемостаза составляет 10 минут (600±0,1 секунд) и масса кровопотери составила 18,4 мг на одно животное, что значительно различается с пектином и термокоагуляцией.

3. Реабилитационный период животных проходил благоприятно, у обеих опытных групп, нарушения в диурезе отсутствовали. При этом у контрольной группы в первые 72 часа после проведения операции наблюдались признаки снижения суточного диуреза, в первые 24 часа, снижен в 2 раза, при этом в опытных группах такого не наблюдалось.

### Список литературы

1. Фаустов Л.А., Павленко С.Г., Донченко Л.В. Пектин как корректор восстановительных процессов при хирургической патологии / Краснодар, 2015.-195с.
2. Хотимченко Ю.С., Ермак И.М., Бедняк А.Е. // Вестник ДВО РАН. 2005. № 1. С. 72.
3. Gessica Giusto, Cristina Vercelli, Selina Iussich, Andrea Audisio, Emanuela Morello, Rosangela Odore, Marco Gandini / A pectin-honey hydrogel prevents postoperative intraperitoneal adhesions in a rat model // BMC Vet Res. 2017 Feb 17;13(1):55. doi: 10.1186/s12917-017-0965-z.
4. Mariana N Coelho, Paulo A G Soares, Flávia S Frattani, Luiza M M Camargo, Ana M F Tovar, Paula F de Aguiar, Russolina B Zingali, Paulo A S Mourão, Sônia S Costa / Polysaccharide composition of an anticoagulant fraction from the aqueous extract of *Marsypianthes chamaedrys* (Lamiaceae) // Int J Biol Macromol. 2020 Feb 15;145:668-681. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.176. Epub 2019 Dec 26. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.176.
5. Yifan Zheng, Aidan F Pierce, Willi L Wagner, Hassan A Khalil, Zi Chen, Andrew B Servais, Maximilian Ackermann, Steven J Mentzer / Functional Adhesion of Pectin Biopolymers to the Lung Visceral Pleura // Polymers (Basel). 2021 Sep 2;13(17):2976. doi: 10.3390/polym13172976.

**Сведения об авторах**

**Денис Сергеевич Бердыш**

аспирант кафедры хирургических болезней  
НОЧУ ВО «Кубанский медицинский институт»  
Россия

Email: drberdysh@bk.ru

**Сергей Георгиевич Павленко**

д.м.н., профессор  
Заведующий кафедры хирургических болезней  
НОЧУ ВО «Кубанский медицинский институт»  
Россия

Email: drpaulson@mail.ru

**Евгений Юрьевич Марченко**

к.вет.н. ассистент кафедры ветеринарной фармакологии с токсикологией  
ФБГОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет»  
Россия

Email: kbgv@list.ru

**Information about authors**

**Berdysh Denis Sergeevich**

Postgraduate student of the Department of Surgical Diseases at the Kuban Medical Institute  
Russia

Email: drberdysh@bk.ru

**Sergey Georgievich Pavlenko:**

MD, Professor.  
Head of the Department of Surgical Diseases at the Kuban Medical Institute.  
Russia

Email: drpaulson@mail.ru

**Evgeny Marchenko**

Candidate of Veterinary Sciences,  
Assistant of the Department of Veterinary Pharmacology with Toxicology,  
Kuban State Agrarian University  
Russia

Email: kbgv@list.ru

УДК 611.018:611.453  
ГРНТИ 76.03.35, 76.29.37  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.145-150

<sup>1</sup>В.В. Яглов, <sup>1</sup>С.В. Назимова, <sup>1,2</sup>Е.С. Цомартова,  
<sup>Т. А. Ломановская</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского»

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

**СИНТЕЗ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАФИК В-КАТЕНИНА В КЛЕТКАХ В ПРОЦЕССЕ РОСТА КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ**

*В статье представлены данные о схожести процессов синтеза и трафика  $\beta$ -катенина в клетках клубочковой, пучковой и сетчатой зон коркового вещества надпочечников крыс в процессе роста органа. К моменту завершения роста коркового вещества внутриклеточный трафик  $\beta$ -катенина в ядро поддерживался за счет уменьшения его включения в наружные цитоплазматические мембраны, что свидетельствует о снижении его синтеза в клетках.*

**Ключевые слова:**  $\beta$ -катенин, корковое вещество, надпочечник, развитие, Wnt-сигналинг.

<sup>1</sup>V.V. Yaglov, <sup>1</sup>S.V. Nazimova, <sup>1,2</sup>E. S. Tsomartova,  
<sup>Т. А. Lomanovskaya</sup>

<sup>1</sup>FSBSI "Petrovsky NRCS"

<sup>2</sup>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)

**SYNTHESIS AND INTRACELLULAR TRAFFIC OF  $\beta$ -CATENIN DURING GROWTH OF THE ADRENAL COTREX**

*The article presents data on the similarity of synthesis and traffic of  $\beta$ -catenin in the cells of zona glomerulosa, fasciculata and reticularis of the rat adrenal cortex during growth of the organ. After termination of the growth, the intracellular traffic of  $\beta$ -catenin into the nucleus was maintained due to a decrease in the incorporation of  $\beta$ -catenin into the outer cytoplasmic*

*membranes, which indicates a decrease in its synthesis.*

**Keywords:**  *$\beta$ -catenin, cortex, adrenal gland, development, Wnt signaling.*

### **Введение**

$\beta$ -катенин – эволюционно древний белок, играющий важную роль в развитии тканей и органов [1, 2]. Он выполняет структурную и сигнальную функции, поскольку входит в состав плотных контактов и является эффектором канонического *Wnt*/ $\beta$ -катенин-сигналинга. При проникновении в ядро клеток,  $\beta$ -катенин инициирует транскрипцию *Wnt*-специфических генов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток [3, 4, 5]. Нарушения экспрессии  $\beta$ -катенина и внутриклеточного трафика наблюдаются у многих злокачественно трансформированных клеток [6, 7, 8].

Канонический *Wnt*/ $\beta$ -катенин-сигналинг является основным регулятором формирования зональности в корковом веществе надпочечников и развития клубочковой зоны. Его подавление приводит не только к нарушению развития, но и функциональной незрелости клеток клубочковой зоны, так как он индуцирует экспрессию рецепторов ангиотензина II [9]. Однако его роль в формировании и развитии пучковой и сетчатой зон практически не изучена.

**Цель работы** – изучение показателей синтеза и внутриклеточного распределения  $\beta$ -катенина в структурно-функциональных зонах коркового вещества надпочечников в процессе роста органа.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования были самцы крыс Вистар в возрасте 1,5 месяцев, соответствующих пубертатному периоду и периоду активного роста коркового вещества и 2,5 месяцев, соответствующих половой зрелости и завершению роста надпочечников [10]. Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов надпочечников. Изучение экспрессии  $\beta$ -катенина в кортикостероцитах клубочковой, пучковой и сетчатой зон проводили методом иммуногистохимии с помощью поликлональных кроличьих антител («*Abcam*» США). Изучение пролиферации кортикостероцитов проводили методом иммуногистохимии с помощью антител к *Ki-67* («*Cell Marque*», США). Реакцию визуализировали с помощью набора реактивов «*UltraVision LP Detection System*» («*ThermoScientific*», США). Подсчитывали процент клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализацией  $\beta$ -катенина. Выраженность активации канонического *Wnt*-сигналинга определяли по проценту кортикостероцитов с транслоцированным в ядро  $\beta$ -катенином [3, 9]. Статистическую обработку данных производили с помощью программы *Statistica 7.0* («*Statsoft Inc.*», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ( $M \pm m$ ). Сравнение независимых групп проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и  $\chi^2$ . Статистически значимыми различия считались при  $p < 0,05$ .

### **Полученные результаты**

В возрасте 1,5 месяцев в корковом веществе надпочечников крыс клубочковая, промежуточная, пучковая и сетчатая зоны были четко выражены. Наибольшими размерами характеризовались пучковая и сетчатая зоны (рис. 1). К моменту завершения роста надпочечников структура коркового вещества изменилась. Клубочковая зона уменьшилась в размерах, как абсолютных, так и относительных, что типично для данного вида животных [11]. Пучковая зона увеличилась в размерах и составила почти две трети корковой зоны. Сетчатая зона уменьшилась в размерах и ее представительство в корковом веществе сократилось. Изменения размеров промежуточной зоны были незначительными (рис. 1).

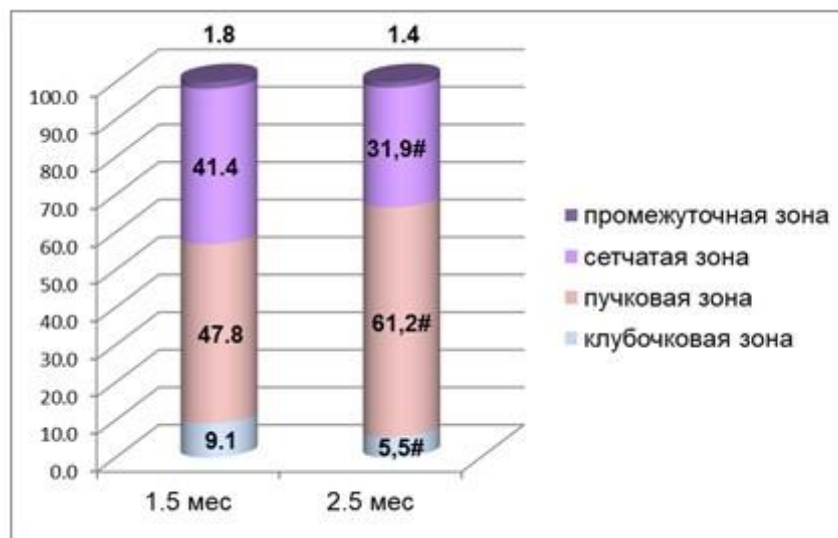


Рис. 1. Структура коркового вещества надпочечников крыс в возрасте 1,5 и 2,5 месяцев.  
Примечания: # – статистически значимые отличия от предыдущего срока исследования.

Иммуногистохимическое выявление  $\beta$ -катенина в кортикостероцитах показало, что этот белок встречался и в клетках клубочковой, и пучковой и сетчатой зон. И только в промежуточной зоне его экспрессия не выявлялась.

В возрасте 1,5 месяцев в клубочковой зоне наблюдалось большое количество клеток, содержащих  $\beta$ -катенин (рис. 2а). Он выявлялся и в структуре наружных цитоплазматических мембран, и в цитоплазме, и в ядрах. Наиболее распространенной была мембранная локализация, она встречалась в 75% случаев. На втором месте по распространенности в клубочковой зоне была ядерная локализация (почти 25% случаев). В цитоплазме  $\beta$ -катенин встречался редко. После завершения роста надпочечников процент  $\beta$ -катенин-позитивных клеток уменьшился вдвое. Причем уменьшение произошло за счет трехкратного снижения численности клеток с мембранной локализацией (рис. 2). Процент клеток с цитоплазматической и ядерной локализацией не изменялся. Таким образом, после завершения роста надпочечников в клубочковой зоне пул  $\beta$ -катенин-позитивных клеток состоял на 50% из клеток с мембранной и на 50% с ядерной локализацией белка.

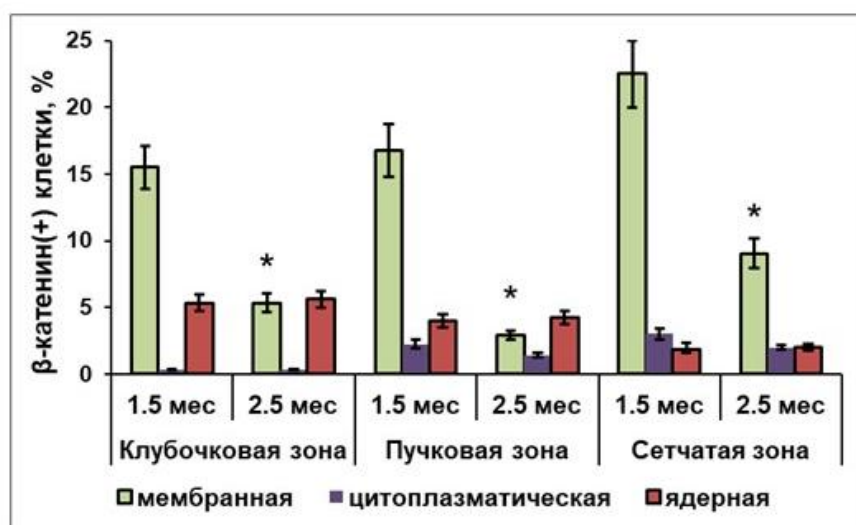


Рис. 2. Численность  $\beta$ -катенин-позитивных клеток с различной локализацией белка в структурно-функциональных зонах коркового вещества надпочечников крыс в различные возрастные периоды, (M $\pm$ m).  
Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с возрастом 1,5 мес.

В пучковой зоне коркового вещества также выявлялись  $\beta$ -катенин-позитивные клетки. В возрасте 1,5 месяцев их общая численность была такой же как в клубочковой



зоне. Выявлялись все три внутриклеточные локализации  $\beta$ -катенина. Их соотношение было близким к значениям клубочковой зоны. Особенностью пучковой зоны было более высокое содержание среди  $\beta$ -катенин-позитивных клеток клеток с цитоплазматической локализацией (10%) и меньшее – с ядерной локализацией (17%) белка. К моменту завершения роста надпочечников процент клеток с мембранной локализацией  $\beta$ -катенина уменьшился в четыре раза, а с цитоплазматической и ядерной не изменялся (рис. 2). В результате 50%  $\beta$ -катенин-позитивных клеток составляли клетки с ядерной локализацией.

В сетчатой зоне обнаруживалось наибольшее количество  $\beta$ -катенин-позитивных клеток, особенно с мембранной локализацией белка, составлявших более 80% в 1,5-месячном возрасте. К 2,5 месяцам их численность уменьшилась, более чем в два раза. Таким образом, среди  $\beta$ -катенин-позитивных клеток 70% составляли клетки с мембранной локализацией, а с ядерной и цитоплазматической – только 30% (рис. 2).

Полученные данные показывают, что все три зоны коркового вещества имеют одинаковый паттерн внутриклеточного распределения  $\beta$ -катенина и одинаковые особенности динамики показателей в процессе роста. Важно подчеркнуть, что развитие и функционирование зон в корковом веществе имеет свои особенности. Клубочковая зона уменьшает свои размеры, пучковая, наоборот, увеличивает, при пожизненном сохранении их функции. Сетчатая зона, напротив, после пубертатного периода, который заканчивается к 2-х месячному возрасту, утрачивает свое функциональное значение как продуцента половых гормонов и подвергается морфологическому регрессу. Но, тем не менее, в ней сохраняется высокое содержание клеток с  $\beta$ -катенином в составе мембран, а внутриклеточный трафик  $\beta$ -катенина в ядро резко снижается, в результате чего после наступления половой зрелости и завершения роста надпочечника в ней наблюдается минимальное число клеток с транслокацией  $\beta$ -катенина в ядро, то есть с активацией канонического *Wnt*-сигналинга. В наших предыдущих исследованиях мы установили, что задержка в развитии сетчатой зоны при воздействии на организм эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана сопровождается снижением транслокации  $\beta$ -катенина в ядра ее клеток [12]. Аналогичные изменения наблюдались и в клубочковой зоне [13, 14]. Эти данные свидетельствуют о роли канонического *Wnt*-сигналинга в развитии и функционировании клубочковой и сетчатой зоны. В пучковой зоне, наоборот, снижение трафика сопровождало активный рост зоны.

### Выводы

В процессе развития коркового вещества надпочечников в кортикостероцитах клубочковой, пучковой и сетчатой зон наблюдалось одинаковое распределение клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализацией  $\beta$ -катенина. К моменту завершения роста коркового вещества размеры клубочковой и сетчатой зон уменьшились, а пучковой увеличились. Синтез  $\beta$ -катенина во всех зонах снижался, но его внутриклеточный трафик в ядро поддерживался на постоянном уровне за счет уменьшения включения  $\beta$ -катенина в состав плотных контактов на наружных мембранах. Одинаковый уровень активации канонического *Wnt*-сигналинга при разнонаправленных морфологических изменениях свидетельствует о различной роли этого пути в развитии и поддержании структурно-функциональных зон в корковом веществе надпочечников.

### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: в корковом веществе надпочечников в процессе роста происходит снижение синтеза  $\beta$ -катенина, но его внутриклеточный трафик в ядро поддерживается на постоянном уровне, независимо от морфологических изменений структурно-функциональных зон.

### Список литературы

1. Kusserow A., Pang K., Sturm C., Hroudá M., Lentfer J., Schmidt H.A., Technau U., von Haeseler A., Hobmayer B., Martindale M.Q., Holstein T.W. *Unexpected complexity of the*



- Wnt gene family in a sea anemone // Nature. 2005. V. 433. P. 156–160.*
2. Lapebie P., Gazave E., Ereskovsky A., Derelle R., Bezac C., Renard E., Houliston E., Borchiellini C. *WNT/beta-catenin signalling and epithelial patterning in the homoscleromorph sponge Oscarella // PLoS One. 2009. V. 4. e5823.*
  3. Valenta T., Hausmann G., Basler K. *The many faces and functions of  $\beta$ -catenin // EMBO J. 2012. No. 31(12). P. 2714–2736.*
  4. Meng W., Takeichi M. *Adherens junction: molecular architecture and regulation // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009. No: 1(6). a002899.*
  5. van der Wal T., van Amerongen R. *Walking the tight wire between cell adhesion and WNT signalling: a balancing act for  $\beta$ -catenin // Open Biol. 2020 No: 10(12). 200267.*
  6. Tao J., Calvisi D.F., Ranganathan S., Cigliano A., Zhou L., Singh S., Jiang L., Fan B., Terracciano L., Armeanu-Ebinger S., Ribback S., Dombrowski F., Evert M. *Activation of beta-catenin and Yap1 in human hepatoblastoma and induction of hepatocarcinogenesis in mice // Gastroenterology. 2014. V. 147. P. 690–701.*
  7. Damsky W.E., Curley D.P., Santhanakrishnan M., Rosenbaum L.E., Platt J.T., Gould Rothberg B.E., Taketo M.M., Dankort D., Rimm D.L., McMahon M., Bosenberg M.  *$\beta$ -Catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas // Cancer Cell. 2011. V. 20. P. 741–754.*
  8. Gekas C., D'Altri T., Aligue R., Gonzalez J., Espinosa L., Bigas A.  *$\beta$ -Catenin is required for T-cell leukemia initiation and MYC transcription downstream of Notch1 // Leukemia. 2016. V. 30. P. 2002–2010.*
  9. Berthon A., Martinez A., Bertherat J., Val P. *Wnt/b-catenin signalling in adrenal physiology and tumor development // Mol. Cell. Endocrinol. 2012. Vol. 351. P. 87-95.*
  10. Pignatelli D., Xiao F., Gouvtia A., Ferreira J., Vinson G. *Adrenarche in the rat // J. Endocrinol. 2006. V. 191. P. 301–308.*
  11. Pignatelli D., Pinto P., Magalhaes M.M., Magalhaes M.C. *The development of the adrenal gland zona glomerulosa in the rat. A morphological, immunohistochemical and biochemical study // Mol. Cell. Endocrinol. 1998. V. 140. P. 163–168.*
  12. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Цомартова Д.А. *Воздействие низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) нарушает транскрипционную регуляцию развития сетчатой зоны надпочечников у самцов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 170. № 11. С. 651-655.*
  13. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Назимова С.В. *Роль канонического Wnt-сигналинга в морфогенезе и регенерации коркового вещества надпочечников крыс, подвергшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза // Известия РАН. Серия биологическая. 2019. №1. С.81–89.*
  14. Цомартова Д.А., Яглова Н.В., Яглов В.В. *Изменения активации канонического  $\beta$ -катенин/Wnt-сигналинга в корковом веществе надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана в пренатальном и постнатальном периоде онтогенеза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 164. № 10. С. 495-499.*

**Сведения об авторах**

**Валентин Васильевич Яглов,**  
 д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы  
 ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского»  
 Москва, Россия  
**E-mail:** vyaglov@mail.ru

**Information about authors**

**Valentin Vasilyevich Yaglov,**  
 D.Med.Sc., Professor,  
 Principal Research Worker,  
 FSBSI "Petrovsky NRCS",  
 Moscow Russian,  
**E-mail:** vyaglov@mail.ru

**Светлана Владимировна Назимова,**  
к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории разви-  
тия эндокринной системы  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад.  
Б.В. Петровского»  
Москва, Россия

**E-mail:** [pimka60@list.ru](mailto:pimka60@list.ru)

**Элина Сослановна Цомартова**  
младший научный сотрудник лаборатории развития эн-  
докринной системы, старший преподаватель кафедры  
гистологии, цитологии и эмбриологии  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад.  
Б.В. Петровского»

старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии  
и эмбриологии

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

Москва, Россия

**E-mail:** [tselso@yandex.ru](mailto:tselso@yandex.ru)

**Ломановская Татьяна Александровна,**  
старший преподаватель кафедры гистологии,  
цитологии и эмбриологии  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава  
России (Сеченовский Университет)

Москва, Россия

**E-mail:** [tatiana\\_80\\_80@inbox.ru](mailto:tatiana_80_80@inbox.ru)

**Svetlana Vladimirovna Nazimova,**  
PhD, Senior Researcher,  
FSBSI "Petrovsky NRCS",  
Moscow Russian,  
**E-mail:** [pimka60@list.ru](mailto:pimka60@list.ru)

**Elina Soslanovna Tsomartova,**  
PhD, Junior Researcher,  
FSBSI "Petrovsky NRCS",  
Moscow Russian;  
Senior lecturer,  
Federal State Autonomous Educational Insti-  
tution of Higher Education I.M. Sechenov  
First Moscow State Medical University of the  
Ministry of Health of the Russian Federation  
(Sechenov University),  
Moscow Russian  
**E-mail:** [tselso@yandex.ru](mailto:tselso@yandex.ru)  
**Tatiana Alexandrovna Lomanovskaya,**  
Senior Lecturer,  
Federal State Autonomous Educational Institu-  
tion of Higher Education I.M. Sechenov First  
Moscow State Medical University of the Ministry  
of Health of the Russian Federation (Sechenov  
University),  
Moscow Russian  
**E-mail:** [tatiana\\_80\\_80@inbox.ru](mailto:tatiana_80_80@inbox.ru)

УДК 611-018.2+611-013:616-003.93  
ГРНТИ 76.03.35, 76.03.49  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.150-155

**Т. А. Бойко, Е. Ю. Шаповалова, Ю. Г. Барановский,  
С. В. Харченко, И. А. Лугин, А. Г. Барановский**  
Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»  
ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского»

## **МАКРОФАГИ И ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПОЛИЛАКТИДНОЙ ПЛЕНКИ С КСЕНОФИБРОБЛАСТАМИ В ИШЕМИЗИРОВАННУЮ РАНУ КОЖИ**

*В статье обсуждается присутствие макрофагов в биоптатах заживающего модельного ишемизированного дефекта кожи на 12-е сутки после интраоперационной трансплантации полилактидной пленки с культивированными на ней ксеногенными дермальными фибробластами. Представлены оригинальные данные о пригодности полилактидной пленки в качестве филлера ввиду отсутствия реакции отторжения и ускорения заживления дефекта.*

**Ключевые слова:** макрофаги, ксенофибробласты, полилактидная пленка, ишемизированная рана.

**T. A. Boyko, Y. Y. Shapovalova, Y. G. Baranovskiy,  
S. V. Harchenko, I. A. Lugin, A. G. Baranovskiy**  
V.I. Vernadsky Crimean Federal University

## **MACROPHAGES AND TRANSPLANTATION OF POLYLACTIDE FILM WITH XENOFIBROBLASTS INTO ISCHEMIC CUTANEOUS WOUND**

*The paper discusses the presence of macrophages in biopsies of a healing model ischemic skin defect on the 12th day after intraoperative transplantation of a polylactide film with xenogenic dermal fibroblasts cultured on it. Original data are presented on the suitability of a polylactide film as a filler due to the absence of a rejection reaction and accelerated defect healing.*

**Keywords:** macrophages, xenofibroblasts, polylactide film, ischemic wound.

### Введение

Заживление любых ран, в том числе и ишемизированных, обеспечивается активностью ряда клеток. Одним из основных важнейших видов клеток, участвующих в раневом процессе, являются макрофаги, которые активно очищают раны от разрушенных клеток, бактериальной инфекции, стимулируют функции фибробластов за счет продукции факторов роста, белков комплемента и интерферона, а также тормозят избыточную активность фибробластов, выделяя медиаторы воспаления и другие протеазы [1, с. 673-679; 2, с. 147-147a]. Фибробласты, выращенные на подходящем биоразлагаемом каркасе, являются возможной стратегией создания дермального заменителя, благодаря которому эпителизация может происходить естественным путем [3, с. 217-225; 4, с. 247-276]. Алифатические сложные полиэфиры, также известные как поли (-гидроксисоефиры), представляют собой одну из таких биологически рассасывающихся и биосовместимых групп полимеров, которые имеют большой потенциал для использования в регенерации тканей кожи [5]. Этот класс полимеров включает: поли (молочную кислоту) (PLA). Из них наиболее широко используемыми полилактидами являются поли (L-лактид) (PLLA) и поли (D-лактид) (PDLA) соответственно [5, 321-328]. Однако, научных работ, описывающих содержание и функции макрофагов в патогенезе репарации длительно незаживающих ишемизированных ран или в условиях стимулирования регенераторного потенциала с помощью тканеинженерных конструкций на базе дермальных фибробластов ассоциированных с поли-L-лактидной пленкой (PLLA), крайне мало [6, с. 457-478; 7, с. 3209-3213].

### Цель работы

Изучить содержание макрофагов в тканях регенерирующей модельной кожной ишемизированной раны на 12-е сутки после трансплантации в кожный дефект полилактидной пленки ассоциированной с дермальными фибробластами.

### Материалы и методы

Исследование выполнено на 14 белых половозрелых мышах линии C57/B1 в возрасте 5-7 месяцев, которые содержались в виварии института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского». Животные были разделены на контрольную (КГ) и экспериментальную группы (ЭГ) по 7 особей в каждой. Эксперимент проводился в соответствии с принципами гуманизма, изложенных в *Directive 2010/63/EU, u ICMR on animal research* (2006). Ишемизированную кожную рану моделировали хирургическим путем в межлопаточной области на спине мышей обеих групп. Для животных экспериментальной группы дермальные фибробласты получали ферментативным путем и культивировали в ростовой среде *DMEM/F<sub>12</sub> (Lonza)* [8, с. 259-261].

В качестве субстрата для нанесения раствора поли-L-L-лактида (*Poly-(L-lactide) Aldrich, USA*) были использованы покровные стекла размером 15x15 мм с гидрофильной (необработанной) поверхностью. Равномерное распределение полилактида на стеклах получали при применении полярного и хорошо удерживающего воду растворителя – ацетона. Наносили 30 мкл раствора полимера таким образом, чтобы концентрация его на стекле составляла 1.4 мкг/мм<sup>2</sup>. Оптимальной явилась концентрация раствора полимера 50 мг/мл при нанесении 85 мкл на поверхность покровного стекла. Толщина пленки составила 100 мкм. Приготовленные покровные стекла с полилактидом высушивали и стерилизовали 2 часа, облучая ультрафиолетовым светом.

Ксеногенные фибробласты мышей 2-го пассажа сеяли на покровные стекла, покрытые полилактидом, в количестве  $3 \times 10^3$  кл/см<sup>2</sup> в ростовой среде *DMEM/F<sub>12</sub> (Lonza)* с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). Культивировали в инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37<sup>0</sup>С. За изменением формы клеток в процессе культивирования их на полимере наблюдали под инвертированным микроскопом *OLIMPUS CX-41*.

После достижения конфлюэнта полилактидную пленку отделяли от покровного стекла и трансплантировали интраоперационно в модельную кожную рану в межлопаточной области мышей экспериментальной группы. Поверхность пленки с прикрепленными ксеногенными фибробластами накладывали на поверхность раны. Концы пленки подшивали к силиконовому кольцу. Сверху рану в контрольной и экспериментальной группах накрывали асептической повязкой «Воскопран» с левомиколом.

По прошествии 12-ти суток от операции у лабораторных животных удаляли ткани заживающей раны для приготовления гистологических срезов. Биоптат помещали на одни сутки в 10% раствор нейтрального забуференного формалина. После промывки от формалина и дегидратации материал пропитывали парафином и с помощью микротомы получали срезы толщиной 5 – 6 мкм. Срезы стандартно окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение гистологических срезов осуществляли на светооптическом микроскопе «OLIMPUS CX-31» с цифровой камерой «OLIMPUS 35050Z».

Присутствие макрофагов определяли иммуногистохимическим методом по наличию в клетках антигена CD68. Первичными антителами были CD68 фирмы *Gene Tex Inc* (США) в разведении 1:100. Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, наносили на срезы и инкубировали во влажной камере на протяжении 30 минут. Для визуализации клеток, в которых произошло связывание антител с антигенами, на каждый срез наносили 1 – 3 капли 3,3-диаминобензидина (*DAB Substrate Chromogen*) *Gene Tex Inc* (США). Для адекватного представления структуры ткани и ядер клеток срезы докрашивались гематоксилином Майера в течение 3 минут. Было проведено контрольное исследование с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов.

Индекс макрофагов определяли путем подсчета количества CD68-положительных клеток на 100 клеток грануляционной ткани при увеличении микроскопа  $\times 1350$  с последующим вычислением показателя в процентах в среднем по результатам изученных срезов в контрольной и экспериментальной группах. Сравнения средней величины индекса макрофагов проводили в процентах по отношению к контрольной группе.

Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием лицензионного программного обеспечения *MS Office Excel 2007*, аналитического пакета приложения *STATISTICA Enterprise (StatSoft Inc., США)*. Рассчитывали средние арифметические и стандартную ошибку средней, что относится к начальным параметрам распределения. Для сравнения двух выборок использовали t-критерий с уровнем значимости  $p < 0,05$ . Сравнения средней величины индекса макрофагов в экспериментальных группах проводили в процентах по отношению к контрольной группе, в которой средний индекс макрофагов принимали за 100%.

### **Полученные результаты**

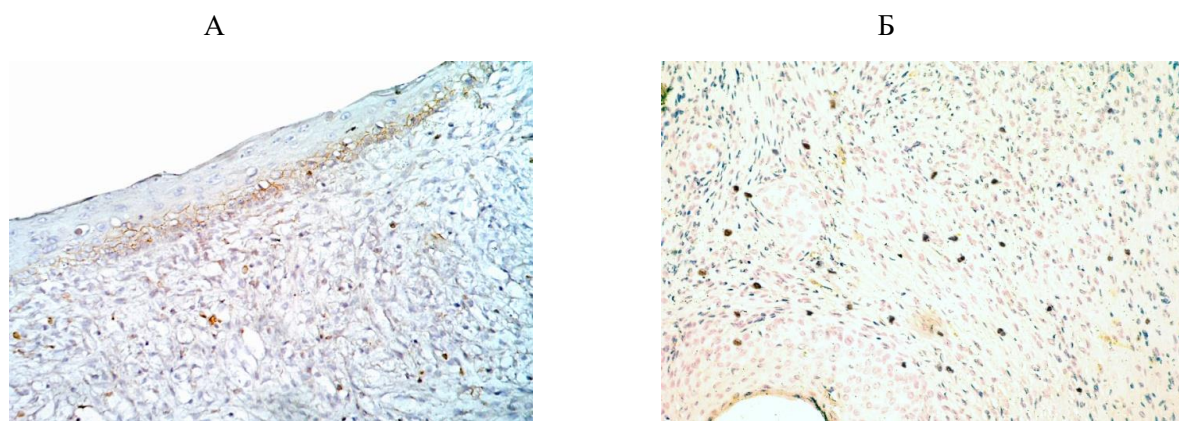
У мышей без лечения самопроизвольное отпадение силиконового кольца было зафиксировано в среднем на  $12,4 \pm 0,10$  сутки заживления ишемизированного кожного дефекта. В это время рана покрыта эпидермисом на всей площади. Однако эпидермис тонкий и в нем можно различить только базальный и шиповатый слои. Признаки дифференцировки эпидермоцитов в клетки рогового слоя прослеживаются на отдельных участках по периферии раны. Остатки бесклеточного струпа покрывают эпидермис тонким слоем. Под базальной мембраной эпидермиса присутствует грануляционная ткань на стадии пролиферации. В петлях сети коллагеновых волокон имеются клеточные элементы, кровеносные капилляры и расширенные вены. Относящиеся к макрофагам CD-68-положительные клетки лежат рядом с кровеносными сосудами или в их просвете, что подтверждает гематогенное происхождение макрофагов (рисунок 1А). Индекс макрофагов составляет  $17,21 \pm 0,02\%$  (таблица 1). Струп ярко окрашивается на антитела к CD68, возможно за счет присутствия в клеточном дебрисе компонентов погибших макрофагов.

**Таблица 1** Индекс макрофагов (CD68<sup>+</sup> клеток) в биоптатах контрольной и экспериментальной групп на 12-е сутки после трансплантации полилактидной пленки с ксенофибробластиками

Дни после трансплантации	Контрольная группа	Экспериментальная группа
12 день	17,21±0,02%	16,49±0,01%

У мышей экспериментальной группы эпителизация раны и отпадение силиконового кольца зафиксировано на  $8,5 \pm 0,1$  сутки после операции и закрытия ишемизированной кожной раны полилактидной пленкой ассоциированной с дермальными ксеногенными фибробластами. Это на  $31,41 \pm 0,01\%$  раньше, чем в контроле.

Поверхность раны свободна от струпа и эпидермис присутствует на всем протяжении. В центральных участках раны сохраняются остатки полилактидной пленки в виде тонкой бесструктурной полоски на поверхности эпидермиса. В составе эпидермиса четко различимы базальный, шиповатый и роговой слои. Зернистый слой фрагментарен. Наблюдаются признаки закладки шерстинок в виде тяжелой эпителиальной ткани от эпидермиса в подлежащую грануляционную ткань. Наметилось появление сосочкового слоя дермы в виде волнистой границы между базальной мембраной эпидермиса и подстилающей ее грануляционной тканью. В грануляционной ткани прослеживаются начальные признаки ее фиброзирования. Показатель индекса макрофагов уменьшился на  $8,08 \pm 0,001\%$  по сравнению с контролем (см. табл. 1) (различия достоверны на уровне значимости  $p < 0,05$ ). В некоторых участках визуализируются макрофаги преимущественно вблизи кровеносных сосудов (рисунок 1Б).



**Рисунок 1.** Макрофаги в биоптатах ишемизированной раны на спине мышей на 12-е сутки регенерации. А – контрольная группа. Увеличение:  $\times 100$ . Б – после трансплантации полилактидной пленки с ксенофибробластиками. Увеличение:  $\times 150$ . Иммуногистохимическая окраска моноклональными антителами к CD68. Визуализация в системе диаминобензидин с пероксидазой хрена – перекись водорода. 1 – развивающийся эпидермис; 2 – грануляционная ткань; 3 – CD68 – положительные клетки.

### Выводы

1. Биодegradуемая полилактидная пленка ассоциированная с ксеногенными дермальными фибробластами после трансплантации ее в модельную ишемизированную рану кожи к 12 суткам заживления ускоряет процесс репарации раны на  $31,41 \pm 0,01\%$  по сравнению с контрольной группой, основываясь на гистологической картине биоптатов и отпадении силиконового кольца вокруг кожного дефекта.

2. Индекс макрофагов в экспериментальной группе на  $8,08 \pm 0,001\%$  меньше по сравнению с особями контрольной группы.

### Заключение

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

1. Саморассасывающаяся полилактидная пленка является эффективным скаффолдом для дермальных фибробластов.

2. Трансплантация тканеинженерной конструкции на основе полилактидной пленки ассоциированной с культивированными дермальными фибробластами



позволяет сократить на треть срок заживления модельной ишемизированной раны кожи и уменьшить статистически достоверно на  $8,08 \pm 0,001\%$  содержание макрофагов, что свидетельствует о более эффективном подавлении воспалительной реакции и сокращении воспалительной фазы раневого процесса.

**Список литературы.**

1. Глухов А. А., Аралова М. В. Патофизиология длительно незаживающих ран и современные методы стимуляции раневого процесса // *Новости хирургии*. 2015. №6. С. 673-679.
2. Одинцова И. А., Данилов Р. К., Гололобов В. Г., Хилова Ю.К., Русакова С.Е., Комарова А.С. Раневой гистогенез: гистологическая организация и оптимизация процесса // *Морфология*. 2014; №3. С. 147-147а.
3. Nair R. P., Jasmin J., Harikrishnan V.S., Krishnan V.K., Krishnan L. Contribution of Fibroblasts to the Mechanical Stability of In Vitro Engineered Dermal-Like Tissue Through Extracellular Matrix Deposition // *Biores Open Access*. 2014. V.3,N5. P. 217-225.
4. Narayanan G., Vernekar V. N., Kuyinu E. L., Laurencin C. T. Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering // *Adv Drug Deliv Rev*. 2016. V.107. P. 247–276.
5. Lasprilla A.J.R., Martinez G.A.R., Lunelli B.H., Jardini A.L., Filho R.M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. // *Biotechnology Advances*. 2012. V.30. P. 321-328.
6. Singer N. G., Caplan A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* // 2011. V.6. P. 457-478.
7. Shaw T. J., Martin P. J. Wound repair at a glance // *J Cell Sci*. 2009. V. 122(Pt 18). P. 3209-3213.
8. 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.

**Сведения об авторах**

**Татьяна Анатольевна Бойко**

к.мед.н., доцент кафедры гистологии и эмбриологии,  
Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»  
ФГАОУ ВО "КФУ имени В.И. Вернадского"

Симферополь, Россия

**E-mail:** tatyana\_boyko\_5@mail.ru

**Елена Юрьевна Шаповалова**

д.мед.н., профессор, заведующая кафедрой гистологии и эмбриологии,  
Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»  
ФГАОУ ВО "КФУ имени В.И. Вернадского"

Симферополь, Россия

**E-mail:** Shapovalova\_L@mail.ru

**Юрий Геннадиевич Барановский**

к.мед.н., доцент кафедры хирургии №2,  
Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»  
ФГАОУ ВО "КФУ имени В.И. Вернадского"

Симферополь, Россия

**E-mail:** baranovskiy\_yura@mail.ru

**Светлана Владимировна Харченко**

к.мед.н., доцент кафедры гистологии и эмбриологии,  
Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»  
ФГАОУ ВО "КФУ имени В.И. Вернадского"

Симферополь, Россия

**E-mail:** kcharchenkos@mail.ru

**Игорь Анатольевич Лугин**

к.мед.н., доцент кафедры гистологии и эмбриологии,  
Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»  
ФГАОУ ВО "КФУ имени В.И. Вернадского"

Симферополь, Россия

**E-mail:** iglugin@hotmail.com

**Information about authors**

**Tatyana Anatoi'evna Boyko**

associated professor,  
V.I. Vernadsky Crimean Federal  
University

Simferopol,Russian

**E-mail:** tatyana\_boyko\_5@mail.ru

**Yelena Yur'evna Shapovalova**

professor,  
V.I. Vernadsky Crimean Federal  
University

Simferopol,Russian

**E-mail:** Shapovalova\_L@mail.ru

**Yuriy Gennadievich Baranovskiy**

associated professor,  
V.I. Vernadsky Crimean Federal  
University

Simferopol,Russian

**E-mail:** baranovskiy\_yura@mail.ru

**Svetlana Vladimirovna Harchenko**

associated professor,  
V.I. Vernadsky Crimean Federal  
University

Simferopol,Russian

**E-mail:** kcharchenkos@mail.ru

**Igor Anatol'evich Lugin**

associated professor,  
V.I. Vernadsky Crimean Federal  
University

Simferopol,Russian

**E-mail:** iglugin@hotmail.com

**Алексей Геннадиевич Барановский**  
ассистент кафедры хирургии №2  
Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»  
ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского»  
Симферополь, Россия  
E-mail: alex\_sharp123@mail.ru

**Alexey Gennadievich Baranovskiy**  
assistant professor,  
V.I. Vernadsky Crimean Federal  
University  
Simferopol, Russian  
E-mail: alex\_sharp123@mail.ru

УДК 591.3.591.44  
ГРНТИ 34.21.17, 34.39.27  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.155-159

**Б. Б. Гагулаева, С. С. Обернихин, Е. П. Тимохина,  
Н. В. Яглова,**  
НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им.  
акад. Б.В. Петровского»

### **РОЛЬ ПРЕНАТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ В ФОРМИРОВАНИИ ОРГАНОВ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ**

*Проведено исследование развития центральных и периферических органов иммунной защиты у новорожденных крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ. Установлено, что воздействие ДДТ в пренатальном периоде вызывает нарушение темпов развития тимуса и селезенки.*

**Ключевые слова:** селезенка, тимус, развитие, пренатальное воздействие, эндокринный дисраптор.

**B. B. Gagulaeva, S. S. Obernikhin, E. P. Timokhina,  
N. V. Yaglova,**  
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI  
«Petrovsky NRCS»

### **INTERFERENCE OF PRENATAL EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT WITH DEVELOPMENT OF IMMUNE ORGANS**

*Development of central and peripheral organs of immune defense in newborn rats that developed under the influence of the endocrine disruptor DDT was studied. Exposure to DDT during the prenatal period was found to change the rates of development of the thymus and spleen.*

**Keywords:** spleen, thymus, development, prenatal exposure, endocrine disruptor

#### **Введение**

Иммунная система представляет собой комплекс образований, реализующих защитную функцию организма. Это обуславливает ее высокую чувствительность к действию природных и антропогенных факторов. Но эта чувствительность проявляется не только в функциональных изменениях. Морфогенетические процессы в иммунной системе млекопитающих и человека также изменяются при действии различных факторов и в постнатальном, и пренатальном развитии [1, 2]. В ряде работ было показано, что действие химических веществ, способных проникать через фетоплацентарный барьер, способно оказывать влияние на развитие органов иммунной системы [2, 3]. Среди антропогенной химической нагрузки наибольшую угрозу представляют эндокринные дисрапторы, поскольку они воздействуют облигатно, проникают через гистогематические барьеры и нарушают работу эндокринной, нервной и иммунной систем. Наиболее распространенным эндокринным дисраптором является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), способный нарушать функцию половых желез, щитовидной железы, надпочечников [4, 5, 6, 7, 8].

**Цель работы** – выявление различий в развитии органов иммунной защиты у крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ.

### Материалы и методы

Эксперимент выполнен на крысах Вистар. Самки крыс получали вместо воды раствор с концентрацией ДДТ 20 мкг/л в течение всей беременности. Объектом исследования были новорожденные самцы крыс ( $n=10$ ). Мужское потомство интактных крыс ( $n=10$ ) служило в качестве контроля. Определяли массу тела. После передозировки золетила производили вскрытие грудной и брюшной полостей, тимус и селезенку удаляли целиком и взвешивали на аналитических весах («Сартогосм», Россия). Тимус и селезенку изучали с помощью стереомикроскопа. Рассчитывали относительную массу органов. Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета программ *Statistica 7.0* (Statsoft Inc., США). Средние значения описывали как среднее арифметическое и ошибка среднего. Различия считали статистически значимыми при  $p<0,05$ .

### Полученные результаты

Новорожденные самцы крыс контрольной группы имели сформированные тимус и селезенку. Тимус представлял собой достаточно крупное образование в средостении. Он состоял из двух долей и имел беловатый цвет. Селезенка представляла собой продолговатое ярко-красное образование, находящееся в забрюшинном пространстве. По массе она была вдвое больше тимуса.

У новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном периоде, масса тела была статистически значимо ниже (рис. 1).

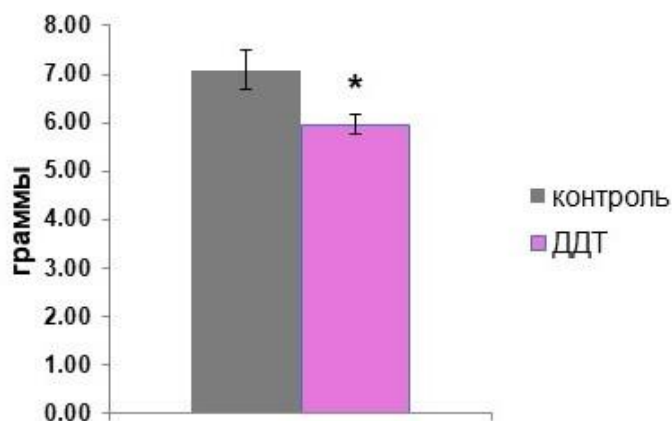


Рис. 1. Масса тела новорожденных самцов крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию ДДТ, и контрольной группы ( $M\pm m$ ).

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

Тимус имел типичную структуру, но отличался более крупными размерами. Его масса была статистически значимо больше значений контрольной группы (рис. 2а). Относительная масса тимуса почти в полтора раза превышала значения контрольной группы (рис. 2б).

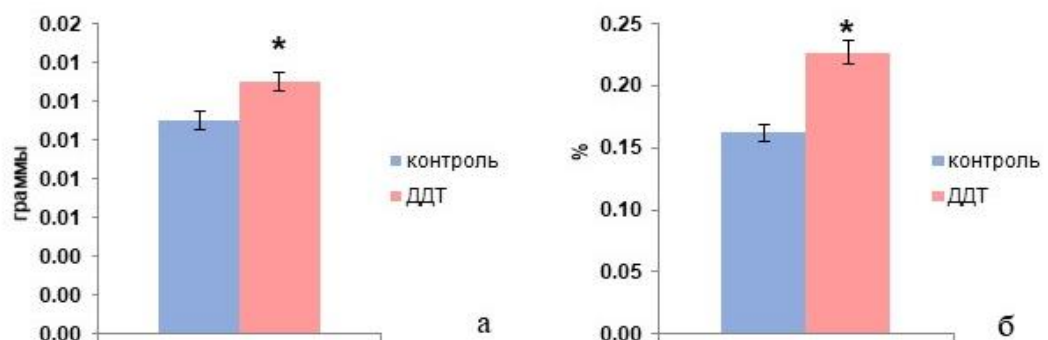


Рис. 2. Абсолютная (а) и относительная (б) масса тимуса новорожденных самцов крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию ДДТ, и контрольной группы ( $M\pm m$ ).

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



Селезенка имела правильную анатомическую форму, но отличалась меньшими размерами. Ее абсолютная масса была почти вдвое меньше контрольных значений (рис. 3а), а ее относительная масса в полтора раза была меньше, чем в контрольной группе (рис. 3б). У крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, абсолютная масса селезенки была меньше массы тимуса.



Рис. 3. Абсолютная (а) и относительная (б) масса селезенки новорожденных самцов крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию ДДТ, и контрольной группы ( $M \pm m$ ).

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

Результаты исследования показывают, что различия в развитии органов иммунной системы значительны. Тимус является первичным органом иммунной защиты, ответственным за формирование Т-клеточного звена иммунитета. Его развитие и параметры формирования Т-клеток определяют развитие периферических лимфоидных органов. Заселение тимуса предшественниками лимфоцитов начинается на 11-12 сутки внутриутробного развития, а колонизация селезенки начинается двумя днями позже [9, 10, 11, 12]. У крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию ДДТ, тимус имел значительно большие размеры, а селезенка явно отставала в развитии. Эти данные частично совпадают с данными других работ, показывающих, что пренатальное воздействие ДДТ, не замедляет развитие тимуса [13]. Возможно, что наблюдаемые большие анатомические параметры тимуса были обусловлены нарушением миграции клеток из тимуса, что обуславливало его большие размеры. У грызунов селезенка помимо органа иммунной защиты является также универсальным органом кроветворения, в которой на ранних этапах развития происходит эритропоэз, миелопоэз, лимфоцитопоэз, тромбоцитопоэз [14, 15]. Ее меньшая масса может быть обусловлена более низкими темпами развития гемопоэза в пренатальном периоде.

#### Выводы:

Пренатальное воздействие низких доз ДДТ оказывает существенное влияние на развитие органов иммунной защиты крыс. Оно не нарушает формирование правильной анатомической структуры центральных и периферических органов иммунной защиты – тимуса и селезенки, но вызывает нарушение темпов их развития.

#### Заключение:

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: пренатальное воздействие эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм в пренатальном периоде ускоряет развитие и рост тимуса и замедляет развитие селезенки.

#### Список литературы

1. Barker D.J.P. The origins of the developmental origins theory // *Journal of Internal Medicine*. 2007. V. 261. P. 412-417.
2. Dietert R., Lee J., Olsen J., Fitch K., Marsh J. Developmental immunotoxicity of dexamethasone: Comparison of fetal versus adult exposures // *Toxicology*. 2003. No. 194(1-2). P.163–176.

3. 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.
4. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Особенности продукции стероидных гормонов надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии // *Биомедицинская химия*. 2017. Т.63, вып.4. С.306-311.
5. Calsolaro V., Pasqualetti G., Niccolai F., Caraccio N., Monzani F. Thyroid disrupting chemicals // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18, 2583.
6. Kuiper G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T.; van der Burg, B., Gustafsson J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor // *Endocrinology*. 1998. V. 139. P. 4252–4263.
7. Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т.156. №12. С.720-722.
8. Nisha A., Hazilawati H., Mohd Azmi M., Noordin M. The induction of aryl hydrocarbon receptor (AHR) in immune organs of developing chicks by polycyclic aromatic hydrocarbons // *Toxicol. Mech. Methods*. 2018. No. 28(6). P. 461-466.
9. Hollaänder G., Gill J., Zuklys S., Iwanami N., Liu C., Takahama Y. Cellular and molecular events during early thymus development // *Immunological Reviews*. 2006. V. 209. P. 28-46.
10. Mebius R., Rennert P., Weissman I. Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells // *Immunity*. 1997. No. 7(4). P. 493-504.
11. Sasaki K., Iwatsuki H., Suda M., Itano C. Cell death and phagocytosis of haematopoietic elements at the onset of haematopoiesis in the mouse spleen: an ultrastructural study // *J. Anat.* 1993. V. 183. P. 113-120.
12. Godin I., Cumano A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race // *Nat. Rev. Immunol.* 2002. V. 2. P. 593-604.
13. Яглова Н.В., Цомартова Э.С., Назимова С.В., Обернихин С.С., Мухамедова С.Г., Пашина Н.Р., Мусаева Д.О. Морфологические изменения тимуса новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) во внутриутробном периоде развития // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019. Т.167. № 2. С. 261-264.
14. Cesta M.F. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen // *Toxicologic Pathology*. 2006. V. 34 P. 455–465.
15. Losco P. Normal development, growth, and aging of the spleen. In: *Pathobiology of the Aging Rat, vol 1, U Mohr, DL Dungworth, and CC Capen (eds). ILSI Press, Washington, 1992. DC. 75–94.*

**Сведения об авторах**

**Гагулаева Белла Борисовна**

аспирант лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия  
E-mail: gagulati@yandex.ru

**Сергей Стаинславович Обернихин**

д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия  
E-mail: ober@mail.ru

**Information about authors**

**Bella Borisovna Gagulaeva**, postgraduate, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky NRCS” Moscow Russian

E-mail: gagulati@yandex.ru

**Sergey Stanislavovich Obornikhin**

D.Med.Sc., Senior Researcher A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI “Petrovsky NRCS”, Moscow Russian

E-mail: ober@mail.ru

**Екатерина Петровна Тимохина**

к.б.н., научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии  
им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

**E-mail:** rodich@mail.ru

**Наталья Валентиновна Яглова**

д.м.н., зав. лабораторией развития эндокринной системы

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии  
им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

**E-mail:** yaglova@mail.ru

**Ekaterina Petrovna Timokhina**

PhD, Research worker

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of  
FSBSI "Petrovsky NRCS"  
Moscow Russian

**E-mail:** rodich@mail.ru

**Nataliya Valentinovna Yaglova**

Head of Laboratory

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of  
FSBSI "Petrovsky NRCS"  
Moscow Russian

**E-mail:** yaglova@mail.ru

УДК 616.314:616-003.23

ГРНТИ 76.29.55

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.159-163

**Т.В. Гайворонская, А.А. Зуб, Ф.С. Аюпова**

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Кубанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

## **МЕТОДЫ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА, ОСНОВАННЫЕ НА ОЦЕНКЕ БИОМАРКЕРОВ РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

*Методы количественного определения биомаркеров в ротовой жидкости позволяют выявить ранние признаки развития хронического пародонтита. Представляет интерес дальнейшее совершенствование известных методов для более доступного и эффективного применения в пародонтологической клинической практике.*

**Ключевые слова:** хронический пародонтит, неинвазивная диагностика, биомаркер, ротовая жидкость.

**T.V. Gayvoronskaya, A.A. Zub, F.S. Ayupova**

Kuban State Medical University

## **NONINVASIVE DIAGNOSTIC METHODS FOR CHRONIC PERIODONTITIS BASED ON ORAL FLUID BIOMARKER ASSESSMENT: A REVIEW**

*Methods of quantitative determination of biomarkers in oral fluid allow to reveal early signs of chronic periodontitis development. It is of interest to further improve the known methods for more affordable and effective application in periodontal clinical practice.*

**Keywords:** chronic periodontitis, noninvasive diagnosis, biomarker, oral fluid.

### **Введение**

Воспалительно-деструктивные заболевания пародонта выявляют у 20-50% населения во всем мире [1]. Современные методы диагностики хронического пародонтита основаны на выявлении кровоточивости десны, определении глубины пародонтальных карманов путём зондирования и рентгенологических признаках потери альвеолярной кости [2]. Эти признаки возникают при значительном повреждении тканей пародонта и их оценка имеет субъективный характер [3]. Поэтому исследования направлены на разработку доступных, неинвазивных методов диагностики для раннего выявления признаков развития пародонтита у лиц, находящихся в «группе риска», контроля активности течения заболевания и регистрации ответных реакций тканей пародонта на лечебно-профилактические мероприятия [4, 5].

**Цель работы** – изучить в литературе методы диагностики для раннего выявления признаков развития пародонтита.

### Материалы и методы

Поиск публикаций проводился в научных поисковых базах *CyberLeninka*, *E-library* и *MEDLINE/PubMed* с использованием терминов в предметных установках «пародонтит», «неинвазивная диагностика», «биомаркер», «ротовая жидкость». Глубина поиска составила 10 лет.

### Результаты

По данным литературы известно, что в слюне и десневой жидкости содержатся цитокины, хемокины, ферменты, местные продукты деградации тканей. Качественный и количественный состав десневой жидкости изменяется в ответ на воздействие бактериальной биопленки и может служить биологической средой для выявления биомаркеров заболеваний пародонта [6]. Известны качественные и количественные методы определения концентрации биомаркеров в биологических средах.

Иммуноферментный анализ (ИФА) - лабораторный количественный аналитический метод определения концентрации различных низкомолекулярных соединений и макромолекул в биологических жидкостях, в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело [7]. Данный метод является самым популярным и часто встречаемым в литературе. Большое количество исследований посвящено определению в слюне и десневой жидкости уровня различных цитокинов, ферментов, пептидов. Наиболее изученными и перспективными для применения в диагностике и прогнозировании течения хронического пародонтита считают металлопротеиназу-8 (ММП-8) и интерлейкин-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) [8,9]. Перспективными, но малоизученными являются макрофагальный белок воспаления-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) и противомикробный пептид кателицидин LL-37 [10, 11].

Однако количественные методы диагностики требуют финансовых затрат на иммуноферментные тест-системы и длительного времени на проведение исследования. Необходимо осуществить сбор, хранение образцов биологических жидкостей и транспортировку до лаборатории, использовать специальные приборы, что ограничивает их применение непосредственно на месте оказания медицинской помощи.

Альтернативой иммуноферментным анализам (ИФА) являются более эффективные иммуноанализы SERS, которые могут обнаруживать и количественно определять несколько показателей в биологической жидкости за одно измерение. Особенностью данного метода являются специфические антитела, представляющие собой наночастицы серебра (*Ag NPs*), модифицированные гидрофильно стабилизированными молекулами. Используются они в качестве SERS-меток в сэндвич-иммуноанализе для определения биомолекул на функционализированных стеклянных предметных стеклах в сочетании с микроспектроскопическим детектированием с высоким пространственным разрешением. SERS (поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние) — это спектроскопический метод, в котором используются металлические наноструктуры (т.е. подложка SERS) для усиления сигнала комбинационного рассеяния интересующих аналитов [12]. В литературе описано применение SERS для чувствительного детектирования цитокинов ФНО- $\alpha$  и Ил-1 $\beta$ , мочевой кислоты, глутатиона и гипоксантина в десневой жидкости при хроническом пародонтите. Результаты показали высокую степень избирательности, чувствительности и специфичности, что указывает на многообещающий потенциал этого метода для разработки новых возможностей в диагностике, прогнозировании и наблюдении за течением заболеваний пародонта [13, 14, 15].

Рядом преимуществ по сравнению с обычными радиоиммунологическими анализами или иммуноферментными иммуносорбентными анализами (ИФА) обладают электрофоретические иммуноанализы. Иммуноанализ занимает минуты (по сравнению с часами для обычного количественного ИФА) и способен анализировать объемы образцов менее 10 мкл. Известен электрофоретический иммуноанализ на основе микрочипов. Портативное диагностическое устройство для диагностики заболеваний полости рта основано на интегрированной платформе «*micro fluid*» (IMPOD). Капиллярный электрофорез является высокоэффективным методом разделения, позволяющим отделять

связанные и несвязанные виды за одну стадию, устраняя многочисленные стадии промывки, необходимые в обычных иммуноанализах. Иммунизации репортерных молекул (антител) на сенсорных поверхностях не требуется. Электрофоретические иммуноанализы обычно проводят в открытом или поверхностно модифицированном микрофлюидном канале с просеивающим гелем [16]. Известны результаты применения данного метода для измерения уровня ММП-8 в слюне пародонтологически здоровых людей и больных хроническим пародонтитом [17].

Разработаны тест-системы «*Periosafe*» и «*Periomarker*» для определения активной ММП-8 (аММП-8) в образцах слюны, основанные на технологии бокового потока с использованием моноклональных антител. Преимуществом является простота применения теста непосредственно в стоматологическом кресле при оказании медицинской помощи и получение результата в течение 5-10 минут. Иммунотесты бокового потока аММП-8 в виде тест-полоски опускают в собранную слюну и «считывают» появление синих линий различной интенсивности. Первая полоска – это тестовая полоска, которая представляет положительный результат теста с синим окрашиванием в ответ на минимальное измеренное количество 25 нг/мл аММП-8. Вторая полоска – контрольная, которая используется для проверки правильности работы теста [4, 18, 19].

Известна технология на основе биочипа с использованием специфических антител и технологии поверхностных акустических волн *SAW*. Прототип биосенсора, который фиксирует ММП-8 с помощью специфических антител, нанесенных на небольшой биочип, количественно определяет ММП-8 в слюне с помощью микро-электро-механической пьезоэлектрической технологии *SAW*. Прототип датчика содержит одноразовый биочип *SAW*, функционализированный специфическими антителами, который подает аналоговый сигнал в блок управления при обнаружении ММП-8. Блок управления преобразует сигнал в цифровой формат и дает количественный результат, который принимается портативным персональным компьютером или мобильным телефоном со специальным программным обеспечением для обработки сигнала. Преимущество биосенсора заключается в измерениях в реальном времени, а модификация протоколов подготовки и промывки чипов позволила сократить время анализа примерно до 15 минут. Кроме того, в отличие от многих датчиков бокового потока, сенсорная система имеет масштабируемое считывание, а не зависит от внешнего вида цветов или полос [20].

### **Вывод**

Клинические методы диагностики пародонтита недостаточно эффективны и требуют применения рентгенологических методов исследования. Известные методы количественного определения биомаркеров в слюне и десневой жидкости показательны, однако, они трудоёмкие и требуют дорогостоящего специального оборудования.

**Авторы считают**, что в данной работе новыми являются следующие положения – ранние признаки развития пародонтита можно достоверно выявить с применением количественного определения уровня биомаркеров в десневой жидкости. Создание эффективных экспресс-методов диагностики позволит сократить продолжительность, значительно снизить трудоёмкость и затратность исследований.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках гранта РНФ № 22-15-20069. Выражаем благодарность администрации Краснодарского края.

### **Список литературы**

1. Romandini M., Baima G., Antonoglou G., Bueno J., Figuero E., Sanz M. Periodontitis, Edentulism, and Risk of Mortality: A Systematic Review with Meta-analyses // *Journal of Dental Research*. 2021. 100(1). P. 37-49.
2. Tonetti M.S., Greenwell H., Kornman K.S. Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition // *Journal of Periodontology*. 2018. 89(1). P. 159–172.
3. Bibi T., Khurshid Z., Rehman A., Imran E., Srivastava K.C., Shrivastava D. Gingival crevicular fluid (GCF): A diagnostic tool for the detection of periodontal health and

- diseases // *Molecules*. 2021. 26(5). P. 1-16.
4. Sorsa T., Heikkinen A. M., Leppilähti J., Tervahartiala T., Nwhator S., Rathnayake N., Netuschil L. Active matrix metalloproteinase-8: contributor to periodontitis and a missing link between genetics, dentistry, and medicine // *Pathogenesis of periodontal diseases*. 2018. P. 51-57.
  5. Ghallab N.A. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: review of the current evidence // *Archives of Oral Biology*. 2018. 87. P. 115–124.
  6. Barros S.P., Williams R., Offenbacher S., Morelli T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis // *Periodontol 2000*. 2016. 70(1). P. 53-64.
  7. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA // *Peptides*. 2015. 72. P. 4-15.
  8. Arias-Bujanda N., Regueira-Iglesias A., Balsa-Castro C., Nibali L., Donos N., Tomás I. Accuracy of single molecular biomarkers in gingival crevicular fluid for the diagnosis of periodontitis: A systematic review and meta-analysis // *Journal of clinical periodontology*. 2019. 46(12). P. 1166-1182.
  9. Cheng R., Wu Z., Li M., Shao M., Hu T. Interleukin-1 $\beta$  is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review // *International journal of oral science*. 2020. 12(1). P. 1-9.
  10. Al-Sabbagh M., Alladah A., Lin Y., Kryscio R.J., Thomas M.V., Ebersole J.L., Miller C.S. Bone remodeling-associated salivary biomarker MIP-1 $\alpha$  distinguishes periodontal disease from health // *Journal of periodontal research*. 2012. 47(3). P. 389-395.
  11. Majeed Z.N., Alabsi A.M., Swaminathan D., Philip K. Reliability of Periodontal Pathogens and Human Cathelicidin L1-37 in the Prediction of the Different Stages of Periodontal Disease. 2019.
  12. Bonifacio A. "Nanostructured substrates for surface-enhanced Raman scattering spectroscopy" // *Nanomaterials for Theranostics and Tissue Engineering*. Elsevier. 2020. P. 137-174.
  13. Fornasaro S., Berton F., Stacchi C., Farina F., Esposito A., Sergio V., Bonifacio A. Label-free analysis of gingival crevicular fluid (GCF) by surface enhanced Raman scattering (SERS) // *Analyst*. 2021. 146(4). P. 1464-1471.
  14. Yang H., Zhang M.L., Yao L.H., Zhou M., Wang Q., Chen Yu., Ding Y. Surface-enhanced raman scattering-based immunoassay of two cytokines in human gingival crevicular fluid of periodontal disease // *Journal of Applied Spectroscopy*. 2019. 86(6). P. 968-975.
  15. Yang H., Zhang M.L., Chen Y., Ding Y. Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Technique for Detecting Periodontal Disease // *Journal of Applied Spectroscopy*. 2022. P. 1-6.
  16. Herr A.E., Hatch A.V., Giannobile W.V., Throckmorton, D.J., Tran H.M., Brennan J.S., Singh A.K. Integrated microfluidic platform for oral diagnostics // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007. 1098(1). P. 362-374.
  17. Srivastava N., Nayak P.A., Rana S. Point of care-a novel approach to periodontal diagnosis-a review // *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2017. 11(8). P. 1.
  18. Schmalz G., Kummer M.K., Kottmann T., Rinke S., Haak R., Krause F., Ziebolz D. Association of chairside salivary aMMP-8 findings with periodontal risk assessment parameters in patients receiving supportive periodontal therapy // *Journal of Periodontal & Implant Science*. 2018. 48(4). P. 251-260.
  19. Alassiri S., Parnanen P., Rathnayake N., Johannsen G., Heikkinen A.M., Lazzara R., Sorsa T. The ability of quantitative, specific, and sensitive point-of-care/chair-side oral fluid immunotests for aMMP-8 to detect periodontal and peri-implant diseases // *Disease Markers*. 2018.
  20. Taylor J.J., Jaedicke K.M., van de Merwe R.C., Bissett S.M., Landsdowne N., Whall K.M., Preshaw P.M. A prototype antibody-based biosensor for measurement of salivary MMP-8 in periodontitis using surface acoustic wave technology // *Scientific reports*. 2019. 9(1). P. 1-9.

**Сведения об авторах**

**Татьяна Владимировна Гайворонская,**  
д.м.н., профессор, проректор по учебно-воспитательной работе, заведующий кафедрой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии

Кубанский государственный медицинский университет  
Краснодар, Россия

Эл. почта: [t.gaivoronskaya@rambler.ru](mailto:t.gaivoronskaya@rambler.ru)

**Анна Андреевна Зуб,**

аспирант кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии

Кубанский государственный медицинский университет  
Краснодар, Россия

Эл. почта: [anna.zub\\_1994@mail.ru](mailto:anna.zub_1994@mail.ru)

**Фарида Сагитовна Аюпова,**

к.м.н., доцент,  
доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии

Кубанский государственный медицинский университет  
Краснодар, Россия

Эл. почта: [farida.sag@mail.ru](mailto:farida.sag@mail.ru)

**Information about authors**

**Tatyana Vladimirovna Gayvoronskaya,**  
Doctor of Medical Sciences, Professor,  
Head of the Chair of Dental and Maxillofacial Surgery,

Kuban State Medical University  
Krasnodar, Russia

E-mail: [t.gaivoronskaya@rambler.ru](mailto:t.gaivoronskaya@rambler.ru)

**Anna Andreevna Zub,**

Postgraduate Student, Chair of Dental and Maxillofacial Surgery,

Kuban State Medical University  
Krasnodar, Russia

E-mail: [anna.zub\\_1994@mail.ru](mailto:anna.zub_1994@mail.ru)

**Farida Sagitovna Ayupova,**

Candidate of Medical Science, Assistant Professor of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Maxillofacial Surgery

Kuban State Medical University  
Krasnodar, Russia

E-mail: [farida.sag@mail.ru](mailto:farida.sag@mail.ru)

УДК 611.013.9  
ГРНТИ 76.29.48, 34.21.17  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.163-170

<sup>1</sup>А. Д. Иванова, <sup>2</sup>М. А. Тофило, И. В. <sup>1,3</sup>Володяев

<sup>1</sup>Московский государственный университет  
им. М.В.Ломоносова

<sup>2</sup>Лаборатория Медикал Геномикс

<sup>3</sup>Клиника репродуктивной и пренатальной медицины  
Европейского Медицинского Центра EMC

**ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ХРОМОСОМНОГО  
МОЗАИЦИЗМА В ЭКО: ФАКТОРЫ ВЛИЯНИЯ**

*В статье обсуждается влияние лабораторных факторов на возникновение артефактного шума на профилях NGS, который может ложно интерпретироваться как хромосомный мозаицизм преимплантационных эмбрионов в клинической практике ЭКО.*

**Ключевые слова:** преимплантационное генетическое тестирование, хромосомный мозаицизм, артефактный шум профилей NGS, вспомогательные репродуктивные технологии.

<sup>1</sup>A.D. Ivanova, <sup>2</sup>M. A. Tofilo, <sup>1,3</sup>I. V. Volodyaev,

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University

<sup>2</sup>Laboratory MedicalGenomics

<sup>3</sup>European Medical Center

**FALSE POSITIVE DIAGNOSIS OF CHROMOSOMAL MOSAICISM IN IVF:  
FACTORS OF INFLUENCE**

*The article discusses the influence of laboratory factors on the occurrence of artifact noise on NGS profiles, which can be falsely interpreted as chromosomal mosaicism of preimplantation embryos in IVF clinical practice.*

**Keywords:** preimplantation genetic testing, chromosomal mosaicism, artifact noise of NGS profiles, assisted reproductive technologies.

**Введение**

В настоящее время в клинической практике ЭКО широко используется технология преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) и идет активное накопление данных о хромосомных нарушениях ранних эмбрионов. Так, было обнаружено, что различные варианты хромосомного мозаицизма, в том числе эуплоид-анеуплоидный

мозаицизм, широко представлены в эмбрионах человека на преимплантационных стадиях развития [5, 7]. В результате возникла активная дискуссия о возможности переноса таких эмбрионов в тех случаях, когда у пациентов не были получены эуплоидные эмбрионы. Хотя снижение потенциала развития мозаичных эмбрионов не вызывает сомнений [13], описано много случаев рождения здоровых детей после переноса эмбрионов, определенных на стадии бластоцисты как мозаичные [8, 16]. Было высказано несколько предположений относительно причин таких положительных клинических исходов. Во-первых, это может быть ошибка диагностики по результатам ПГТ-А [5, 14], и в настоящее время предполагается, что основную часть ложноположительных диагнозов аномалий преимплантационных эмбрионов представляют собой диагнозы именно мозаицизма [5, 10]. Во-вторых, существуют данные об активизации механизмов самокоррекции хромосомного статуса мозаичных эмбрионов на перипреимплантационных стадиях развития [1, 12].

Отсутствие репрезентативности биоптата по отношению ко всему эмбриону, а также проведение анализа на этапе удвоения ДНК могут стать биологическими причинами ложноположительных диагнозов мозаицизма [2, 4]. Однако, в связи с тем, что частота обнаружения мозаицизма сильно разнится между центрами ЭКО [11], неоднократно была высказана идея, что высокая частота мозаицизма в некоторых клиниках наблюдается не из-за биологических причин, а вследствие лабораторных манипуляций или технических эффектов [6]. Важным обстоятельством является то, что ни один из методов ПГТ не имеет клинически стандартизированных критериев, позволяющих точно отличать технические погрешности от подлинного мозаицизма, когда значение числа копий хромосомы попадает между порогами эуплоидии и анеуплоидии [2]. Артефактный фоновый шум может вызвать промежуточные уровни профилей по хромосомам, и это приводит к тому, что профили интерпретируются как мозаичные [14].

### **Цель работы**

Целью нашего исследования стало выявление лабораторных факторов, приводящих к ложной диагностике мозаичных эмбрионов. Результаты нашего исследования будут обладать научной новизной и послужат фундаментальным научным базисом для улучшения методов оценки эмбрионов в клинической практике ВРТ.

### **Материалы и методы**

В данном исследовании для экспериментальных групп мы моделировали воздействие различных лабораторных факторов, приводящее к повреждению биоптатов трофэктодермы эмбрионов человека 5—6 дня развития; анализировали контрольные и экспериментальные биоптаты с помощью методов световой и лазерной конфокальной микроскопии для визуализации цитоплазмы клеток, живых и погибших клеточных ядер; сравнивали результаты генетического анализа групп методом *NGS*. Биоптаты были получены от эмбрионов пациентов, прошедших процедуру ЭКО и отказавшихся от них. Для каждого эмбриона, используемого в исследовании, получено информированное согласие от пациентов об использовании эмбрионов в научных целях. Эмбрионы были разморожены для исследования по стандартному протоколу.

В данной публикации мы описываем наши данные, полученные при анализе влияния на качество биоптатов и их профилей *NGS* трех лабораторных факторов: техники биопсии эмбриона, лазерного воздействия на клетки биоптата, повторной заморозки-разморозки образца перед проведением *NGS*. Для оценки влияния техники биопсии мы осуществляли биопсию эмбрионов одним и тем же оператором в 2 этапа: до и после обучения оператора специалистами в данной области. Для анализа лазерного воздействия на клетки экспериментальные биоптаты подвергали многочисленным импульсам инфракрасного лазера мощностью 100—150 мВт и длительностью импульсов 10 мсек. Для анализа влияния повторной заморозки-разморозки образца биоптаты подвергали замораживанию в капле среды при  $-20^{\circ}\text{C}$ , оттаиванию и затем тубингу с окончательной заморозкой образца перед проведением *NGS*.

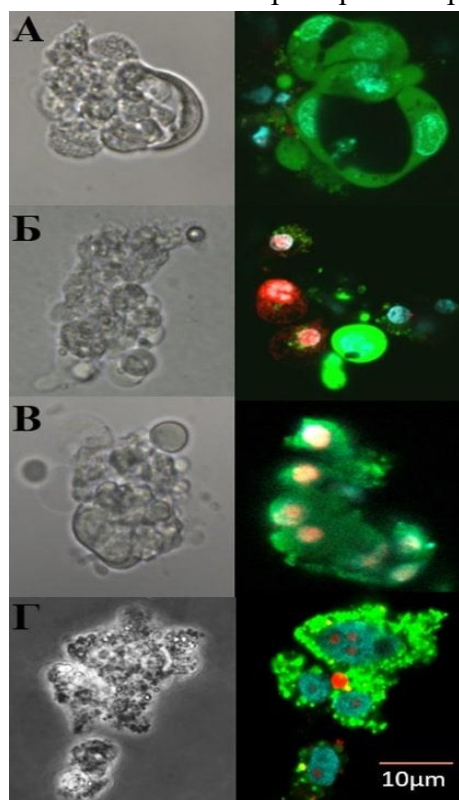


## Полученные результаты

### Техника биопсии

Несмотря на то, что биопсия трофэктодермы считается стандартной процедурой в клинической практике ЭКО, качество биоптатов, собранных одним оператором, существенно различается (рис. 1А, Б). При проведении биопсии эмбрионов одним и тем же оператором до обучения и после, мы обнаружили значительное различие в качестве биоптатов с помощью методов конфокальной микроскопии. Биоптаты, собранные оператором до обучения, демонстрировали в основном зернистую окраску кальцеином АМ, свидетельствующую о повреждении клеточных мембран, и относительно высокую долю погибших ядер, визуализированных с помощью окраски пропидия йодидом (19%, доля посчитана при суммировании всех ядер биоптатов данной группы,  $n=14$ ,  $n$  ядер=239). Для биоптатов, собранных оператором после обучения, была показана в основном равномерная окраска кальцеином АМ, характерная для клеток с целостной мембраной, и низкая доля погибших клеточных ядер (5%,  $n=7$ ,  $n$  ядер=118, см. рис. 1А, Б; рис. 2). Различия между данными группами (биоптаты «до обучения» и «после») по суммарным значениям живых и погибших клеточных ядер статистически значимо (критерий  $\chi^2$ ,  $p<0,001$ ). Мы показали, что приобретение оператором навыка проведения биопсии позволяет чаще получать биоптаты высокого качества, однако, не гарантирует полное исключение повреждений клеток биоптатов. Таким образом, при выделении контрольной группы биоптатов в данном и сходных исследованиях необходимо ориентироваться на качество каждого биоптата индивидуально.

Рис. 1. Примеры контрольных и экспериментальных биоптатов.



Зеленый – кальцеин АМ, цитоплазма клеток  
 Голубой - Hoechst 33342  
 Красный – пропидия йодид (PI).  
 Погибшие клеточные ядра: Hoechst 33342+, PI+;  
 Живые клеточные ядра: Hoechst 33342+, PI-.  
 А) Биоптат высокого качества  
 Б) Биоптат низкого качества  
 В) Биоптат, подвергнутый тотальному воздействию лазера  
 Г) Биоптат, подвергнутый повторной заморозке-разморозке.



Рис. 2. Доли погибших клеточных ядер (пропидия йодид (PI)-положительные) для биоптатов, собранных оператором до обучения специалистами клиники ЭКО (31.08-04.10.21), и после (05.10-29.11.21).

**Лазерное воздействие**

Воздействие лазерными импульсами на биоптат положительно коррелирует с долей погибших клеточных ядер. При тотальном воздействии на клетки многочисленными лазерными импульсами средняя доля погибших клеточных ядер в биоптатах составляла 75% ( $n=10$ , см. рис. 1В). В реальной клинической практике тотальное лазерное воздействие не применяется, тем не менее, возможно повреждение единичных клеток при стандартном использовании лазера в качестве вспомогательного инструмента в протоколе биопсии трофэктодермы. Так, при проведении одним оператором контрольной серии биопсий с использованием лазера и без, нами были получены доли погибших клеточных ядер 10% ( $n=6$ ,  $n$  ядер=130) и 5% ( $n=7$ ,  $n$  ядер=118), соответственно. Таким образом, использование лазера при биопсии потенциально может вызвать повреждения клеточных ядер. С другой стороны, предпочтительность техники проведения биопсии (с лазером или без) зависит от оператора и должна быть определена индивидуально в каждом случае, т.к. биопсия без применения лазера с минимальными рисками повреждений клеток возможна только опытным оператором.

**Заморозка-разморозка образцов перед NGS**

Еще одним лабораторным фактором, вызывающим увеличение доли погибших клеточных ядер биоптата, является повторная заморозка-разморозка образца перед проведением ПГТ. Так, биоптаты, замороженные в капле среды при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , а затем повторно размороженные, продемонстрировали 37% погибших клеточных ядер ( $n=8$ ,  $n$  ядер=27, см. рис. 1Г), по сравнению с 5% ( $n=7$ ,  $n$  ядер=118) для контрольных биоптатов высокого качества (различие статистически значимо, критерий  $\chi^2$ ,  $p<0,001$ ).

**Доля погибших клеточных ядер и профиль NGS**

Чтобы понять, каким образом отражается качество биоптата и доля погибших клеточных ядер на профилях NGS, мы провели эксперимент с последовательным использованием методов конфокальной микроскопии для определения точных морфологических характеристик биоптата и стандартной методики тубинга для дальнейшего проведения NGS.

После получения профилей NGS и числовых данных по всем хромосомам, мы сравнили степень «зашумленности» профилей NGS между двумя подгруппами контрольных биоптатов. Средняя доля погибших клеточных ядер для биоптатов высокого и низкого качества в этом эксперименте составила 11% ( $n=6$ ) и 47% ( $n=9$ ) соответственно. Для данных двух подгрупп контрольных биоптатов мы не показали статистически значимых различий по стандартным отклонениям значений копий бинов (секвенируемых фрагментов) для каждой из хромосом ( $U$ -критерий Манна-Уитни,  $p=0,62$ ). При сравнении профилей биоптатов высокого качества (11% погибших ядер,  $n=6$ ) и биоптатов, подверженных тотальному лазерному воздействию (75% погибших ядер,  $n=10$ ), статистически значимых различий также не было обнаружено ( $U$ -критерий Манна-Уитни,  $p=0,13$ ). Возможно, это связано с малым объемом выборки.

Далее мы обратились к нашим ретроспективным данным, полученным без применения методов конфокальной микроскопии. При сравнении профилей биоптатов без воздействия (контроли разного качества,  $n=8$ ) и биоптатов, подвергнутых повторной заморозке-разморозке ( $n=4$ ), были обнаружены статистически значимые различия по степени разброса значений копий бинов ( $U$ -критерий Манна-Уитни,  $p<0,001$ ). Таким образом, согласно предварительным данным, серьезное повреждение клеточных ядер биоптатов потенциально может увеличивать артефактный шум на профилях NGS и провоцировать ложную диагностику хромосомного мозаицизма (рис. 3А, Б).

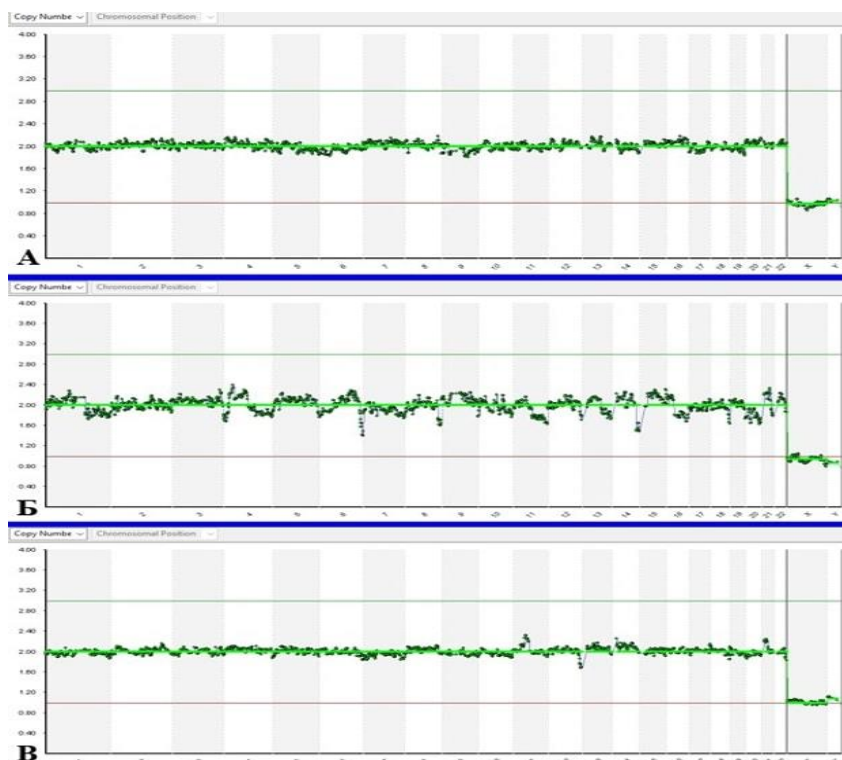


Рис. 3. Профили NGS трех биоптатов одного эмбриона. А) Контрольный биоптат высокого качества (3 клетки); Б) Биоптат, подвергнутый повторной заморозке-разморозке (3 клетки, на профиле хорошо заметен артефактный шум); В) Биоптат, подвергнутый повторной заморозке-разморозке с последующей инкубацией при 37°C в течение 48 ч (7 клеток).

#### ***Малоклеточные и многоклеточные биоптаты***

Остается неясным, по какой причине экспериментальные биоптаты, подвергнутые сильным повреждающим воздействиям, в некоторых случаях демонстрируют хорошие профили NGS с низкой степенью артефактного шума (рис. 3В). Были высказаны предположения, что слишком малое количество клеток в биоптате способствует возникновению артефактного шума [4, 5]. Мы решили проверить, может ли качество профиля NGS быть связано с количеством клеток в биоптате. При сравнении степени разброса значений бинов для двух подгрупп контрольных биоптатов – содержащих менее 10 клеток, и более 20, - было показано статистически значимое различие (*U*-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ), профили многоклеточных биоптатов характеризовались меньшей выраженностью артефактного шума. Также было показано различие в пользу многоклеточных биоптатов в группе повторной заморозки-разморозки с последующей инкубацией при 37°C в течение 48 ч.

Исходя из этих данных, можно предположить, что даже сильно поврежденные биоптаты могут показывать хорошие профили NGS при условии содержания достаточно большого количества клеток (рис. 3В). Соответственно, пагубное воздействие лабораторных факторов ощущается в большей степени на биоптатах малого размера. Однако, увеличение числа клеток в биоптате трофэктодермы в клинической практике невозможно вследствие высокого риска механического повреждения эмбриона. Так, были опубликованы результаты исследования, которые ясно продемонстрировали, что эмбрионы, подвергнутые биопсии большого количества клеток, показывали сниженный потенциал развития [9]. Отрицательная корреляция между количеством клеток в биоптате и уровнем шума на профилях NGS может также объяснять закономерность, которая заключается в том, что малоклеточные бластоцисты чаще демонстрируют «зашумленные» профили NGS, чем многоклеточные – вследствие того, что при одинаковом объеме биоптаты малоклеточных бластоцист содержат меньше клеток, чем биоптаты многоклеточных бластоцист.

#### ***Инкубация биоптатов при 25 и 37 градусах***

Мы проводили предварительный эксперимент с инкубацией биоптатов при 25°C

и 37°C в течение 2—96 часов без применения методов конфокальной микроскопии, чтобы вызвать в поврежденных во время биопсии клетках активизацию молекулярных клеточных механизмов и изменения в структуре ДНК. Однако, результаты сравнения профилей экспериментальных биоптатов с контрольными профилями оказались слишком неоднозначными. Вероятно, экспериментальные биоптаты содержали различные количества клеток и доли погибших клеточных ядер. Следующим этапом нашего исследования станет четкое отслеживание морфологических характеристик каждого биоптата с последующим тотальным лазерным воздействием и инкубацией при 25°C и 37°C перед тьюбингом и окончательной заморозкой образца. Мы предполагаем, что при искусственном повреждении биоптата лазерным воздействием и последующей отсрочке окончательной заморозки образца происходит разрезание ДНК на фрагменты в результате действия молекулярных механизмов с участием нуклеаз, и именно это биологическое явление в дальнейшем отражается на профилях *NGS* как артефактный шум.

#### **Ограничения исследования**

Основным ограничением этого исследования является небольшой размер выборки, что снижает достоверность наших выводов. Для подтверждения наших результатов в будущем потребуется проспективное рандомизированное контролируемое исследование с большим объемом выборки.

#### **Выводы**

Согласно нашим данным, особенности техники биопсии, лазерное воздействие и повторная заморозка-разморозка образца могут оказывать отрицательное влияние на качество биоптата, что выражается в увеличении доли погибших клеточных ядер, и последнее в дальнейшем отражается на профилях *NGS* как наличие артефактного шума. Однако, важным моментом является то, что в каждом случае необходимо оценивать качество биоптата на наличие погибших клеток индивидуально, так как воздействие каждого из факторов имеет элемент непредсказуемости, и в некоторых случаях даже после тотальных повреждающих воздействий мы не наблюдали гибель клеточных ядер биоптатов. Возможно, это связано с тем, что для многоклеточных биоптатов наблюдается повышенная устойчивость к действию отрицательных факторов. Логично предположить, что поврежденные клетки многоклеточных биоптатов отмываются во время переноса биоптатов между каплями среды при проведении исследования, а также во время тьюбинга, не попадая в итоговый образец.

#### **Заключение**

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

1. При выделении контрольной группы биоптатов в данном и сходных исследованиях необходимо ориентироваться на качество каждого биоптата индивидуально.
2. Повреждение клеточных ядер биоптатов при повторной заморозке-разморозке образца потенциально может усиливать артефактный шум на профилях *NGS* и провоцировать ложную диагностику хромосомного мозаицизма.
3. Показано статистически значимое различие по степени артефактного шума профилей *NGS* для малоклеточных и многоклеточных биоптатов. Профили многоклеточных биоптатов характеризовались меньшей выраженностью артефактного шума.

Истинная распространенность мозаицизма и артефактный шум на профилях *NGS* остаются спорными и активно обсуждаемыми вопросами. Мы предполагаем, что именно отсутствие данных о точных морфологических характеристиках биоптата может объяснять противоречивость результатов исследований, целью которых было выявление зависимости частоты диагностируемого мозаицизма от используемых лабораторных протоколов [3, 15, 17]. Уровни артефактного шума на профилях *NGS* будет корректно сравнивать между экспериментальными группами только с учетом данных о количестве и соотношении живых и погибших клеток в биоптате до и после тьюбинга.

## Список литературы

1. Bolton H. et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential // *Nature communications*. – 2016. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-12.
2. Capalbo A. et al. Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies: current challenges and future possibilities // *Human reproduction*. – 2017. – Т. 32. – №. 3. – С. 492-498.
3. Coll L. et al. The effect of trophectoderm biopsy technique and sample handling on artefactual mosaicism // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2022. – С. 1-8.
4. Cram D. S. et al. PGDIS position statement on the transfer of mosaic embryos 2019 // *Reproductive biomedicine online*. – 2019. – Т. 39. – С. e1-e4.
5. Fragouli E., Munne S., Wells D. The cytogenetic constitution of human blastocysts: insights from comprehensive chromosome screening strategies // *Human Reproduction Update*. – 2019. – Т. 25. – №. 1. – С. 15-33.
6. Girardi L. et al. Incidence, origin, and predictive model for the detection and clinical management of segmental aneuploidies in human embryos // *The American Journal of Human Genetics*. – 2020. – Т. 106. – №. 4. – С. 525-534.
7. Munné S. et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial // *Fertility and sterility*. – 2019. – Т. 112. – №. 6. – С. 1071-1079. e7.
8. Munné S. et al. Clinical outcomes after the transfer of blastocysts characterized as mosaic by high resolution Next Generation Sequencing-further insights // *European journal of medical genetics*. – 2020. – Т. 63. – №. 2. – С. 103741.
9. Neal S. A. et al. High relative deoxyribonucleic acid content of trophectoderm biopsy adversely affects pregnancy outcomes // *Fertility and sterility*. – 2017. – Т. 107. – №. 3. – С. 731-736. e1.
10. Popovic M. et al. Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate challenge of preimplantation genetic testing? // *Human reproduction*. – 2018. – Т. 33. – №. 7. – С. 1342-1354.
11. Sachdev N. M. et al. The rate of mosaic embryos from donor egg as detected by next generation sequencing (NGS) varies by IVF laboratory // *Fertility and Sterility*. – 2016. – Т. 106. – №. 3. – С. e156-e157.
12. Singla S. et al. Autophagy-mediated apoptosis eliminates aneuploid cells in a mouse model of chromosome mosaicism // *Nature communications*. – 2020. – Т. 11. – №. 1. – С. 1-15.
13. Spinella F. et al. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments // *Fertility and sterility*. – 2018. – Т. 109. – №. 1. – С. 77-83.
14. Victor A. R. et al. One hundred mosaic embryos transferred prospectively in a single clinic: exploring when and why they result in healthy pregnancies // *Fertility and sterility*. – 2019. – Т. 111. – №. 2. – С. 280-293.
15. Xiong S. et al. Trophectoderm biopsy protocols may impact the rate of mosaic blastocysts in cycles with pre-implantation genetic testing for aneuploidy // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2021. – Т. 38. – №. 5. – С. 1153-1162.
16. Zhang Y. X. et al. The pregnancy outcome of mosaic embryo transfer: a prospective multicenter study and meta-analysis // *Genes*. – 2020. – Т. 11. – №. 9. – С. 973.
17. Zhao H. et al. Comparison of two protocols of blastocyst biopsy submitted to preimplantation genetic testing for aneuploidies: a randomized controlled trial // *Archives of Gynecology and Obstetrics*. – 2019. – Т. 299. – №. 5. – С. 1487-1493.

## Сведения об авторах

Анна Дмитриевна Иванова,  
аспирант  
Кафедра Эмбриологии Биологического факультета  
Московского государственного университета им.  
М.В.Ломоносова  
Москва, Россия  
E-mail: ankivanova2@gmail.com

## Information about authors

Anna Dmitrievna Ivanova,  
Postgraduate  
Lomonosov Moscow State University  
Moscow, Russia  
E-mail: ankivanova2@gmail.com

**Мария Александровна Тофило,**  
зав. отделом медицинской генетики,  
врач лабораторный генетик  
Лаборатория Медикал Геномикс  
Тверь, Россия  
**E-mail:** m.tofilo@medicalgenomics.ru

**Илья Владимирович Володяев,**  
к.б.н., с.н.с.  
Кафедра Эмбриологии Биологического факультета  
Московского государственного университета  
им. М.В.Ломоносова  
Эмбриолог  
Клиника репродуктивной и пренатальной медицины  
Европейского Медицинского Центра ЕМС  
Москва, Россия  
**E-mail:** ivolodyaev@gmail.com

**Maria Aleksandrovna Tofilo,**  
Head of the Department of Medical Genetics, la-  
boratory geneticist, Laboratory Medical Genomics  
Tver, Russia  
**E-mail:** m.tofilo@medicalgenomics.ru

**Илья Владимирович Володяев,**  
Senior researcher, PhD,  
Lomonosov Moscow State University; Embry-  
ologist, European Medical Center  
Moscow, Russia  
**E-mail:** ivolodyaev@gmail.com

УДК 611.018:611.453  
ГРНТИ 76.03.35,76.29.37  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.170-174

<sup>1,2</sup>Д. А. Цомартова, <sup>1</sup>Н. В. Яглова, <sup>1</sup>С. С. Обернихин,  
<sup>2</sup>М. Ю. Иванова, <sup>2</sup>Е. В. Черешнева  
<sup>1</sup>НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына  
ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им.  
акад. Б.В. Петровского»  
<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
Минздрава России (Сеченовский Университет)

## РОЛЬ КАНОНИЧЕСКОГО WNT-СИГНАЛИНГА В ДИСМОРФОГЕНЕЗЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ЭНДОКРИННЫМ ДИСРАПТОРОМ ДДТ

*Изучены параметры постнатального развития коркового вещества надпочечников крыс при воздействии эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) в пре- и постнатальном периодах. Приведены результаты, свидетельствующие об ингибировании канонического Wnt-сигналинга в клетках различных зон коркового вещества. Полученные данные показывают, что дисморфогенез коркового вещества, вызванный ДДТ, является результатом нарушения эндокринным дисраптором активации канонического Wnt-сигналинга, то есть указывают на способность ДДТ нарушать транскрипционную регуляцию морфогенетических процессов в надпочечнике.*

**Ключевые слова:** канонический Wnt-сигналинг, морфогенез,  $\beta$ -катенин, корковое вещество, надпочечник, эндокринный дисраптор, ДДТ

<sup>1,2</sup>D. A. Tsomartova, <sup>1</sup>N. V. Yaglova, <sup>1</sup>S. S. Obernikhin,  
<sup>2</sup>M. Y. Ivanova, <sup>2</sup>E. V. Chereshneva,  
<sup>1</sup>A. P. Avtsyn Research Institute of  
Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS"  
<sup>2</sup>Federal State Autonomous Educa-  
tional Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Mos-  
cow State Medical University of the Ministry of Health of the  
Russian Federation (Sechenov University)

## IMPACT OF IMPAIRED CANONICAL WNT SIGNALING TO DISMORPHOGENE- SIS OF THE ADRENALS INDUCED BY ENDOCRINE DISRUPTOR DDT

*Development of the adrenal cortex in prenatally and postnatally exposed to endocrine disruptor DDT rats was studied. Inhibition of Wnt signaling was found in all the three cortical zones. The findings indicate that dismorphogenesis of the adrenal cortex is associated with impaired*

*Wnt signaling and also suggest that DDT disrupts transcriptional regulation of morphogenetic processes in the adrenals.*

**Key words:** *canonical Wnt signaling, morphogenesis,  $\beta$ -catenin, cortex, adrenals, endocrine disruptor, DDT*

### **Введение**

Канонический *Wnt*-сигналинг регулирует процессы пролиферации и дифференцировки клеток коркового вещества надпочечников в пренатальном и постнатальном развитии [1, 2]. Он также участвует в поддержании тканевого гомеостаза и физиологической регенерации коркового вещества [3]. Нарушения *Wnt*-сигналинга часто выявляются при развитии опухолевых процессов, подчеркивая важность выявления факторов, способных влиять на активацию *Wnt*-сигналинга [1, 4]. Количество данных о способности эндокринных дисрапторов изменять морфогенетические процессы, и тем самым влиять на параметры синтеза гормонов увеличивается [5, 6, 7]. В корковом веществе надпочечников выделяется три зоны с различными структурными и биохимическими параметрами, а также разной ролью канонического *Wnt*-сигналинга в морфогенезе [8, 9]. В наших предыдущих исследованиях мы выявили нарушения продукции всех классов стероидных гормонов надпочечников при развитии организма в условиях воздействия эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) [10].

**Цель** – установить изменения активации канонического *Wnt*-сигналинга в диморфогенезе коркового вещества надпочечников, обусловленных эндокринным дисраптором ДДТ.

### **Материалы и методы**

Работа выполнена на самцах крыс Вистар ( $n=20$ ). Крысы экспериментальной группы ( $n=10$ ) развивались в условиях непрерывного воздействия низких доз ДДТ путем замены питьевой воды на раствор *o,n*-ДДТ с концентрацией 20 мкг/л. Животных выводили из эксперимента в возрасте 6 недель, что соответствует пубертатному и 10 недель, что соответствует и постпубертатному возрасту, когда рост коркового вещества надпочечника завершается. Самостоятельное среднесуточное потребление ДДТ потомством составило  $2,90 \pm 0,12$  мкг/кг. Расчет дозы ДДТ выполняли согласно требованиям к определению его низких доз [11].

Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов надпочечников. Изучение активации *Wnt*-сигналинга проводили путем вычисления процента  $\beta$ -катенин-позитивных клеток с обнаружением последнего в ядре клеток [12]. Определение  $\beta$ -катенина в кортикостероцитах проводили методом иммуногистохимии с помощью поликлональных кроличьих антител («*Abcam*» США). Реакцию визуализировали с помощью набора реактивов «*UltraVision LP Detection System*» («*ThermoScientific*», США). Для количественной оценки морфологических параметров использовали программу для морфометрии «*ImageScope*» («*Leica Microsystems*», Германия).

Статистическую обработку данных производили с помощью программы *Statistica 7.0* («*Statsoft Inc.*», 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 с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и  $\chi^2$ . Статистически значимыми различия считались при  $p < 0,05$ .

### **Полученные результаты**

В периоде полового созревания надпочечник крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, имел меньшие размеры, что было обусловлено меньшей степенью развития коркового вещества. В корковом веществе клубочковая и сетчатая зоны имели статистически значимо меньшие размеры на 25 и 14%, соответственно. Клубочковая зона имела не только меньшую толщину, но и фрагментарное



развитие, то есть локально отсутствовала под капсулой надпочечника. Развитие пучковой зоны соответствовало возрастному контролю.

Изучение экспрессии  $\beta$  – ключевого эффектора канонического *Wnt*-сигналинга, показало, что в клубочковой зоне его экспрессия снижена. Процент клеток с транслокацией  $\beta$ -катенина в ядро был почти вдвое меньше значений контрольной группы. В пучковой зоне процент клеток с ядерной локализацией  $\beta$ -катенина был на треть меньше, чем у животных контрольной группы. В сетчатой зоне выявлено максимальное ингибирование транслокации  $\beta$ -катенина в ядро.

Таким образом, нами было выявлено снижение активации канонического *Wnt*-сигналинга во всех трех зонах коркового вещества. Известно, что активация *Wnt*-сигналинга является триггером формирования клубочковой зоны и дифференцировке ее клеток [2]. Закономерно, что аплазия клубочковой зоны сопровождалась низким уровнем активации *Wnt*-сигналинга. Иная картина наблюдалась в пучковой зоне. Ее развитие полностью соответствовало контролю, а уровень активации *Wnt*-сигналинга был понижен. В научной литературе имеются немногочисленные данные, о том, что *Wnt*-сигналинг ингибирует развитие и дифференцировку клеток пучковой зоны [9,13]. Эти данные показывают, что ингибирование активации *Wnt*-пути эндокринным дисраптором было фактором, предотвратившим замедление развития пучковой зоны. В сетчатой зоне наблюдались аналогичные клубочковой зоне изменения. Следовательно, наиболее вероятным заключением будет, что роль ингибирования канонического *Wnt*-сигналинга в дисморфогенезе клубочковой и сетчатой зон идентична. Эти данные показывают, что ДДТ является дисраптором транскрипционной регуляции морфогенетических процессов в корковом веществе надпочечников.

#### **Выводы**

Воздействие на развивающийся организм эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии подавляет активацию канонического *Wnt*-сигналинга во всех структурно-функциональных зонах коркового вещества надпочечников, что играет важную роль в дисморфогенезе клубочковой и сетчатой зон. Ингибирование канонического *Wnt*-сигналинга является одним из факторов, обеспечивающим нормальное развитие пучковой зоны коркового вещества.

#### **Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: дисморфогенез коркового вещества, вызванный эндокринным дисраптором ДДТ, является результатом нарушения дисраптором активации канонического *Wnt*-сигналинга, то есть ДДТ способен нарушать транскрипционную регуляцию морфогенетических процессов в надпочечнике.

#### **Список литературы**

1. Drelon C., Berthon A., Mathieu M., Martinez A., Val P. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: a WNT perspective // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015. Vol. 408, P. 156-164.
2. Berthon A., Martinez A., Bertherat J., Val P. Wnt/b-catenin signalling in adrenal physiology and tumor development // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012. Vol. 351. P. 87-95.
3. E. Pignatti, S. Leng, Y. Yuchi, K. Borges, N. Guagliardo, M. Shan, G. Ruiz-Babot, D. Katyiawasam, M. Taketo, J. Mial, P. Barrett, D. Carlone, Breault D. Beta-catenin causes adrenal hyperplasia by blocking zonal transdifferentiation, *Cell Reports* 31 (2020) 107524.
4. El Wakil A., Lalli E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Mol. Cell Endocrinol.* 2011. Vol. 332, N. 1-2. P. 32-37.
5. Alavian-Ghavanini, A.; Ruegg, J. Understanding epigenetic effects of endocrine disrupting chemicals: From mechanisms to novel test methods. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2018, 122, 38–45.
6. La Merrill, M.A.; Vandenberg, L.N.; Smith, M.T.; Goodson, W.; Browne, P.; Patisaul, H.B.; Guyton, K.Z.; Kortenkamp, A.; Cogliano, V.J.; Woodruff, T.J.; et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard



- identification. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2020, 18, 45–57,
7. Papalou O., Kandaraki E.A., Papadakis G., Diamanti-Kandarakis E. *Endocrine Disrupting Chemicals: An Occult Mediator of Metabolic Disease. Front. Endocrinol. (Lansanne).* 2019. Vol. 10. Art. 112.
  8. Яглов В.В., Яглова Н.В. *Основы цитологии, эмбриологии и общей гистологии. Программированное учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария».* М.: КолосС, 2008.
  9. Walczak E., Kuick R., Finco I., Bohin N., Hrycaj S., Wellik D., Hammer G. *Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. Molecular Endocrinology.* 2014. Vol. 28. P. 1471-1486.
  10. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. *Особенности продукции стероидных гормонов надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии // Биомедицинская химия.* 2017. Т.63, №4. С.306-311.
  11. Vandenberg L., Colborn T., Hayes T., Heindel J., Jacobs D., Lee D.-H., Shioda T., Soto A., vom Saal F., Welshons W., Zoeller R., Myers J. *Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses // Endocrine Reviews.* 2012. Vol. 33. P. 378–455.
  12. Brembeck F., Rosario M., Birchmeier W. *Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of  $\beta$ -catenin // Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006. Vol. 16. P. 51-55.
  13. Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Ivanova M.Y., Cheresheva E.V., Yaglov V.V., Lomanovskaya T.A. *Transcription factors  $\beta$ -catenin and Hex in postnatal development of the rat adrenal cortex: implication in proliferation control. Heliyon.* 2021. V.7. e05932

**Сведения об авторах**

**Дибакхан Асланбековна Цомартова**

д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития  
эндокринной системы

НИИ морфологии человека

им. акад. А.П. Авцына

ФГБНУ «Российский научный центр хирургии

им.акад. Б.В. Петровского»

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

Москва, Россия

**E-mail:** dtsomartova@mail.ru

**Наталия Валентиновна Яглова,**

д.м.н., зав. лабораторией развития эндокринной системы

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына

ФГБНУ «Российский научный центр хирургии

им. акад. Б.В. Петровского»

Москва, Россия

**E-mail:** yaglova@mail.ru

**Сергей Станиславович Обернихин,**

д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития  
эндокринной системы, НИИ морфологии человека им. акад.

А.П. Авцына

ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В.  
Петровского», Москва, Россия

**E-mail:** ober@mail.ru

**Марина Юрьевна Иванова**

к.м.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и  
эмбриологии

ФГАОУ ВО Первый МГМУ

им. И.М. Сеченова

Минздрава России

(Сеченовский Университет),

Москва, Россия

**E-mail:** ivanova\_m\_y@mail.ru

**Information about authors**

**Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova,**

D.Med.Sc., Senior Researcher,

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Mor-  
phology of FSBSI “Petrovsky NRCS”,

Professor,

Federal State Autonomous Educational Institu-  
tion of Higher Education I.M. Sechenov First

Moscow State Medical University of the Minis-  
try of Health of the Russian Federation (Seche-  
nov University) Moscow Russian

**E-mail:** dtsomartova@mail.ru

**Nataliya Valentinovna Yaglova,**

D.Med.Sc., Head of Endocrine System Develop-  
ment Laboratory,

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphol-  
ogy of FSBSI “Petrovsky NRCS”,

Moscow, Russian

**E-mail:** yaglova@mail.ru

**Sergey Stanislavovich Obernikhin,**

D.Med.Sc., Senior Researcher,

A.P. Avtsyn Research Institute  
of Human Morphology of

FSBSI “Petrovsky NRCS”,

Moscow, Russian

**E-mail:** ober@mail.ru

**Marina Yuryevna Ivanova,**

PhD, Associate Professor,

Federal State Autonomous Educational Institu-  
tion of Higher Education I.M. Sechenov First

Moscow State Medical University of the Minis-  
try of Health of the Russian Federation (Seche-  
nov University)

Moscow, Russian

**E-mail:** ivanova\_m\_y@mail.ru

**Елизавета Васильевна Черешнева**

к.м.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

(Сеченовский Университет),

Москва, Россия

E-mail: yelizaveta.new@mail.ru

**Elizaveta Vasilyevna Chereshneva,**

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)

Moscow, Russian

E-mail: yelizaveta.new@mail.ru

УДК 612.062

ГРНТИ 76.29.51

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.174-179

**Д. Ю. Жданова, А. В. Чаплыгина, В. И. Ковалев, Н. В. Бобкова**

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИБК РАН)

### **ВЛИЯНИЕ COVID-19 НА ПРОЦЕСС НЕЙРОГЕНЕЗА ВО ВЗРОСЛОМ МОЗГЕ**

*Недавняя вспышка нового коронавирусного заболевания (COVID-19) привела к огромному количеству инфицированных пациентов во всем мире. Данная статья представляет собой краткий обзор современного состояния проблемы неврологических последствий COVID-19, обусловленных нарушением нейрогенеза во взрослом мозге под влиянием РНК-содержащего вируса SARS-CoV-2.*

**Ключевые слова:** нейрогенез, COVID-19, ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), нейровоспаление.

**D. Y. Zhdanova, A. V. Chaplygina, V. I. Kovalev, N. V. Bobkova**

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences" (ICB RAS)

### **IMPACT OF COVID-19 OF ON NEUROGENESIS IN THE ADULT BRAIN**

*The recent outbreak of the novel coronavirus disease (COVID-19) has resulted in a huge number of infected patients worldwide. This article provides a brief overview of the current state of the problem of the neurological consequences of COVID-19 caused by impaired neurogenesis in the adult brain under the influence of the RNA-containing SARS-CoV-2 virus. The reported study was funded by RSF № 18-15-00392.*

**Keywords:** neurogenesis, COVID-19, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), neuroinflammation.

**Целью данной статьи** является обзор последних литературных данных о нарушении нейрогенеза в мозге у больных, перенесших COVID-19

С декабря 2019 года человечество повторно столкнулось со вспышкой тяжелого вирусного заболевания COVID-19, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2, связанного с острым респираторным синдромом, частым осложнением которого является «цитокиновый шторм» с высокой летальностью [1]. Ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) играет решающую роль в патогенезе COVID-19, поскольку обеспечивает связывание вируса с мембраной и проникновение его в клетки человека. Вирусный спайковый белок (*S-protein*) с высокой афинностью связывается ACE2 рецептором, что определяет его высокую патогенность [2]. Клинические проявления инфекции характеризуются высокой межиндивидуальной вариабельностью [3].

SARS-CoV-2, как и другие члены семейства коронавирусов человека (CoVs),

является условно-патогенным возбудителем центральной нервной системы (ЦНС), т.к. помимо высокой экспрессии *ACE2* в клетках и тканях дыхательной, сердечно-сосудистой и репродуктивной систем, а также в желудочно-кишечном тракте и почках, показана значительная экспрессия *ACE2* в различных анатомических областях мозга и ЦНС [4, 5]. *SARS-CoV-2*-опосредованная нейроинвазия может происходить за счет проникновения вируса из крови в сильно васкуляризованные ткани головного мозга, путем трансинаптического переноса от инфицированного нейрона к здоровому, посредством входа из носовой полости через обонятельный нерв, через глазной эпителий, сосудистый эндотелий или за счет миграции лейкоцитов через гематоэнцефалический барьер [5]. В мозге *ACE2* экспрессируется на нейронах, глиальных и эндотелиальных клетках в височной доле коры и гиппокампе - областях мозга, поражаемых нейродегенерацией при болезни Альцгеймера (БА) [6]. Полагают, что *SARS-CoV-2* вызывает повреждения ЦНС путем прямой нейротоксичности или косвенно через активацию иммунного ответа хозяина, что может привести к демиелинизации, нейродегенерации и клеточному старению. Таким образом, *SARS-CoV-2* способен ускорить старение мозга и вызывать развитие нейродегенеративных заболеваний, включая деменцию [7].

Попадание вируса в ЦНС приводит к появлению неврологических симптомов, таких как: спутанность сознания, головная боль, гипогевзия/агевсия, гипосмия/аносмия, головокружение, эпилепсия, острое цереброваскулярное заболевание и др. [6, 8, 9]. Постмертные исследования выявили наличие как антигена *SARS-CoV-2*, так и РНК вируса в ткани мозга пациентов с *COVID-19* [10]. Наряду с этим установлены гипоксические повреждения, активация микроглии, астроглиоз, лейкоцитарная инфильтрация и микрогеморрагии [10-12]. У 33% пациентов без предшествующих нейропсихиатрических заболеваний после выписки из больницы продолжают наблюдаться нервно-психические симптомы, в том числе диссекционный синдром, включающий невнимательность, дезориентацию и плохую координацию движений [13-15].

В настоящее время известно, что нейрогенез способствует восстановлению нормального функционирования нервной системы после инсультов, черепно-мозговых травм мозга, которые являются основными причинами серьезной долгосрочной инвалидности, а снижение нейрогенеза коррелирует с увеличением частоты нейродегенерации и уменьшением регенеративной способности после травм [16, 17]. Поэтому особый интерес представлял анализ имеющихся литературных данных последних лет о влиянии *COVID-19* на процессы нейрогенеза.

Известно, что нейрогенез в мозге взрослых млекопитающих протекает на протяжении всей жизни, главным образом, в двух областях мозга: субвентрикулярной зоне боковых желудочков (*SVZ*) и субгранулярной зоне зубчатой извилины (*SGZ*) в гиппокампе [18]. Образование новых нейронов поддерживается благодаря пролиферации и дифференцировке взрослых нервных стволовых клеток [19], при этом скорость формирования и встраивания новых нейронов в человеческом мозге относительно небольшая [20]. Образованные в *SVZ* нейроны мигрируют на большое расстояние через роstralный миграционный тракт и становятся гранулярными нейронами и перигломерулярными нейронами в обонятельной луковице. Прогениторные нейральные клетки из *SGZ* мигрируют в гранулярный клеточный слой зубчатой извилины и становятся гранулярными нейронами [19]. Также существуют убедительные доказательства продолжающегося нейрогенеза в обонятельном нейроэпителии, однако согласно данным углеродного датирования нейрональной ДНК нейрогенез в обонятельных луковицах у взрослых сильно ограничен [21]. Логично предположить, что поражение нейроэпителиа под влиянием *SARS-CoV-2* вызовет нарушение деятельности обонятельной луковицы, включая и нейрогенез. Результаты недавних исследований с применением методов визуализации головного мозга показали, что anosmia, один из главных симптомов *COVID-19*, который наблюдается у 60% пациентов, способна приводить к дисфункции, а в отдельных случаях даже к атрофии обонятельной луковицы [22]. Было показано, что anosmia связана с нарушениями нейрогенеза в обонятельном эпителии и обонятельной луковице [23].

Проникновение *SARS-CoV-2* в мозг вызывает иммунный ответ, активацию микроглии, астроцитов и других иммунных клеток. Гиперцитокинемия *IL-6*, *IL-10* и *TNF- $\alpha$*  наблюдалась у пациентов с *COVID-19* [20]. Провоспалительные цитокины *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IFN- $\alpha$*  вызывают снижение пролиферации нервных клеток и подавляют нейрогенез в гиппокампе у взрослых [24, 25]. Причем известно, что *IL-1 $\beta$*  ингибирует нейрогенез во время вирусного энцефалита, как во время острой фазы, так и после выздоровления, в то время как *IL-6* подавляет нейрогенез посредством деметилирования/метилирования ДНК [26, 27].

В октябре 2021 г. был опубликован материал, в котором исследователи из США сообщали, что в соответствии с обнаруженным увеличением *IL-1 $\beta$*  и *IL-6* в гиппокампе инфицированных *SARS-CoV-2* хомяков, они наблюдали постепенное снижение числа клеток, экспрессирующих *Ki67*, маркер пролиферации *G0* и даблкортин (*DCX*), маркер нейробластов и незрелых нейронов, а также *DCX/Ki67* клетки, которые почти полностью отсутствовали в *SGZ* [28, 29]. После 5-го дня количество клеток возвращалось к уровню нормы как до инфекции. При этом в ростральном миграционном тракте у инфицированных животных не было изменений в количестве клеток *DCX/Ki67* по сравнению с неинфицированными контрольными группами, что свидетельствует о специфичности эффектов нейровоспаления и *IL-1 $\beta$*  на нейрогенез в зубчатой фасции [29]. В зубчатой извилине гиппокампа как хомяков с *COVID-19*, так и людей меньшее количество клеток экспрессировало даблкортин, что предполагает снижение созревания нейральных прогениторных клеток, либо увеличение гибели нейробластов [29, 30]. Авторы сообщают, что воспаление и гипоксия у людей, индуцированные *SARS-CoV-2*, влияют на области мозга, принимающие участие в регуляции процессов мелкой моторики, обучения, памяти и эмоциональных реакций, и приводят к угнетению нейрогенеза в гиппокампе взрослого человека [29].

В 2020 году *Yiping Lu* и др. [31] сообщили о том, что у пациентов, перенесших *COVID-19*, спустя три месяца после острой фазы заболевания на основании данных МРТ наблюдалось увеличение объемов серого вещества, что авторы связали с усилением нейрогенеза как проявлением нейрокомпенсаторных механизмов во время выздоровления от *COVID-19*. Позднее *Elkhonon Goldberg* и др. [32] опубликовали сообщение, в котором выдвинули предположение, что увеличение регионального объема мозга может указывать скорее на стойкое нейровоспаление, а не на нейрогенез [33, 34]. Впоследствии в своем ответе *Yiping Lu* и др. указали, что воспалительный ответ на нейротропную коронавирусную инфекцию достигает пика в течение первого месяца и может длиться 2-3 месяца, а пациенты, участвующие в их исследовании были отобраны спустя 3 месяца после выздоровления [35]. По-видимому, правы обе группы исследователей, и результат перенесенной коронавирусной инфекции, определяется сохранностью компенсаторных механизмов, которые значительно различаются у разных людей, ослабевают с возрастом и при хронических заболеваниях.

Уменьшение объема гиппокампа, как следствие угнетения нейрогенеза и гибели нейронов, сопровождается различными нейropsychиатрическими расстройствами, к которым относят депрессивное расстройство, БА, болезнь Паркинсона, шизофрению, посттравматическое стрессовое расстройство, когнитивный дефицит, нарушение сна и регуляции настроения [23]. Представленные данные по неврологическим осложнениям у пациентов, перенесших *COVID-2*, могут быть также обусловлены нарушением нейрогенеза в гиппокампе и обонятельной луковице [9, 16, 22] что делает актуальной разработку методов профилактического лечения.

**Результаты и выводы:** таким образом, на сегодняшний день существуют различные пути воздействия *COVID-19* на нейрогенез, протекающий во взрослом мозге. Для понимания механизмов этого влияния и разработки профилактики неврологических последствий заболевания необходимы широкомасштабные исследования.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 18-15-00392. The reported study was funded by RSF № 18-15-00392.*

**Список литературы:**

1. Awogbindin I. O. et al. Microglial implications in SARS-CoV-2 infection and COVID-19: Lessons from viral RNA neurotropism and possible relevance to Parkinson's disease //Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2021. – Т. 15. – С. 199.
2. Bourgonje A. R. et al. Angiotensin - converting enzyme 2 (ACE2), SARS - CoV - 2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID - 19) //The Journal of pathology. – 2020. – Т. 251. – №. 3. – С. 228-248.
3. Jiménez-Ruiz A., García-Grimshaw M., Ruiz-Sandoval J. L. Neurological manifestations of COVID-19 //Gaceta medica de Mexico. – 2020. – Т. 156. – №. 3. – С. 258-258.
4. Desforges M. et al. Human coronaviruses and other respiratory viruses: underestimated opportunistic pathogens of the central nervous system? //viruses. – 2019. – Т. 12. – №. 1. – С. 14.
5. Lukiw W. J., Pogue A., Hill J. M. SARS-CoV-2 infectivity and neurological targets in the brain //Cellular and molecular neurobiology. – 2020. – С. 1-8.
6. Dong M. et al. ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19 //Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2020. – Т. 131. – С. 110678.
7. de Erausquin G. A. et al. The chronic neuropsychiatric sequelae of COVID-19: The need for a prospective study of viral impact on brain functioning //Alzheimer's & Dementia. – 2021. – Т. 17. – №. 6. – С. 1056-1065.
8. Berger J. R. COVID-19 and the nervous system //Journal of neurovirology. – 2020. – Т. 26. – №. 2. – С. 143-148.
9. Lechien J. R. et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study //European Archives of Oto-rhino-laryngology. – 2020. – Т. 277. – №. 8. – С. 2251-2261.
10. Matschke J. et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series //The Lancet Neurology. – 2020. – Т. 19. – №. 11. – С. 919-929.
11. Thakur K. T. et al. COVID-19 neuropathology at columbia university irving medical center/New York presbyterian hospital //Brain. – 2021. – Т. 144. – №. 9. – С. 2696-2708.
12. Ciaccio M. et al. COVID-19 and Alzheimer's Disease //Brain Sciences. – 2021. – Т. 11. – №. 3. – С. 305.
13. Jaywant A. et al. Frequency and profile of objective cognitive deficits in hospitalized patients recovering from COVID-19 //Neuropsychopharmacology. – 2021. – Т. 46. – №. 13. – С. 2235-2240.
14. Méndez R. et al. Short - term neuropsychiatric outcomes and quality of life in COVID - 19 survivors //Journal of internal medicine. – 2021. – Т. 290. – №. 3. – С. 621-631.
15. Méndez R. et al. Long - term neuropsychiatric outcomes in COVID - 19 survivors: A 1 - year longitudinal study //Journal of internal medicine. – 2022. – Т. 291. – №. 2. – С. 247-251.
16. Peng L., Bonaguidi M. A. Function and dysfunction of adult hippocampal neurogenesis in regeneration and disease //The American journal of pathology. – 2018. – Т. 188. – №. 1. – С. 23-28.
17. Xiong Y., Mahmood A., Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury //Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000). – 2010. – Т. 11. – №. 3. – С. 298.
18. Apple D. M., Fonseca R. S., Kokovay E. The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders //Brain Research. – 2017. – Т. 1655. – С. 270-276.
19. Zhao C., Deng W., Gage F. H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis //Cell. – 2008. – Т. 132. – №. 4. – С. 645-660
20. Brann J. H., Firestein S. J. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system //Frontiers in neuroscience. – 2014. – Т. 8. – С. 182.
21. Ernst A., Frisén J. Adult neurogenesis in humans-common and unique traits in mammals //PLoS biology. – 2015. – Т. 13. – №. 1. – С. e1002045.
22. Chiu A. et al. COVID-19-induced anosmia associated with olfactory bulb atrophy

- //*Neuroradiology*. – 2021. – Т. 63. – №. 1. – С. 147-148.
23. Saikarthik J., Saraswathi I., Al-Atram A. A. Does COVID-19 Affect Adult Neurogenesis? A Neurochemical Perspective. – 2021.
  24. Borsini A. et al. Rescue of IL-1 $\beta$ -induced reduction of human neurogenesis by omega-3 fatty acids and antidepressants //*Brain, behavior, and immunity*. – 2017. – Т. 65. – С. 230-238.
  25. Borsini A. et al. Interferon-alpha reduces human hippocampal neurogenesis and increases apoptosis via activation of distinct STAT1-dependent mechanisms //*International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2018. – Т. 21. – №. 2. – С. 187-200.
  26. Garber C. et al. Astrocytes decrease adult neurogenesis during virus-induced memory dysfunction via IL-1 //*Nature immunology*. – 2018. – Т. 19. – №. 2. – С. 151-161.
  27. Kong X. et al. JAK2/STAT3 signaling mediates IL-6-inhibited neurogenesis of neural stem cells through DNA demethylation/methylation //*Brain, behavior, and immunity*. – 2019. – Т. 79. – С. 159-173.
  28. Mandyam C. D., Harburg G. C., Eisch A. J. Determination of key aspects of precursor cell proliferation, cell cycle length and kinetics in the adult mouse subgranular zone //*Neuroscience*. – 2007. – Т. 146. – №. 1. – С. 108-122.
  29. Klein R. et al. COVID-19 induces neuroinflammation and loss of hippocampal neurogenesis //*Research square*. – 2021.
  30. Boldrini M. et al. Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging //*Cell stem cell*. – 2018. – Т. 22. – №. 4. – С. 589-599. e5.
  31. Lu Y. et al. Cerebral micro-structural changes in COVID-19 patients—an MRI-based 3-month follow-up study //*EClinicalMedicine*. – 2020. – Т. 25. – С. 100484.
  32. Goldberg E. et al. The brain after COVID-19: Compensatory neurogenesis or persistent neuroinflammation? //*EClinicalMedicine*. – 2021. – Т. 31.
  33. Wang T., Rumbaugh J. A., Nath A. Viruses and the brain: from inflammation to dementia //*Clinical science*. – 2006. – Т. 110. – №. 4. – С. 393-407.
  34. Song S. K. et al. Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia //*Neuroimage*. – 2003. – Т. 20. – №. 3. – С. 1714-1722.
  35. Lu Y. et al. Letter response to the brain after COVID-19: Compensatory neurogenesis or persistent neuroinflammation? //*EClinicalMedicine*. – 2021. – Т. 31.

**Сведения об авторах**

**Дарья Юрьевна Жданова,**

м.н.с.

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки

«Федеральный исследовательский центр

«Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИБК РАН)

г. Пуцино Московской области

**E-mail:** ddzhdanova@mail.ru

**Алина Вадимовна Чаплыгина,**

м.н.с. ,Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИБК РАН)

г. Пуцино Московской области

**E-mail:** shadowhao@yandex.ru

**Information about authors**

**Daria Yurievna Zhdanova,**

junior researcher,

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center

“Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”

(ICB RAS),

Puchino, Russia

**E-mail:** ddzhdanova@mail.ru

**Alina Vadimovna Chaplygina,**

junior researcher, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”

(ICB RAS)

Puchino, Russia

**E-mail:** shadowhao@yandex.ru

**Владимир Игоревич Ковалев,**

м.н.с.

Институт биофизики клетки Российской академии наук -  
обособленное подразделение Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки «Федеральный  
исследовательский центр

«Пуцинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук» (ИБК РАН)

г. Пушкино Московской области

**E-mail:** kovalev@chemist.com

**Наталья Викторовна Бобкова,**

к.б.н., зав. лаб.

Институт биофизики клетки Российской академии наук -  
обособленное подразделение Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследователь-  
ский центр «Пуцинский научный центр биологических исследо-  
ваний Российской академии наук» (ИБК РАН)

г. Пушкино Московской области

**E-mail:** nbobkova@mail.ru

**Vladimir Igorevich Kovalev,**

junior researcher,

Institute of Cell Biophysics  
of the Russian Academy  
Sciences, Federal Research Center  
“Pushchino Scientific Center for Biological Re-  
search of the Russian Academy of Sciences”  
(ICB RAS)

Pushchino, Russia

**E-mail:** kovalev@chemist.com

**Natalya Viktorovna Bobkova,**

PhD, head of laboratory,

Institute of Cell Biophysics  
of the Russian Academy of Sciences, Federal  
Research Center “Pushchino Scientific Center  
for Biological Research of the Russian Acad-  
emy of Sciences”  
(ICB RAS)

Pushchino, Russia

**E-mail:** nbobkova@mail.ru

УДК 61:615.27, 615.272

ГРНТИ 76.31.33, 76.31.29, 34.39.41

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.179-183

**Д. А. Халикова, С. В. Аньков, Ю. В. Мешкова,  
Н. А. Жукова, Т. Г. Толстикова**

Новосибирский институт органической химии  
им. Н.Н.Ворожцова СО РАН

## **ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕВЗЕИ И ШРОТА КЛЮКВЫ НА СЕРДЦЕ КРЫС**

*В статье исследуется влияние композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы в дозе 70+500 мг/кг на параметры электрокардиограммы, а также структурные и функциональные изменения сердца самок крыс Сток Wistar при длительном введении (28 дней).*

**Ключевые слова:** экстракт, левзея, шрот клюквы, крысы, кардиотоксичность.

**D. A. Khalikova, S. V. Ankov, J. V. Meshkova,  
N. A. Zhukova, T. G. Tolstikova**

Novosibirsk Institute of Organic Chemistry

## **EFFECT OF RHAPONTICUM CARTHAMOIDES AND CRANBERRY MEAL EX- TRACTS COMPOSITION ON RATS HEART**

*The article investigates the effect of Rhaponticum carthamoides and cranberry meal extracts composition at a dose of 70:500 mg/kg on electrocardiogram parameters, as well as structural and functional changes in the heart of female Wistar stock rats with prolonged administration (28 days).*

**Keywords:** extract, leuzea, cranberry meal, rat, cardiotoxicity.

### **Введение**

Пищевые и биологически активные добавки в настоящее время широко распространены как среди спортсменов (включая массовый спорт и спорт высших достижений) так и среди людей, чья работа связана с физическими нагрузками, поскольку способны обеспечить человека дополнительной энергией и необходимыми питательными веществами [1, с. 36]. Тем не менее, в современной истории имеются факты употребления спортсменами различных стимулирующих добавок, в том числе сопровождавшиеся серьезными осложнениями со стороны здоровья, особенно сердечно-сосудистой

системы [2, с. 78-84]. Поэтому необходимо учитывать, что в основе выбора любой добавки должны лежать безопасность, эффективность, соответствие выполняемой физической нагрузке и индивидуальная потребность человека.

На базе лаборатории фармакологических исследований Института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН была разработана композиция, состоящая из экстрактов левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) и шрота клюквы (*Vaccinium oxycoccos*), а также подобрано эффективное соотношение компонентов. Согласно имеющимся литературным данным, как левзея (за счёт главных действующих веществ – фитоэкдистероидов), так и урсоловая кислота обладают анаболической активностью [3, с. 842-855; 4, с. 290-296]. Ранее авторами было исследовано влияние данной композиции на уровень глюкозы крови на фоне физической нагрузки [5, с. 164-168], уровень тестостерона в крови после однократного введения [6, с. 67–72], а также установлено наличие анаболического эффекта [7, с. 45-50].

**Целью настоящего исследования** является изучение влияния длительного введения композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы на электрическую активность и гистологию сердца крыс.

#### **Материалы и методы.**

Исследования проводили на 20 крысах линии *Смок Wistar*, самках весом 220-250г. Животные были получены из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН и содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и стандартному гранулированному корму, с влажностью и температурным контролем, с 12-часовым циклом света и темноты. Все манипуляции с животными проводились в строгом соответствии с законодательством РФ, Приказом Минздрава РФ № 199н от 01.04.2015 г. и положениями Директивы 2010/63/EU Парламента ЕС и Совет Европейского Союза от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

Группы экспериментальных животных:

- 1 группа – интактные водно-твиновый раствор;
- 2 группа – экстракт левзеи в дозе 70 мг/кг;
- 3 группа – экстракт шрота клюквы в дозе 500 мг/кг;
- 4 группа – экстракт левзеи + экстракт шрота клюквы в дозе 70 + 500 мг/кг.

Исследуемые соединения: экстракт шрота клюквы, содержащий 40% урсоловой кислоты (ОХП НИОХ СО РАН) и экстракт левзеи сафлоровидной, содержащий 0.31% экдистена («ООО Экстракты Алтай», г. Барнаул).

Экстракты смешивали механически и растирали в ступке с добавлением дистиллированной воды и твина 80. Все исследуемые вещества вводили ежедневно, однократно, внутривентриально по 0,5 мл на 100 г крысы. Животные контрольной группы получали эквивалентные объёмы растворителя (водно-твинового раствора). Длительность эксперимента составила 4 недели (28 дней).

На протяжении всего эксперимента отслеживали изменения массы тела животных. До начала введения исследуемых соединений, а затем каждые две недели проводили запись электрокардиограммы (ЭКГ). После первой записи ЭКГ животных разделяли на группы по значениям частоты сердечных сокращений (ЧСС) для получения линейных данных.

ЭКГ у бодрствующих крыс регистрировали неинвазивно с использованием прибора *ECCGenie Clinic (Mouse specifics, Inc., USA)* в течение  $5 \pm 3$  минут. Это устройство представляет собой систему на основе *PowerLab*, которая получает сигнал через одно-разовые электроды *footpad* (6,5 см × 7 см), расположенные на платформе записи [8, с. 93-99]. Необработанные сигналы ЭКГ анализировали с использованием программного обеспечения *eMOUSE*. Для каждого животного рассчитывали среднюю частоту сердечных сокращений. По окончании исследования животных возвращали в клетки. В течение всего эксперимента животные не подвергались физической нагрузке.

Животных выводили из опыта путем цервикальной дислокации, после вскрытия сердца фиксировали в 10% забуференном формалине, подвергли стандартной



обработке на гистологическом комплексе («MICROM AP-280», Spain). Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином с последующим исследованием методом световой микроскопии в проходящем свете. В сердце оценивали состояние коронарных сосудов, наличие очаговых поражений миокарда, гипертрофии миокардиоцитов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета *Statistica 8.0*, результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего (*SE*).

### Полученные результаты

ЭКГ – это регистрация и исследование электрических полей, образующихся при работе сердца, которая позволяет получить важную информацию о функциональных и структурных характеристиках миокарда [9, с. 1-40]. Анализ ЭКГ у крыс используется в исследованиях состояния сердечно-сосудистой системы, в том числе при оценке кардиотоксичности, не только в физиологических условиях, но и при введении различных лекарственных средств, а также при моделировании различных заболеваний у животных [10, с. 16-23].

По окончании эксперимента во всех группах наблюдалось увеличение массы тела по сравнению с исходными данными.

В ходе исследования параметров ЭКГ значения ЧСС варьировали незначительно (таблица). Изменений в значениях интервалов PQ, PR, QT, комплексе QRS не было выявлено.

Таблица – Частота сердечных сокращений в минуту у крыс Сток Wistar самок в начале и конце эксперимента

	Водно-твиновый раствор	Экстракт левзеи в дозе 70 мг/кг	Экстракт шрота клюквы в дозе 500 мг/кг	Экстракты левзеи и шрота клюквы в дозе 70+500 мг/кг
Начало эксперимента	388,7 $\pm$ 4,84	401,5 $\pm$ 7,58	451,0 $\pm$ 10,01	454,5 $\pm$ 8,26
Конец эксперимента (через 28 дней)	382,3 $\pm$ 8,95	399,5 $\pm$ 7,79	447,3 $\pm$ 8,41	458,7 $\pm$ 5,24

Следует отметить, что использование неинвазивного метода записи ЭКГ у бодрствующих животных требует их фиксации на электродах платформы, что может стрессировать животное и приводить к изменению характера ЭКГ (например, увеличение ЧСС в ответ на продукцию гормонов надпочечников).

По результатам гистологического исследования сердца у всех самок крыс наблюдали умеренно выраженное полнокровие коронарных сосудов и незначительный интерстициальный отек. В кардиомиоцитах была хорошо выражена поперечная исчерченность, ядра округлой формы, нормохромные. Признаков дегенеративно-некротических изменений не было выявлено.

### Выводы.

1. Введение композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы в дозе 70+500 мг/кг в течении 28 дней не оказывают влияния на массу тела у самок крыс Сток *Wistar*.
2. Длительное введение композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы в дозе 70+500 мг/кг не оказывает влияния на параметры электрокардиограммы сердца крыс Сток *Wistar*.
3. Экстракт левзеи, экстракт шрота клюквы, как при изолированном длительном введении, так и в комбинации не оказывают токсического влияния на структуру тканей сердца и были идентичными во всех группах.

Таким образом, композиция экстрактов левзеи и шрота клюквы в дозе 70+500 мг/кг не проявляет кардиотоксического эффекта.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые проведены исследования влияния длительного введения композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы, содержащих экдистен и урсоловую кислоту на безопасность и кардиотоксичность самок крыс Сток Wistar.

**Список литературы**

1. Мирошникова Ю.В., Высотский И.Э., Выходец И.Т., Деревоедов А.А., Кравчук Д.А., Жолинский А.В., Пушкина Т.А., Феценко В.С. Актуальные вопросы противодействия допингу в спорте в практике врача // Биологически активные добавки в спорте. 2018. С. 36.
2. Angell PJ, Chester N, Sculthorpe N et al. Performance enhancing drug abuse and cardiovascular risk in athletes: implications for the clinician // Br J Sports Med. 2012. V. 46. P. 78-84.
3. Kokoska L., Janovska D. Chemistry and pharmacology of Rhaponticum carthamoides: a review // Phytochemistry. 2009. No. 7 (70). P. 842-855.
4. Lee SU, Park SJ, Kwak HB, Oh J, Min YK, Kim SH. Anabolic activity of ursolic acid in bone: Stimulating osteoblast differentiation in vitro and inducing new bone formation in vivo // Pharmacol Res. 2008. V. 58. P. 290-296.
5. Халикова Д.А., Аньков С.В., Толстикова Т.Г. Влияние композиции экстрактов Левзеи и Шрота клюквы на уровень глюкозы // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT+ME`2021. 2021. С. 164-168.
6. Халикова Д.А., Аньков С.В., Мешкова Ю.В., Толстикова Т.Г. Влияние композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы на уровень тестостерона у мышей // Медицинский академический журнал. 2021. Т. 21. № 4. С. 67–72.
7. Халикова Д.А., Аньков С.В., Мешкова Ю.В., и др. Анаболическая активность растительной композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы // Сибирский научный медицинский журнал. 2021. №. 6. С. 45-50.
8. Mabe AM, Hoover DB. Structural and functional cardiac cholinergic deficits in adult neurturin knockout mice // Cardiovasc Res. 2009. No. 1 (82). P. 93-99.
9. Serhani MA, Kassabi HT, Ismail H, Nujum Navaz A. ECG Monitoring Systems: Review, Architecture, Processes, and Key Challenges // Sensors. 2020. No. 6 (20). P. 1-40.
10. Лычева Н.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г., Рыбакова А.В. Влияние различных видов анестезии на параметры электрокардиограммы у крыс // Лабораторные животные для научных исследований. 2018. №2. С. 16-23

**Сведения об авторах**

**Дарья Александровна Халикова,**  
аспирант  
Новосибирский институт органической химии  
им. Н.Н.Ворожцова СО РАН,  
Новосибирск, Россия  
**E-mail:**dasha.halikova@mail.ru  
**Сергей Владимирович Аньков,**  
к. б. н., научный сотрудник  
Новосибирский институт органической химии  
им. Н.Н.Ворожцова СО РАН  
Новосибирск, Россия  
**E-mail:**sergey.ankov42@gmail.com  
**Юлия Владимировна Мешкова,**  
младший научный сотрудник  
Новосибирский институт органической химии  
им. Н.Н.Ворожцова СО РАН  
Новосибирск, Россия  
**E-mail:**meshkova\_29@mail.ru

**Information about authors**

**Daria Alexandrovna Khalikova,**  
postgraduate,  
Novosibirsk Institute  
of Organic Chemistry  
Novosibirsk, Russia  
**E-mail:**dasha.halikova@mail.ru  
**Sergey Vladimirovich Ankov,**  
PhD,  
Novosibirsk Institute  
of Organic Chemistry  
Novosibirsk, Russia  
**E-mail:**sergey.ankov42@gmail.com  
**Julia Vladimirovna Meshkova,**  
senior researcher,  
Novosibirsk Institute  
of Organic Chemistry  
Novosibirsk, Russia  
**E-mail:**meshkova\_29@mail.ru

**Наталья Анатольевна Жукова,**  
д. м. н., ведущий научный сотрудник  
Новосибирский институт органической химии  
им. Н.Н.Ворожцова СО РАН  
Новосибирск, Россия  
E-mail: gna2004@mail.ru

**Татьяна Генриховна Толстикова,**  
д. б. н., проф., зав. Лаборатории  
Новосибирский институт органической химии  
им. Н.Н.Ворожцова СО РАН  
Новосибирск, Россия  
E-mail: tg\_tolstikova@mail.ru

**Natalia Anatolyevna Zhukova,**  
professor,  
Novosibirsk Institute  
of Organic Chemistry  
Novosibirsk, Russia  
E-mail: gna2004@mail.ru

**Tatiana Genrikhovna Tolstikova,**  
professor,  
Novosibirsk Institute  
of Organic Chemistry  
Novosibirsk, Russia  
E-mail: tg\_tolstikova@mail.ru

УДК 612.617:616,684 – 091.8  
ГРНТИ 34.39.37, 34.39.51  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.183-184

**М. А. Аль Меселмани, Н. А. Глинская**  
Учреждения образования «Полесский государственный  
университет»

### **АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕМЕННИКОВ ПОСЛЕ $\gamma$ - ОБЛУЧЕНИЯ**

*Мы изучили воздействия радиации в малых дозах (0,5 Гр) на сперматогенный эпителий, белых крыс, подсчитывали количество поперечно срезанных извитых семенных канальцев, определяли типы канальцев. Было отмечено снижение количества семенных канальцев, с повреждением клеток сперматогенного эпителия.*

**Ключевые слова:** семенники,  $\gamma$ - облучение, семенные канальцы, сперматогенный эпителий, крысы.

**M.A. Al Meselmani, N.A. Glinskaya**  
Polesky State University

### **ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL CHANGES OF TESTES AFTER $\gamma$ - IRRADIATION**

*We studied the effects of radiation in small doses (0.5 Gy) on the spermatogenic epithelium of white rats, counted the number of transversely cut convoluted seminiferous tubules, and determined the types of tubules. A decrease in the number of seminiferous tubules was noted, with damage to the cells of the spermatogenic epithelium.*

**Keywords:** testes: testes,  $\gamma$ - irradiation, seminal tubules, spermatogenic epithelium, rats.

Тщательный анализ данных отечественной и зарубежной литературы показал, что проблема изучения воздействия ионизирующего излучения на мужскую репродуктивную систему является актуальной проблемой [1,2,3]. Целью работы явилось изучение состояния сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев беспородных белых крыс массой 200-220 гр., подвергнутых однократному внешнему облучению на установке ИГУР в дозе 0,5 Гр.

В опытах на крысах изучали состояния морфологии семенников крыс в разные сроки (3-10-40-60-90 суток) после общего однократного внешнего низкодозового  $\gamma$ -облучения (0,5 Гр, мощность 0,92 Гр/мин). готовили гистологические срезы, окрашивали гематоксилин-эозином и подсчитали количество поперечно срезанных извитых семенных канальцев, определяли типы канальцев. По состоянию сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев были поделены на пять типов, где деструктивные изменения нарастают от II к IV типу. К I типу были отнесены извитые канальцы нормального строения. Количественная оценка морфологических изменений сперматогенеза

проводилась в 100 поперечно срезанных извитых канальцах, В ходе исследования было показано, что в подопытных (облучавшиеся) групп проявлялись существенные изменения состояния сперматогенного эпителия канальцев семенников крыс, изменение обнаружено не только по соотношению между канальцам и I—IV типа но также было достоверное уменьшение в них количества извитых канальцев. Ранним признаком облучения являются морфологические изменения сперматогенного эпителия спустя 72 часа после облучения, так было с 3-х по 10-е сут в семенниках продолжало сохранять уменьшение количества извитых канальцев в поле зрения по сравнению с контролем, И отсутствовали извитые канальцы с нормальным строением (I тип). Спустя 40 суток в срезах семенников крыс обнаруживали канальцы 4-х типов – I, II, III и IV после облучения снижено количество канальцев с нормальным строением, а также с признаками легкого нарушения сперматогенеза.

Через 2 по 3 мес морфологическая картина резко меняется. И хотя в срезах семенников крыс указанных групп присутствуют канальцы всех типов, обнаружены канальцы V типа, с незавершенным сперматогенезом, но без признаков дегенерации половых клеток также может служить доказательством начала восстановительных процессов в семенниках.

В ходе исследования анализ полученных данных позволил Нам оценить состояние клеток сперматогенного эпителия и как результат изменениями структуры канальцевого аппарата половых желёз в условиях низкодозового радиационного воздействия.

Качественная и количественная оценка сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев получена Нами дают возможность предположить основания для лечения мужчин с нарушениями репродуктивной функции после их облучения.

#### Список литературы

1. Аль Меселмани М.А, Шабанов П.Д. Морфофункциональное состояние семенников в условиях радиационного воздействия. *Экологический Вестник*. 2014;27(1): С.45-50.
2. Мамина В.П., Шейко Л.А. Оценка функционального состояния семенников и яичников у крыс, подвергнутых действию шестивалентного хрома в малых дозах. *Проблемы репродукции*. 2017;(1): С.25-28.
3. Liu G, Gong P, Bernstein L.R, Bi Y, Gong S, Cai L. Apoptotic cell death induced by low-dose radiation in male germ cells: hormesis and adaptation. *Critical Rev. in Toxicology*.2007;37(7): P.587-605. <https://doi.org/10.1080/10408440701493061>

#### Сведения об авторах

**Моханад Али Аль Меселмани**

к.б.н, ассистент

каф. Биохимии и биоинформатики Полесского государственного университета

Полеск, Беларусь

**E-mail:** drmohanad@hotmail.com / drmouhand78@inbox.ru

**Наталья Анатольевна Глинская**

к.с.н, доцент заведующий кафедрой Биохимии и биоинформатики

Полесского государственного университета

Полеск, Беларусь

**E-mail:** glinskaia.n@polessu.by

#### Information about authors

**AlMeselmani Mohanad Ali**

PhD, Assistant of the department

of Biochemistry and Bioinformatics of Polessky State University

Polessk, Belarus

**E-mail:** drmohanad@hotmail.com / drmouhand78@inbox.ru, тел: +375255470312

**Natalia Anatolyevna Glinskaya**

PhD, Associate Professor,

Head of the Department of Biochemistry and Bioinformatics, Polessky State University

Polessk, Belarus

**E-mail:** glinskaia.n@polessu.by

УДК 616-036.865:316.35  
ГРНТИ 76.35.35, 34.39.03  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.185-188

С. К. Ахеджак-Нагузе, А. А. Нагузе  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
СКФ ФГБОУ ВО «РГУП»

### МЕДИКО-СОЦИАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНВАЛИДНОСТИ

*В представленной работе отражены основные современные данные о медико-социальных проблемах инвалидности в регионе. Авторами проанализированы показатели первичной инвалидности взрослого населения Краснодарского края.*

*В статье выдвигаются предложения по оптимизации реабилитационных и абилитационных мероприятий для этой категории населения.*

**Ключевые слова:** инвалидность, первичная инвалидность, медико-социальные проблемы инвалидности, реабилитационные и абилитационные мероприятия.

S. K. Akhedzhak-Naguze, A. A. Naguze

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kuban State Medical University" of the Ministry of Health Care  
SCF FSBEI VO "RGUP"

### MEDICAL AND SOCIAL PROBLEMS OF DISABILITY

*The presented work reflects the main current data on medical and social problems of disability in the region. The authors analyzed the indicators of primary and repeated disability of the adult population of the Krasnodar Territory. The article puts forward proposals for optimizing rehabilitation and habilitation measures for this category of the population.*

**Key words:** disability, primary disability, medical and social problems of disability, rehabilitation and habilitation measures.

#### Введение

Проблемы инвалидности определяются большим количеством лиц данной категории. По оценке экспертов ООН – инвалиды составляют около 10% от общей численности населения земного шара. Так, конкретно в России инвалиды составляют около 7% всего населения РФ.

Инвалидность является одним из важнейших показателей здоровья населения и его социально-экономического благополучия. Показатели инвалидности являются отражением как уровня здоровья и качества лечебно-профилактических мероприятий, создания условий восстановления и реабилитации здоровья, так и состояния социальной защиты человека с дефектом здоровья [2, 4].

**Цель работы:** выявить медико-социальные проблемы первичной инвалидности в Краснодарском крае.

#### Материалы и методы

В ходе исследования для анализа показателей первичной инвалидности взрослого населения Краснодарского края использовались данные из информационной справки о деятельности ФКУ «ГБ МСЭ» по Краснодарскому краю Министерства труда России в период с 2017 года по 2019 год [1], статистические материалы Федеральной службы государственной статистики [3] и государственного доклада Администрации Краснодарского края и Министерства здравоохранения Краснодарского края «О реализации государственной политики Краснодарского края в сфере охраны здоровья в 2020 году» [2].

При обработке материалов применялись теоретический, аналитический, статистический методы.

#### Результаты и обсуждения

В Краснодарском крае в 2020 г. зарегистрировано снижение показателя первичной инвалидности во всех возрастных группах взрослого населения (на 10 тысяч населения

соотв. возраста) на 17,2% по сравнению с 2018 г. (в 2020 г. – 56,8, в 2019 г. – 66,9, в 2018 г. – 68,6), что превышает аналогичные средние показатели по РФ на 15,3% и на 13,9% по ЮФО (соответственно, 48,1 и 48,9 на 10 тысяч населения соотв. возраста).

Первичная инвалидность населения трудоспособного возраста (на 10 тысяч населения соотв. возраста) в Краснодарском крае снизилась за три года на 14,8% и составила в 2020 г. – 35,0, что превышает аналогичные средние показатели по РФ на 12,5% и на 7,4% по ЮФО (соответственно 31,1 и 32,6 на 10 тысяч населения соотв. возраста).

Первичная инвалидность населения старше трудоспособного возраста (на 10 тысяч населения соотв. возраста) в 2020 г. в крае составила 99,5, снижение показателя произошло по сравнению с 2018 г. (124,6) на 20,1% (в 2019 г. – 120,9). Однако, первичная инвалидность населения старше трудоспособного возраста в крае превышает аналогичные средние показатели по РФ на 20,9% и ЮФО на 24,2% (соответственно 82,3 и 80,1 на 10 тысяч населения соотв. возраста).

В гендерной структуре впервые признанных инвалидами удельный вес мужчин и женщин без существенной разницы с некоторым преобладанием мужчин (53% и 47% соответственно). Первичная инвалидность среди мужского населения традиционно выше, чем среди женского (66,7 и 48,7 на 10 тыс. соответствующего населения). В динамике за 5 лет показатель первичного выхода на инвалидность среди мужчин снизился на 15,4%, среди женщин – на 20,2% [2].

Среди лиц, впервые признанных инвалидами, удельный вес проживающих в городских поселениях составил 59,0%, в сельской местности – 41,0%.

С 2019 года в структуре первичной инвалидности по группам инвалидности произошли изменения по удельному весу, на первое место вышла III группа (38%) (в предыдущие годы аналогичное место занимала II группа), далее, с минимальной разницей, идет II группа (38%) и I группа (22%), как и в предыдущие годы составила наименьшую долю.

В 2020 году в I группе инвалидности доля злокачественных новообразований и болезней системы кровообращения суммарно занимала 81%, во II группе – 71%, в III группе – 57%.

В структуре причин первичной инвалидности взрослого населения в 2020 г. три первых ранговых места занимали болезни системы кровообращения, злокачественные новообразования, болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани. Удельный вес этих трех классов болезней составил 74% от всех причин.

Основной причиной первичного выхода на инвалидность взрослого населения, как и в предыдущие годы, явились болезни системы кровообращения (19,7 на 10 тыс. взрослого населения) и злокачественные новообразования (18,5). Удельный вес этих двух классов болезней составил 67% всех причин. Среди болезней системы кровообращения, явившихся причиной первичной инвалидности взрослого населения, удельный вес цереброваскулярных болезней составил более 50%, ишемических болезней сердца – около четверти всех причин [2, 3].

Динамика основных причин первичной инвалидности по возрастным контингентам характеризуется значительным снижением показателей как в трудоспособном возрасте, так и у лиц старше трудоспособного возраста. Такая динамика в 2020 году обусловлена не только медико-социальными факторами, отражающими последовательную работу медицинских организаций по реализации вторичной и третичной профилактики заболеваний, но и эпидемиологической обстановкой в связи с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), а также, отсроченным направлением граждан на медико-социальную экспертизу из-за карантинных мероприятий в период пандемии COVID-19 [2].

Реабилитация и социальная адаптация инвалидов является одним из важных направлений решения медико-социальных проблем инвалидности населения. Решение задачи повышения эффективности реабилитационных и абилитационных мероприятий требует единого комплексного подхода к определению целей реабилитационного процесса в каждом конкретном случае в зависимости от причины инвалидности и тесного межведомственного сотрудничества при реализации индивидуальной программы

реабилитации инвалидов. Целесообразно учитывать региональную дифференциацию субъектов Российской Федерации по распространённости инвалидности, а также возрастные и гендерные особенности контингентов инвалидов [4].

В Краснодарском крае определен механизм проведения оценки региональной системы реабилитации и абилитации инвалидов и осуществления контроля за ее проведением. Оценка региональной системы проводится в целях совершенствования и развития системы реабилитации и абилитации инвалидов в Краснодарском крае, формирования комплексного подхода к ее организации.

По состоянию на 1 января 2020 года в Краснодарском крае – 16 комплексных центров реабилитации инвалидов (от 18-ти лет и старше). В учреждениях проводится комплекс мер, способствующих восстановлению способностей инвалидов к бытовой, общественной, профессиональной и иной деятельности в целях их социальной адаптации и интеграции в общество.

В стационарной форме услуги по социальной реабилитации оказывают Тимашевский КЦРИ, Белореченский КЦРИ и краевой комплексный центр реабилитации «Медуница» в ст. Отрадной.

За 2020 год курс социальной реабилитации в стационарах прошли 672 человека. В рамках дополнительных платных услуг обучились вождению автомобиля с ручным управлением 68 инвалидов. За этот период комплексными центрами реабилитации инвалидов обслужен 2701 человек, оказано более 201,2 тыс. услуг.

Курс социальной реабилитации в соответствии с индивидуальными программами реабилитации или абилитации, выданными бюро медико-социальной экспертизы, прошли 2368 инвалидов (88%). Социально-медицинские услуги (массаж, физиотерапия, ЛФК) оказаны 1418 лицам с ограниченными возможностями.

В крае сформирована система обеспечения инвалидов техническими средствами реабилитации в соответствии с краевым перечнем технических средств реабилитации, не вошедшими в федеральный перечень. В 2020 году выдано 719 технических средств реабилитации 613 инвалидам, в том числе 473 тифлосредства и 66 сурдосредств, 180 вспомогательных приспособлений для инвалидов с нарушением функций опорно-двигательного аппарата.

### **Выводы**

Таким образом, в Краснодарском крае в 2020 году регистрируется снижение показателей первичной инвалидности во всех возрастных группах взрослого населения, по сравнению с 2018 г., однако превышают аналогичные средние показатели по РФ и ЮФО.

Формирование нозологической структуры первичной инвалидности взрослого населения Краснодарского края в основном определяли 3 класса болезней: болезни системы кровообращения, злокачественные новообразования, болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани.

Реабилитация и социальная адаптация инвалидов является одним из важных направлений решения медико-социальных проблем инвалидности населения Краснодарского края.

Для решения медико-социальных проблем инвалидности населения необходимо продолжить оптимизацию реабилитационных и абилитационных мероприятий для этой категории населения, в целом для всего населения активизировать профилактику заболеваний – комплекс медицинских и не медицинских мероприятий предупредительно-оздоровительного характера.

### **Заключение**

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

Проблемы инвалидности определяются большим количеством лиц данной категории. В Краснодарском крае в 2020 году регистрируется снижение показателей

первичной инвалидности во всех возрастных группах взрослого населения по сравнению с 2018 г., но их значения превышают аналогичные средние показатели по РФ и ЮФО. Такая динамика в 2020 году обусловлена не только медико-социальными факторами, отражающими последовательную работу медицинских организаций по реализации вторичной и третичной профилактики заболеваний, но и эпидемиологической обстановкой в связи с новой коронавирусной инфекцией (*COVID-19*), а также отсроченным направлением граждан на медико-социальную экспертизу из-за карантинных мероприятий в период пандемии *COVID-19*.

Формирование нозологической структуры первичной инвалидности взрослого населения Краснодарского края в основном определяли 3 класса болезней: болезни системы кровообращения, злокачественные новообразования, болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани. В структуре первичной инвалидности по группам инвалидности по удельному весу на первом месте – III группа, на втором месте – II группа и на третьем месте – I группа.

Для решения медико-социальных проблем инвалидности населения Краснодарского края необходимо продолжить оптимизацию реабилитационных и абилитационных мероприятий для этой категории населения, в целом для всего населения активизировать профилактику заболеваний – комплекс медицинских и не медицинских мероприятий предупредительно-оздоровительного характера.

### Список литературы

1. Информационная справка о деятельности ФКУ «ГБ МСЭ по Краснодарскому краю» Минтруда России в 2019 г. в сравнении с 2017-2018 гг. – 51 с.
2. О реализации государственной политики Краснодарского края в сфере охраны здоровья в 2020 году: государственный доклад // Администрация Краснодарского края, Министерство здравоохранения Краснодарского края; под общей редакцией Е. Ф. Филиппова. – Краснодар: ГБУЗ МИАЦ – 201 с.
3. Федеральная служба государственной статистики: [сайт]. URL: <https://rosstat.gov.ru/folder/13964>, дата обращения 09.03.2022 г.
4. Пузин С.Н., Шургая М.А., Меметов С.С., Ачкасов Е.Е., Погосян Г.Э., Лялина И.В., Омаров С.А., Пузин С.С., Гигинеишвили Д.Н. Инвалидность в XXI веке. Состояние проблемы медико-социальной реабилитации и абилитации инвалидов в современной России. Медико-социальная экспертиза и реабилитация. 2017. № 21 (1–2): С.10-17.

#### Сведения об авторах

**Саида Казбековна Ахеджак-Нагузе**,  
к.м.н., доцент, доцент кафедры  
общественного здоровья,  
здравоохранения и истории медицины  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
Краснодар, Россия  
**E-mail:** [naguzesk@mail.ru](mailto:naguzesk@mail.ru)

#### **Адам Аскерович Нагузе**

обучающийся факультета непрерывного  
образования по подготовке специалистов для судебной  
системы  
СКФ ФГБОУ ВО «РГУП»  
Краснодар, Россия  
**E-mail:** [naguze2014@yandex.ru](mailto:naguze2014@yandex.ru)

#### Information about authors

**Saida Kazbekovna Akhedzhak-Naguzе**,  
Phd, Associate Professor  
of the Department of Public Health,  
Health Care and the History of Medicine  
of the Kuban State Medical University of the Ministry of  
Public Health,  
Krasnodar, Russia  
**E-mail:** [naguzesk@mail.ru](mailto:naguzesk@mail.ru)  
**Adam Askerovich Naguzе**,  
student  
of the Faculty of Continuous education for the training  
of specialists for the judiciary  
SCF FSBEI VO "RGUP",  
Krasnodar, Russia  
**E-mail:** [naguze2014@yandex.ru](mailto:naguze2014@yandex.ru)



УДК 616-036.865:316.35  
ГРНТИ 76.35.35, 34.39.03  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.189-193

С. К. Ахеджак-Нагузе, В. В. Романцов, З. С. Попов,  
А. А. Нагузе  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
СКФ ФГБОУ ВО «РГУП»

## АСПЕКТЫ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНОГО ХАРАКТЕРА, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКИХ ВУЗОВ

*В представленной работе отражены основные современные данные о наличии медико-социальных аспектов, влияющих на уровень здоровья обучающихся в медицинских высших учебных заведениях. Авторами отражена взаимосвязь рассмотренных аспектов и развития соматических антологий у студенческой молодёжи. В статье выдвигаются предложения по оптимизации процесса оздоровления рассматриваемой социальной группы населения.*

**Ключевые слова:** общественное здоровье, студенческая заболеваемость, факторы риска, демографическая статистика, медико-социальные аспекты развития патологий.

S. K. Akhedzhak-Naguze, V V Romantsov, Z S Popov,  
A. A. Naguze  
FSBEI HE KubSMU of the Ministry of Health of Russia  
SCF FSBEI VO "RGUP"

## MEDICAL AND SOCIAL ASPECTS AFFECTING THE MORBIDITY OF MEDICAL UNIVERSITY STUDENTS

*The presented work presents basic data on the availability of medical services that affect the level of health of students in medical higher educational institutions. The authors reflect the relationship of the considered problems and the development of somatic anthologies among student youth. The article puts forward proposals for optimizing the process of improving the social group of the population.*

**Key words:** public health, student morbidity, risk factors, demographic statistics, medical and social aspects of the development of pathologies.

### Введение

В условиях современного общества, молодых людей, проходящих обучение в ВУ-Зах, следует рассматривать как отдельную группу населения с особыми условиями и образом жизни [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения в течении последних десяти лет отмечается стойкий рост общей студенческой заболеваемости [2]. Ввиду этого, сохранение здоровья студентов является одной из приоритетных задач планирования системы высшего образования в Российской Федерации [3]. Особенно, это актуально для студентов-медиков, поскольку они являются резервом медицинских кадров страны и наиболее подвержены появлению у них факторов риска серьёзных соматических патологий.

Для грамотного и полноценного понимания структуры заболеваемости среди обучающихся как отдельной группы населения следует подробно рассмотреть медико-социальные аспекты жизни, негативно сказывающиеся на здоровье молодых людей [1]. Это позволит более компетентно подойти к планированию профилактических и лечебных мероприятий в отношении обучающихся.

**Цель работы:** провести анализ медико-социальных аспектов заболеваемости студентов медицинских вузов.

### Материалы и методы

Исследование проводилось в виде анонимного электронного анкетирования посредством социальной сети «ВКонтакте». Анкета имела структуру, позволяющую выявить уровень заболеваемости среди студентов и факторы риска, влияющие на него.

Всего в анкетировании приняли участие 4211 студентов лечебного и педиатрического факультетов из пяти высших медицинских учебных заведений (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России), среди которых 3249 человек (77,16% от общего числа анкетированных) имели различного рода клинически подтверждённые соматические патологии. Именно они и составили исследовательскую группу.

Полученные в ходе исследования данные были обработаны при помощи программы *MSExcel 2015* пакета *Microsoft Office*.

### Полученные результаты

Средний возраст студентов, имеющих заболевания, составил 23 года. Среди них 71,6% (2326 человек) составляли девушки и 28,4% (923 человека) юноши. Причём 18,8% (612 человек) из общего числа состоят в браке, 9% (291 человек) проживают в гражданском браке и 72,2% (2346 человек) не состоят в длительных отношениях. Основным источником дохода для анкетирруемых в 41% (1332 человека) является помощь родителей, в 26% (847 человек) – стипендия, в 24,7% (802 человека) – заработная плата и в 8,2% (268 человек) – социальные пособия. Исходя из указанных данных, можно сказать, что социальный портрет среднестатистического студента-медика, страдающего от заболеваний, выглядит следующим образом – девушка 23 лет, не состоящая в продолжительных отношениях, находящаяся на содержании у родителей.

Рассматривая условия, негативно влияющие на ориентированность обучающихся в медицинских вузах к здоровому образу жизни, следует отметить, что лишь 28% (911 человек) анкетирруемых регулярно следят за здоровьем, а 72% (2338 человек) обращаются за медицинской помощью только в случае ухудшения самочувствия и выявления заболеваний. Наличие гиподинамии у себя отметили 68,7% (2232 человека), а дополнительными занятиями по физической культуре занимаются только 21,4% (698 человек). Кроме того, поддержанию здорового образа жизни, по мнению студентов, в 7,6% (247 человек) препятствует недостаток времени, в 28% (911 человек) – отсутствие силы воли, в 22,8% (742 человека) – отсутствие необходимых условий, в 10,3% (334 человека) – финансовые трудности, в 12,8% (416 человек) – отсутствие желания. Лишь 18,5% проанкетированных студентов стараются придерживаться здорового образа жизни.

Если же говорить о структуре студенческой заболеваемости, то лидирующее место занимают патологии со стороны ЖКТ, имеющиеся у 32,4% (1053 человека) анкетирруемых. У данной группы студентов в ходе исследования обнаружены следующие значимые вредные факторы: нерациональное питание (74,2%), нарушение режима приёма пищи (82%), стресс (19,5%), курение (24,7%), бесконтрольный приём НПВС (3,8%), перенесённые ранее паразитарные заболевания (0,2%) (рис. 1).

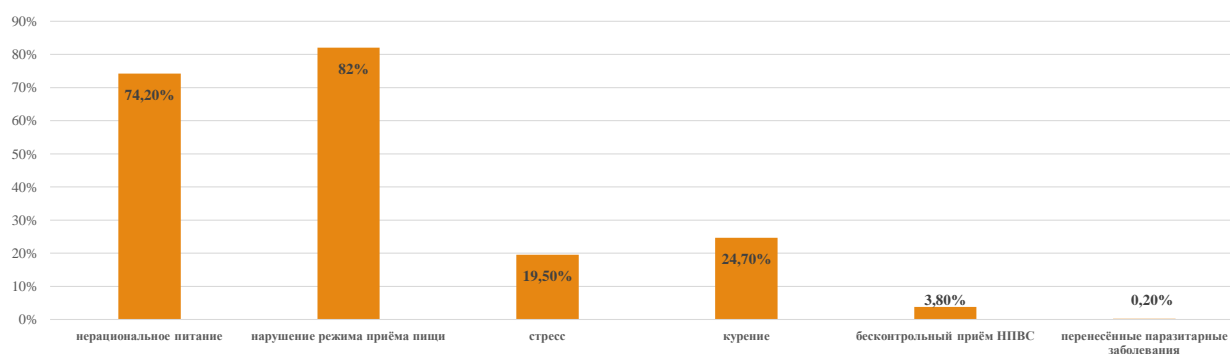


Рисунок 1 – Структура факторов риска у студентов с патологиями ЖКТ

#### Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

На долю больных сердечно-сосудистыми заболеваниями приходится 21,2% (689 человек). В данной группе значимыми факторами риска являлись: недостаточный уровень физической нагрузки (69%), курение (67,4%), стресс (24,1%), наследственность (12,6%), ожирение (5,8%) (рис. 2).

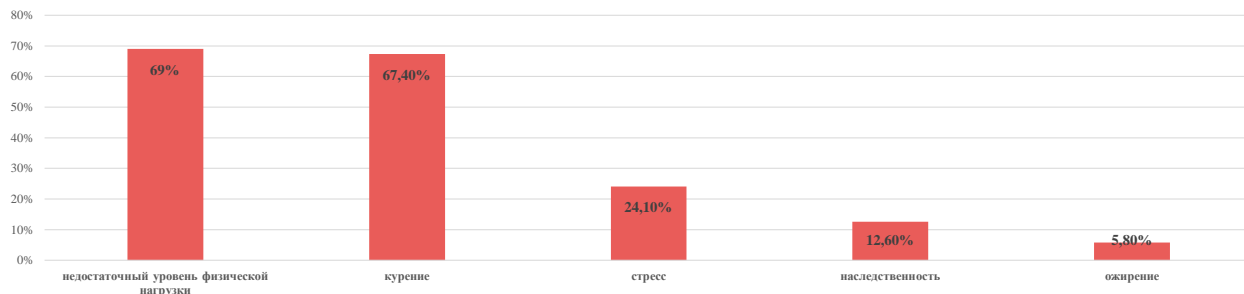


Рисунок 2 – Структура факторов риска у студентов с патологиями сердечно-сосудистой системы

Заболевания со стороны ЛОР-органов установлены у 20,1% (654 человека) анкетированных. Значимые факторы риска, имеющиеся у данной группы анкетированных: ослабленный иммунитет (81,2%), вредные привычки (37,4%), искривленная носовая перегородка (22,6%), аномалии в строении ЛОР-органов (4,5%) (рис. 3).

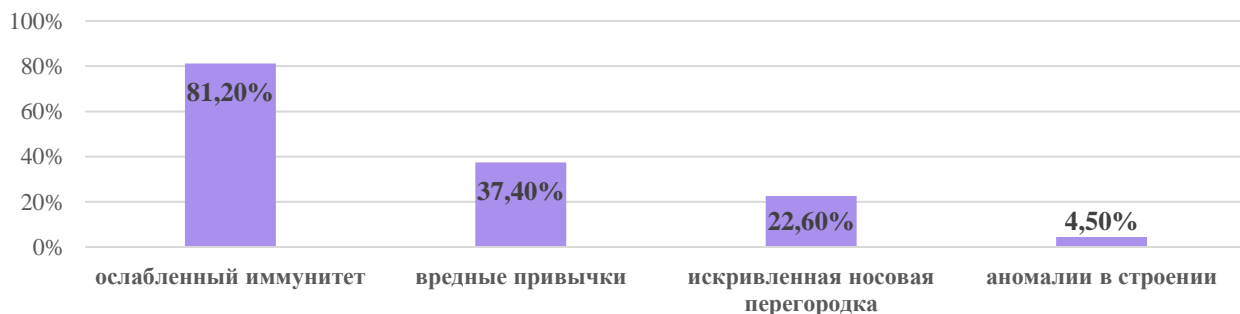


Рисунок 3 – Структура факторов риска у студентов с ЛОР-патологиями

От стабильного нарушения зрения страдает 19,1% (623 человека). Причём в 100% значимым фактором риска выступает длительное переутомление зрительного анализатора (в том числе и мониторами компьютеров и смартфонов) и чтение при недостаточном освещении.

Проблемы со стороны костно-мышечной системы выявлены у 12,4% (403 человека). Значимыми факторами риска у данной группы выступают: травмы бытового и профессионального характера (74,2%), неправильная осанка (35,9%), воспалительные заболевания системы (3,1%) (рис. 4).

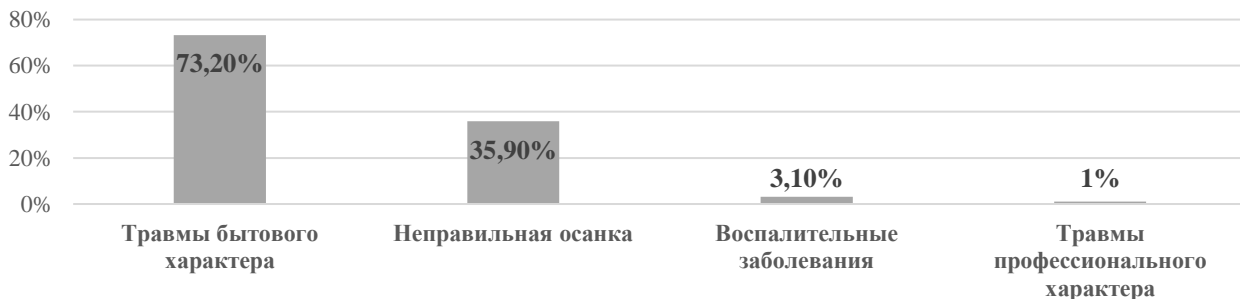


Рисунок 4. Структура факторов риска у студентов с патологиями костно-мышечной системы

Патологии со стороны ЦНС диагностированы у 11,2% (364 человека), а заболеваниями мочевыделительной системы страдают 8% (261 человек). Для этих двух групп, анкетированных специфических значимых факторов риска в ходе исследования выявлено не было.

### Выводы

Как показало исследование, наиболее подверженными негативному воздействию медико-социальных факторов среди современных студентов являются именно девушки, не состоящие в продолжительных отношениях. Причём зачастую у них отсутствует стойкая мотивация к поддержанию здорового образа жизни. Основной причиной тому является отсутствие силы воли и необходимых условий. Кроме того, более чем у половины обучающихся в высших медицинских учебных заведениях имеется выраженная гиподинамия.

Значительный процент соматических патологий, встречающихся на современном этапе у студентов высших учебных медицинских заведений приходится на заболевания органов пищеварения, что связано с нарушениями режима и рациона питания. Менее всего в студенческой популяции выражены заболевания ЦНС и мочеполовой системы, что возможно связано с отсутствием у анализируемой группы населения специфических значимых факторов риска.

### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: полученные в ходе исследования данные могут и должны служить информационной базой для планирования программ профилактики и оздоровления студентов-медиков. Основными задачами данных программ должны являться повышение ориентированности на здоровый образ жизни и усиление борьбы с вредными привычками. Должен быть организован прицельный скрининг с упором на выявленные в ходе исследования медико-социальные аспекты заболеваемости учащихся медицинских вузов.

### Список литературы

1. Кобякова О.С., Деев И.А., Лукашова А.М., Старовойтова Е.А., Куликов Е.С. Распространенность факторов риска хронических неинфекционных заболеваний в популяции студентов // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2016. – Т. 15. – № 3. – С. 74-80.
2. Кардангушева А.М., Эльгарова Л.В., Эльгаров А.А. Основные факторы риска хронических неинфекционных заболеваний у студентов: распространенность и многолетние тенденции // *Клиническая медицина*. – 2013. – № 2. – С. 25-28.
3. Алексеенко С.Н., Гайворонская Т.В., Ахеджак-Нагузе С.К. Современные образовательные технологии для повышения качества образования и содействия трудоустройству выпускников // *Материалы междунар. конф. «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии», «New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology» IT + ME`*, 2018.– Крым, Ялта-Гурзуф, с 01 по 11 июня 2018 года. – 2018. – С. 25-34.

#### Сведения об авторах

**Саида Казбековна Ахеджак-Нагузе**,  
к.м.н., доцент, доцент кафедры  
общественного здоровья,  
здравоохранения и истории медицины  
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России  
Краснодар, Россия  
**E-mail:** naguzesk@mail.ru

#### Information about authors

**Saida Kazbekovna Akhedzhak-Naguze**,  
Phd, Associate Professor  
of the Department of Public Health,  
Health Care and the History of Medicine  
of the Kuban State Medical University of the Ministry of  
Public Health,  
Krasnodar, Russia  
**E-mail:** naguzesk@mail.ru

**Виктор Викторович Романцов,**  
обучающийся лечебного факультета  
ФГБОУ ВО КубГМУ  
Минздрава России,  
Краснодар, Россия

**E-mail:** [pandrodor777@gmail.com](mailto:pandrodor777@gmail.com),

**Захар Семёнович Попов,**  
обучающийся лечебного факультета  
ФГБОУ ВО КубГМУ  
Минздрава России,  
Краснодар, Россия

**E-mail:** [jake\\_muller@icloud.com](mailto:jake_muller@icloud.com)

**Адам Аскерович Нагузе**  
обучающийся факультета непрерывного  
образования по подготовке специалистов для судебной

системы  
СКФ ФГБОУ ВО «РГУП»

Краснодар, Россия

**E-mail:** [naguze2014@yandex.ru](mailto:naguze2014@yandex.ru)

**Viktor Viktorovich Romantsov,**  
student of the medical faculty  
FSBEI HE KubSMU  
of the Ministry of Health of Russia,  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** [pandrodor777@gmail.com](mailto:pandrodor777@gmail.com)

**Zakhar Semyonovich Popov,**  
student of the medical faculty  
FSBEI HE KubSMU  
of the Ministry of Health of Russia,  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** [jake\\_muller@icloud.com](mailto:jake_muller@icloud.com)

**Adam Askerovich Naguze,**  
student

of the Faculty of Continuous education for the training  
of specialists for the judiciary

SCF FSBEI VO "RGUP",

Krasnodar, Russia

**E-mail:** [naguze2014@yandex.ru](mailto:naguze2014@yandex.ru)

УДК 616-091.8  
ГРНТИ 76.03.49, 76.03.33  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.193-195

**А.Е.Карпова, Л.Г.Созаева, И.П.Шабалова**  
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия  
непрерывного профессионального образования  
Минздрава РФ»

## **ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ НЕОПУХОЛЕВЫХ ПОРАЖЕНИЙ И ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКА.**

*Определение значимости традиционной цитологии, жидкостной цитологии и иммуноцитохимического исследования в диагностике неопухолевых поражений и опухолей яичника.*

**Ключевые слова:** опухоли яичника, неопухолевые поражения яичника, жидкостная цитология, иммуноцитохимия

**A.E.Karpova, L.G.Sozaeva, I.P.Shabalova**  
Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the  
Ministry of Health

## **THE CYTOLOGICAL EXAMINATION IN THE DIAGNOSTICS OF NON-TUMOR LESIONS AND OVARIAN TUMORS.**

*Determination of the significance of conventional cytology, liquid-based cytology and immunocytochemical studies in the diagnosis of non-tumor lesions and ovarian tumors.*

**Key word:** Ovarian tumors, non-tumor lesions of the ovary, liquid-based cytology, immunocytochemistry

**Цель исследования:** совершенствование цитологической диагностики опухолей и неопухолевых заболеваний яичника.

### **Введение**

В качестве первичной диагностики патологических состояний яичника материалом для цитологического исследования чаще всего являются жидкость из брюшной и плевральной полостей и пунктат, полученный из Дугласова пространства. Опухоли яичников многообразны по строению и морфологическая верификация, в том числе срочная интраоперационная, имеет важное значение для определения объема оперативного вмешательства. В настоящее время помимо традиционного цитологического

исследования используют метод жидкостной цитологии (ЖЦ), однако возможности ЖЦ при патологии яичников изучены недостаточно.

### Материалы и методы

В работу были включены 31 пациентка (52 яичника) в возрасте 20-79 лет с подозрением на патологию яичника. 25 пациенткам было проведено оперативное вмешательство в объеме гистерэктомии с придатками и был взят соскоб цитощеткой с послеоперационного материала яичников. 6 пациенткам была проведена пункция плевральной полости и взяты образцы экссудата для цитологического исследования. У 18 пациенток (34 яичника) часть полученного материала сначала наносили на предметное стекло для традиционного цитологического исследования (традиционная цитология (ТЦ), а остальной материал помещали в виалу с консервирующей средой для ЖЦ. У 7 пациенток (12 яичников) полученный материал сразу помещали в контейнер с консервирующей жидкостью, у 6 пациенток материал только распределяли на предметном стекле для ТЦ. Препараты для ЖЦ готовили методом центрифугирования (36 образцов) и «ручным» методом (10 образцов). Препараты для ТЦ окрашивали по Паппенгейму, для ЖЦ – по Папаниколау на аппарате для окрашивания. По результатам цитологического исследования пациенткам с подозрением на злокачественное новообразование яичника для подтверждения диагноза выполняли ИЦХИ с маркерами: СА-125, СК7, ВегЕР4, WT-1.

### Результаты и обсуждение

При проведении сравнительного анализа оценки качества цитологического материала, обнаружено, что препараты, приготовленные методом ЖЦ, часто были малоклеточны: при использовании «ручного» метода получено 5 неинформативных препаратов, при использовании цитоцентрифуги – 7. Мазки для ТЦ были более клеточными, однако присутствовали затрудняющие оценку клеточного состава элементы крови и чаще встречались структуры из плохо просматриваемых клеток. По этой причине в некоторых случаях совместный просмотр препаратов ТЦ и ЖЦ позволил уменьшить количество заключений: «неинформативный материал». При гистологическом исследовании биопсийного материала получены следующие результаты: без морфологической патологии яичника – 15 наблюдений (совпадение с ТЦ отмечено в 14 наблюдениях, с ЖЦ – в 13), неопухолевые поражения яичника – 26 (соответственно 14 и 15), опухоли доброкачественные и пограничные – 9 наблюдений (3 и 6), злокачественные новообразования – 6 наблюдений (совпадение с ТЦ – 6, ЖЦ не проводилась). Во всех наблюдениях, где по результатам цитологического исследования было дано заключение «подозрение на аденокарциному яичника», морфологический диагноз был подтвержден при ИЦХИ. Таким образом отмечена корреляция наличия изменений в цитологическом материале с результатами гистологического исследования.

### Выводы

Применение комплексного цитологического исследования (традиционной и жидкостной цитологии и при необходимости иммуноцитохимического метода) расширяет возможности диагностики поражений яичника и способствует оптимизации объемов оперативных вмешательств.

#### Сведения об авторах

*Асель Ерсайновна Карпова*

*ведущий специалист*

*Кафедра клинической лабораторной диагностики*

*ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава РФ»,*

*Москва, Россия*

*E-mail: aselya2008@yandex.ru*

#### Information about authors

*Asel Ersainovna Karpova*

*Senior Researcher*

*Department of Clinical Laboratory Diagnostics, “Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation”,*

*Moscow, Russia;*

*E-mail: aselya2008@yandex.ru*

**Лариса Габитовна Созаева**

*к.м.н., доцент*

*Кафедра акушерства и гинекологии ФГБОУ ДПО  
«Российская медицинская академия непрерывного  
профессионального образования Минздрава РФ»,  
Москва, Россия;*

**E-mail:** *aselya2008@yandex.ru*

**Ирина Петровна Шабалова**

*д.м.н., профессор*

*Кафедра клинической лабораторной диагностики  
ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непре-  
рывного профессионального образования Минздрава  
РФ»,*

*Москва, Россия;*

**E-mail:** *aselya2008@yandex.ru*

**Larisa Gabitsova Sozaeva**

**Candidate of Medical Sciences, Associate Professor**

*Department of Obstetrics and Gynecology, “Russian  
Medical Academy of Continuous Professional Educa-  
tion of the Ministry of Health of the Russian Federa-  
tion”, Moscow, Russia.*

**E-mail:** *aselya2008@yandex.ru*

**Irina Petrovna Shabalova**

*M.D. Professor*

*Department of Clinical Laboratory Diagnostics, “Rus-  
sian Medical Academy of Continuous Professional Ed-  
ucation of the Ministry of Health of the Russian Feder-  
ation”, 1*

*Moscow, Russia;*

**E-mail:** *aselya2008@yandex.ru*



УДК 577.115 + 57.017.3:597.2/.5(261.4)  
ГРНТИ 31.27.15, 34.03.25, 34.33.33  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.196-203

С. А. Мурзина, В. П. Воронин, Д. В. Артеменков,  
А. М. Орлов  
Институт биологии – обособленное подразделение  
Федерального исследовательского центра  
«Карельский научный центр Российской академии наук»  
Всероссийский научно-исследовательский институт  
рыбного хозяйства и океанографии  
Институт океанологии им. П. П. Ширшова РАН  
(ИО РАН)

**ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ  
КИСЛОТ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РЫБ МОРЯ ИРМИНГЕРА  
(СЕВЕРНАЯ АТЛАНТИКА) К ГЛУБОКОВОДНОМУ ОБРАЗУ ЖИЗНИ**

*Проведено липидное профилирование и исследовать липидный статус у некоторых видов мезопелагических видов рыб - *Lampanyctus macdonaldi* и *Bathylagus euryops* моря Ирмингера, являющихся неотъемлемыми компонентами функционирования водных экосистем и различающихся по местообитаниям, жизненным циклом, специфике развития, внутривидовой структуре и пищевой специализации. Впервые установлены изменения количественных и качественных показателей липидного метаболизма, определяющие специфику адаптивного ответа рыб к глубоководному образу жизни.*

**Ключевые слова:** липиды, жирные кислоты, биохимические адаптации, стресс, глубоководные рыбы, Северная Атлантика.

S. A. Murzina, V. P. Voronin D. V. Artemenkov, A M Orlov  
Institute of Biology of the Karelian research Centre of the Russian Academy of Sciences  
Russian Federal Research Institute Of Fisheries and Oceanography P.P.  
Shirshov Institute of Oceanology of the Russian Academy of Sciences

**ECOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ADAPTATIONS OF LIPIDS AND FATTY  
ACIDS CERTAIN FISH SPECIES FROM THE IRMINGER SEA TO DEEPWATER  
HABBIT**

*Lipid profiling and identification of lipid status were carried out in certain species of mesopelagic fish species - *Lampanyctus macdonaldi* and *Bathylagus euryops* of the Irminger Sea, which are manifested as integral components of the aquatic ecosystem and prevail in habitat, life cycle, specific development, intraspecific degree and the presence of specialization. For the first time, changes in the lipid profiles and the contents, observed by the specific adaptive sensitivity of fish to a deep-sea lifestyle, have been revealed.*

**Key words:** lipids, fatty acids, biochemical adaptations, stress, deep-water fishes, North Atlantic

**Введение**

Колоссальная площадь и большие глубины Мирового океана сосредотачивают в себе огромные запасы различных биологических ресурсов, в том числе и гидробионтов. Несмотря на то, что основным горизонтом морского промысла является относительно хорошо изученный верхний 200-метровый эпипелагический слой океана [1], наиболее перспективным, с точки зрения оценки биоразнообразия, биомассы и биопродуктивности, является более глубокий мезопелагический слой (200-1000 метров) [2]. Особенно малоизученными продолжают оставаться мезопелагические гидробионты северных морей Арктики [3] по сравнению с таковыми в тропических и субтропических регионах, Антарктиде [1,4].

Их экологическая роль, прежде всего, состоит в крайне значимом перераспределении органического вещества (круговорот углерода) от высокопродуктивной эпипелагиали к мезо-, бати- и абиссопелагиали, за счёт суточных вертикальных миграций у многих видов рыб [5,6]. Многие мезопелагические виды являются важными объектами



питания промысловых рыб [7,8,9]. В настоящее время особое внимание к изучению мезопелагических гидробионтов обусловлено их повышенной биологической продуктивностью, экологической значимостью и содержанием в организме уникальных биологически активных веществ, имеющих большой потенциал для получения биологически активных веществ целевого назначения – лечебно-профилактического, технического (кормовые компоненты для аквакультуры) и других [1].

Одними из важнейших метаболических компонентов, вносящих значительный вклад в развитие адаптаций гидробионтов при обитании в экстремальных условиях, а также в круговороте углерода между океаническими слоями, являются липиды и их жирнокислотные компоненты (10,11,12).

### Цель работы

В настоящей работе проводится липидное профилирование и исследование липидного статуса некоторых видов мезопелагических видов рыб - *Lampanyctus macdonaldi* и *Bathylagus euryops* моря Ирмингера, являющихся неотъемлемыми компонентами функционирования водных экосистем и различающихся по жизненным циклам. Эти различия могут влиять на вариабельность количественных и качественных показателей липидного метаболизма и специфику адаптивного ответа рыб к глубоководному образу жизни.

### Материалы и методы

Сбор образцов мышечной ткани мезопелагических гидробионтов северных широт – *L. macdonaldi* и *B. euryops* был проведен в рамках научно-исследовательских работ в море Ирмингера (59°60'–64°60' с.ш., 26°20'–41°50' з.д.) в летний период (июнь-июль) на борту НИС «Атлантида». Отбор биоматериала проводился путём траления на глубинах 250, 375, 650 и 700 метров в районе регулирования НЕАФК, рыболовной зоне Гренландии и исключительной экономической зоне Исландии [13].

Экстракцию общих липидов (ОЛ) из мышечной ткани проводили по методу Фолча [14]. Качественное и количественное определение индивидуальных липидных классов – общих фосфолипидов (ФЛ), моноацилглицеринов (МАГ), диацилглицеринов (ДАГ), триацилглицеринов (ТАГ), холестерина (ХС), эфиров холестерина (ЭХС), свободных жирных кислот (СЖК) и восков – вели методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с использованием комплекса оборудования для ВЭТСХ – САМАГ (Швейцария): полуавтоматического аппликатора *Linomat 5*, хроматографической камеры для элюирования *ADC2*, денситометра *TLC Scanner 4* в режиме адсорбции при длине волны 360 нм [15]. Качественная идентификация липидов проводилась по стандартам соответствующих компонентов (*Sigma-Aldrich*, США) с учётом значений *R<sub>f</sub>*.

Качественный и количественный анализ жирных кислот ОЛ (ЖК) осуществляли методом газовой хроматографии (ГХ) с масс-селективным детектором (МСД) и пламенно-ионизационным детектором (ПИД), предварительно подвергнув смесь ОЛ кислотному метилированию [16]. Для определения качественного состава полученной смеси метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) проводили их разделение на ГХ с моно-квадрупольным масс-селективным детектором «Маэстро-αМС» (Сайтегра, Россия). Фракционирование осуществлялось в течение 120 минут в изотермальном режиме (200°C) на капиллярной колонке *Zebron ZB-FFAP (Phenomenex, Torrance, CA, USA)* с использованием гелия в качестве подвижной фазы. Детектирование МЭЖК осуществлялось в режиме *SIM/SCAN*: режим *SIM* – для регистрации ЖК, входящих в состав аналитических стандартов – *Supelco 37, Bacterial Acid Methyl Ester (BAME) Mix u PUFA №1 Marine source (Sigma-Aldrich, США)*; режим *SCAN* – для поиска и идентификации уникальных жирнокислотных компонентов в диапазоне 50-400 *m/z*. Полученные данные были проанализированы с использованием ПО «Маэстро Аналитик v. 1.025» и библиотекой *NIST*. Далее, после качественной идентификации на ГХ-МС, количественный анализ проводили на ГХ-ПИД «Хроматэк-Кристалл-5000.2» (Хроматэк, Йошкар-Ола,

Россия). Все параметры были идентичными между ГХ-МС и ГХ-ПИД, за исключением подвижной фазы (гелий и азот, соответственно). Исследование было выполнено на базе лаборатории экологической биохимии и с использованием оборудования ЦКП ФИЦ «Карельский научный центр Российской академии наук».

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием языка программирования R (версия 3.6.1.) в среде разработки «RStudio» с использованием дополнительных пакетов: «*readxl*» (версия 1.3.1), «*tidyverse*» (версия 1.3.0), «*corrgram*» (версия 1.13), «*factoextra*» (версия 1.0.6), «*quantreg*» (версия 5.52), «*cowplot*» (версия 1.1.1), «*vegan*» (версия 2.5–7). Ординацию видов в многомерном пространстве проводили с использованием алгоритма неметрического многомерного шкалирования (NMDS) для исследованных признаков. Для определения наилучшей метрики расстояний в многомерном пространстве признаков использовали коэффициент корреляции Спирмена между матрицами дистанций. Достоверность различий липидных и жирнокислотных компонентов оценивали с использованием непараметрического теста Краскела-Уолиса, а между отдельными компонентами – тестом ранговых сумм Вилкоксона-Манна-Уитни [17]. Для выявления различий между горизонтами глубин по жирнокислотному спектру использовалась оценка многомерной вариации дисперсий в группах наблюдений и рандомизированный перестановочный тест для анализа соответствий [18]. Различия между отдельными липидными показателями считались достоверными при  $p \leq 0.05$ . Отношение вариации значений между группами к вариации внутри группы оценивалось при помощи алгоритма ANOSIM, а процент сходства между группами – с использованием анализа SIMPER. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена (Кабаков, 2016).

### Полученные результаты

Установлено, что *L. macdonaldi* характеризуется наибольшим содержанием общих липидов (ОЛ) в мышечной ткани. Данный показатель варьирует в диапазоне 25.22–46.28% сухого вещества при градиенте глубин 250–700 метров со средним значением 36.79% по всему разрезу исследованных глубин. Для *B. euryops* средние значения по разрезу глубин содержания ОЛ в мышцах (16.71% сухого вещества, соответственно), однако отмечены различия в их накоплении на отдельных горизонтах: 375 метров – 22.32%, соответственно; 700 метров – 17.18%. Проанализирована динамика изменения содержания ОЛ в мышечной ткани у исследуемых видов рыб при увеличении горизонтов глубин. На основе регрессионных моделей выявлена тенденция к снижению содержания ОЛ с глубиной у *B. euryops* ( $R^2 = 0.01$ ) и *L. macdonaldi* ( $R^2 = 0.07$ ).

Установленное нами высокое содержание ОЛ в мышцах *Lampanyctus macdonaldi* является характерной особенностью миктофовых рыб [19]. Видоспецифичность накопления и динамика ОЛ в мышечной ткани на разных глубинах у *L. macdonaldi* и *B. euryops*, связана с различиями в жизненных циклах, способностью к осуществлению суточных вертикальных миграций, а также с адаптационными процессами к комплексу абиотических факторов (температура, солёность, специфический фотопериод, давление и т. д.) в условиях обитания на больших глубинах [6,13,20,21]. Так, например, известно, что виды рода *Lampanyctus* характеризуются способностью к суточной вертикальной миграции (хотя внутри рода встречаются и немигрирующие виды – *L. regalis*), а для *B. euryops* установлено наличие онтогенетической миграции в более глубокие слои водной толщи с возрастом [6]. Значительное влияние на процессы накопления, переноса и трансформации липидов оказывает также пищевая специализация рыб. Выявленные в исследовании различия в накоплении ОЛ на отдельных глубинах также указывают на отличия в пищевом рационе и интенсивность питания организма, а также на общее снижение кормовой базы на больших глубинах [13,20].

Проведено исследование распределения *B. euryops* и *L. macdonaldi* в многомерном пространстве изучаемых признаков (индивидуальных липидных классов) согласно алгоритму неметрического многомерного шкалирования (NMDS). Анализ ANOSIM установил достоверные различия ( $R = 0.6851$ ,  $p < 0.05$ ) между исследованными видами.

Установлено, что для *L. macdonaldi* характерно концентрированное позиционирование по векторам восков и ЭХС. Содержание данных липидов в мышцах по разрезу глубин составило в среднем 12.22 и 8.04% сухого вещества, соответственно, тогда как преобладающего запасного липида – ТАГ – 10.60%. Другой вид *B. euryops* ориентирован по разнонаправленным векторам ТАГ, МАГ и СЖК. Для *B. euryops* установлена стратегия запасаания энергетических липидов с доминированием ТАГ.

Нами установлено преимущественное депонирование восков (не ТАГ и ЭХС) в мышцах *L. macdonaldi*, что связано с необходимостью обеспечения организма энергией в периоды ограниченного доступа пищевых ресурсов, а также для поддержания надлежащей плавучести рыбы при вертикальных перемещениях в толще воды [6,22]. Известно, что высокий уровень восков в мышечной ткани костистых рыб связан с суточными вертикальными миграциями известными для некоторых мезопелагических рыб [23]. Биохимическая целесообразность накопления восков и ЭХС связана с «универсальностью» этих молекул, за счет которых, в том числе, реализуется сигнальная и регуляторная функции при изменении глубины обитания [22]. Кроме того, образующиеся в ходе гидролиза восков ЖК могут использоваться для синтеза ТАГ, необходимых для поддержания энергоемких передвижений в толще воды [24]. Превалирование запасных ТАГ над ЭХС и восками, что было выявлено в мышцах *B. euryops*, можно рассматривать как наиболее выгодную форму запасаания энергии для, особенно, батипелагических видов (обитают до глубин 3237 и 2500 метров, соответственно). Доминирование нейтральных ТАГ над другими запасными формами липидов в ткани связано с накоплением энергетически ценных молекул ввиду ее большей энергоёмкости (по сравнению с углеводами) и быстрой мобилизации из адипоцитов [10].

Меньший вклад в распределение изученных биохимических параметров для рыб вносят структурные липиды – общие ФЛ и ХС. Отмечено, что содержание данных липидных классов в мышцах исследованных рыб в разрезе глубин моря Ирмингера составило: *L. macdonaldi* – 2.92 и 2.35% сухого вещества; *B. euryops* – 1.53 и 1.56%. Установлено, что у *B. euryops*, отловленного на разных глубинах, различается соотношение ХС/ФЛ за счёт снижения уровня ФЛ с 2.19 до 0.43%, а содержание СЖК постепенно увеличивается с 0.78 до 1.01%. Наоборот, для *L. macdonaldi* отмечено снижение содержания СЖК (с 1.47 до 0.52%) в мышечной ткани на «средних глубинах» с одновременным увеличением ДАГ (с 0.29 до 0.51%) и МАГ (с 0.32 до 0.49%) в мышцах.

Установлено, что *L. macdonaldi* сохраняет поддержание целостности биомембраны клеток на разных глубинах путём лабильного изменения соотношения содержания ХС и ФЛ в мембране. При этом, у *B. euryops* выявлено исключительное снижение значения ХС/ФЛ при увеличении глубины за счёт значительного уменьшения содержания ФЛ (от 2.19 до 0.43%) и ХС (с 2.19 до 0.60%). Изменение содержания ХС в биомембране достигается регуляция ее жидкости и проницаемости, обеспечивается поддержание её функциональной целостности для работы мембрано-связанных ферментов и ионных каналов в условиях изменения абиотических факторов среды [25].

Показано, что качественное и количественное содержание и соотношения отдельных ЖК различны между исследованными видами рыб, что указывает на видоспецифичность ЖК-профилей мышц. Некоторые ЖК (в основном минорные) являются видоспецифическими. При этом видовые группы формируются в многомерном пространстве признаков (при использовании алгоритма *NMDS*) совпадают при статистическом анализе, основанном на показателях как липидов, так и жирных кислот.

Для всех видов отмечено доминирование мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) – 51.58% от суммы ЖК у *L. macdonaldi*; 58.50% от суммы ЖК у *B. euryops*. Среди МНЖК превалирует олеиновая кислота (ОЛЕ, 18:1(n-9)) (12.53, 9.37% от суммы ЖК, соответственно), а также жирные кислоты «зоопланктонного» происхождения – 20:1(n-9) (13.97, 12.78% от суммы ЖК, соответственно) и 22:1(n-11) (7.59, 12.93% от суммы ЖК, соответственно). Для *L. macdonaldi* отмечено также высокое содержание многоатомного жирного спирта веслоногих рачков 22:1(n-11)Alk (12.81% от суммы ЖК), в сторону которого вид смещен в многомерном пространстве признаков. В

мышцах *L. macdonaldi* и *B. euryops* также отмечено сравнительно высокое содержание 22:1(n-7) ЖК (7.50 и 11.12% от суммы ЖК, соответственно).

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) формируют вторую группу ЖК, по количественному содержанию в мышцах, для исследованных видов – *L. macdonaldi*, *B. euryops* (28.27 и 22.08% от суммы ЖК, соответственно). Доминирующим семейством являются n-3 ПНЖК, однако их количество существенно различается между видами – 10.89 и 16.58% от суммы ЖК, соответственно. При этом содержание другого основного семейства ПНЖК – n-6 ПНЖК – практически не различалось (2.16 и 2.20% от суммы ЖК, соответственно). Установлено, что основными n-3 ПНЖК являются эйкозапентаеновая (ЭПК, 20:5(n-3)) и докозагексаеновая (ДГК, 22:6(n-3)) ЖК, содержание которых в мышцах составило: 2.46 и 4.12% от суммы ЖК у *L. macdonaldi*, 3.97 и 8.62% от суммы ЖК у *B. euryops*. Среди n-6 ПНЖК выявлено сравнительно низкое содержание линолевой (ЛИН, 18:1(n-6)) и арахидоновой кислот (АРА, 20:4(n-6)) у *L. macdonaldi* – 0.70 и 0.18% от суммы ЖК, соответственно. Для *B. euryops* содержание ЛИН и АРА в мышцах составило: 1.04 и 0.28% от суммы ЖК, соответственно.

Низкое содержание НЖК установлено в мышцах *L. macdonaldi* (6.37% от суммы ЖК), среди которых особенно выделялась по количеству пальмитиновая кислота (16:0) – 3.80% от суммы ЖК. Для *B. euryops* ее содержание напротив было велико – 17.67%, а также отмечены значимых количествах – 14:0 и 16:0 ЖК (5.25 и 8.76% от суммы ЖК).

Установленная качественная и количественная видоспецифичность ЖК-профиля (в том числе и минорных компонентов) мышечной ткани у исследованных видов мезопелагических рыб указывает на особенности, связанные с различными механизмами и стратегиями биохимической адаптации к определенным условиям обитания. Среди мезопелагических рыб накопление в организме МНЖК является характерной особенностью семейства Миктофовых и связано, в основном, с питанием [19]. Однако, в нашем исследовании было установлено доминирование МНЖК у 2-х исследованных семейств. Кроме того, для *L. macdonaldi* и *B. euryops* отмечено высокое содержание биомаркерных ЖК веслоногих рачков рода *Calanus* (20:1(n-9) и 22:1(n-11)) – основного пищевого объекта для планктоноядных консументов [20,21]. Для *L. macdonaldi* питание зоопланктоном также подтверждается накоплением в мышцах восков и длинноцепочечного спирта 22:1(n-11)Alk, которыми богаты веслоногие рачки рода *Calanus* [26,27].

Высокое содержание эссенциальных n-3 ПНЖК - ДГК и ЭПК - в условиях низких температур и высокого гидростатического давления представляет собой один из основных компенсаторных механизмов реакции организма на изменение условий окружающей среды [11]. Ранее было показано, что изменение содержания ДГК и ЭПК в мышцах рыб направлено на регуляцию вязкости мембраны и функциональную активность мембраносвязанных ферментов, что связано с двигательной активностью организма [13,21]. В нашем исследовании была установлена прямая корреляция для мигрирующих видов, и, наоборот, обратная корреляция для немигрирующих видов между ЭПК и ДГК и фактором увеличения глубины.

Отметим, что уникальный липидный и жирнокислотный состав исследованных мезопелагических видов рыб позволяет обсуждать их в качестве потенциальных объектов биотехнологии, пищевой промышленности, аквакультуры и других. Известно положительное влияние на здоровье человека совокупности ЭПК, ДГК, длинноцепочечных МНЖК и жирных спиртов, входящих в состав восков [28]. Известно, что n-3 ПНЖК обладают антиатеросклеротическим эффектом, снижают воспалительные и аллергические реакции, эффективно используются в клинической практике при лечении сердечно-сосудистых заболеваний, а также нейродегенеративных расстройств [29]. Согласно последним исследованиям, продукты синтеза высокоактивного соединения (N-докозагексаенилэтанолламин) из ДГК способствуют восстановлению нейронов при черепно-мозговых травмах [30]. Липидные экстракты, в настоящее время, рассматриваются как антимикробные агенты, так как вещества липидной природы обладают антимикробной активностью, при этом набор и соотношение липидов и жирнокислотных компонентов в экстракте определяет выраженность действия [31].

**Заключение**

Исследование липидного и жирнокислотного профиля некоторых мезопелагических видов рыб моря Ирмингера (Северная Атлантика) позволило установить качественные и количественные видоспецифические различия на уровне липидного обмена, связанные с отличиями в избирании компенсаторных реакций при глубоководном обитании с учетом наличия или отсутствия вертикальных миграций. Установлены качественные различия в накоплении энергоемких липидов и показаны количественные отличия структурных липидов, а также их жирнокислотных компонентов между вертикально мигрирующим видом – *L. macdonaldi* и немигрирующим видом – *B. euryops*. В итоге, липиды обеспечивают поддержание плавучести рыб и депонирование энергии в организме, а также участвуют в реорганизации физико-химического состояния биомембраны для оптимальной работы мембраносвязанных ферментов и ионных каналов при изменении глубины. Качественная и количественная «индивидуальность» жирнокислотного состава, наиболее лабильных компонентов липидов, также указывает на использование различных механизмов биохимических адаптаций у разных видов на отдельных глубинах. Отмечаются различия в пищевой специализации между видами, что оказывает влияние на накопление и использование физиологически значимых жирных кислот организмом и их роль в поддержании жизнедеятельности организма.

**Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ МД-5761.2021.1.4, а также частично в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.**

**Список литературы**

1. Irigoien X., Klevjer T. A., Røstad A., Martinez U., Boyra G., Acuña J. L., Bode A., Echevarria F., Gonzalez-Gordillo J. I., Hernandez-Leon S., Agusti S., Aksnes D. L., Duarte C. M., Kaartvedt S. Large mesopelagic fishes biomass and trophic efficiency in the open ocean // *Nature Communications*. 2014. V. 5, N. 3271.
2. Hidalgo M., Browman H.I. Developing the knowledge base needed to sustainably manage mesopelagic resources // *ICES Journal of Marine Science*. 2019. V. 76(3). P. 609-615.
3. Siegelman-Charbit L., Planque B. Abundant mesopelagic fauna at oceanic high latitudes // *MEPS*. 2016. V. 546. P. 277-282.
4. Aksnes D.L., Røstad A., Kaartvedt S., Martinez U., Duarte C.M., Irigoien X. Light penetration structures the deep acoustic scattering layers in the global ocean // *Science Advances*. 2017. V. 3(5). P. e1602468
5. Aumont O., Maury O., Lefort S., Bopp L. Evaluating the potential impacts of the diurnal vertical migration by marine organisms on marine biogeochemistry // *Global Biochemical Cycles*. 2018. V. 32(11). P. 1622-1643.
6. Ozdemir N.S., Parrish C.C., Parzanini C., Mercier A. Neutral and polar lipid fatty acids in five families of demersal and pelagic fish from the deep Northwest Atlantic // *ICES Journal of Marine Science*. 2019. P. 1-9.
7. Шунтов В.П. Экосистемные исследования ТИНРО биологических ресурсов дальневосточных морей // *ТИНРО-70. Владивосток: ТИНРО-центр*. 1995. С. 25-78. 32.
8. Шунтов В.П., Радченко В.И., Дулепова Е.П., Темных О.С. Биологические ресурсы дальневосточной российской экономической зоны: структура пелагических и донных сообществ, современный статус, тенденции многолетней динамики // *Изв. ТИНРО*. 1997. Т. 122. С. 3-15
9. Токранов А.М., Орлов А.М., Шейко Б.А. Промысловые рыбы материкового склона прикамчатских вод. / *Петропавловск-Камчатский: Камчат-пресс*. 2005. 52 с.
10. Лапин В.И., Шатуновский М.И. Особенности состава, физиологическое и экологическое значение липидов рыб // *Успехи современной биологии*. 1981. Т. 92(6). С. 380-394.
11. Крепс Е.М. Липиды клеточных мембран. Эволюция липидов мозга. Адаптационная функция липидов / *Е.М. Крепс. Л.: Наука*. 1981. 339 с.

12. Ashjian C.J., Campbell R.G., Welch H.T. et al. Annual cycle in abundance, distribution, and size in relation to hydrography of important copepod species in the western Arctic Ocean // *Deep Sea Res. PT I*. 2003. V. 50. P. 1235–1261.
13. Voronin VP, Nemova NN, Ruokolainen TR, Artemenkov DV, Rolskii AY, Orlov AM, Murzina SA. 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; 11(5):704. <https://doi.org/10.3390/biom11050704>
14. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226(5). P. 497-509.
15. Hellwig J. Defining parameters for a reproducible TLC-separation of phospholipids using ADC // *Diploma thesis. Germany*. 17.06.2008.
16. Цыганов Э.П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // *Лабор. дело*. 1971. № 8. С. 490-493.
17. Кабаков Р.И. R в действии. Анализ и визуализация данных на языке R / пер. с англ. Волковой П.А. ДМК Пресс, 2016. 588 с.
18. Шитиков В.К., Мاستицкий С.Э. Классификация, регрессия и другие алгоритмы Data Mining с использованием R. Электронная книга, адрес доступа: <https://github.com/ranalytics/data-mining>
19. Lea M.-A., Nichols P.D., Wilson G. Fatty acid composition of lipid-rich myctophids and mackerel icefish (*Champscephalus gunnari*) – Southern Ocean food-web implication // *Polar Biology*. 2002. V. 25. P. 843-854.
20. Petursdottir H., Gislason A., Falk-Petersen S. Lipid classes and fatty acid compositions of muscle, liver and skull oil in deep-sea redfish *Sebastes mentella* over the Reykjanes Ridge // *Journal of Fish Biology*. 2008. V. 73. P. 2485-2496.
21. Murzina S.A., Pekkoeva S.N., Kondakova E.A., Nefedova Z.A., Filippova K.A., Nemova N.N., Orlov A.M., Berge J., Falk-Petersen S. Tiny but Fatty: Lipids and Fatty Acids in the Daubed Shanny (*Leptoclinus maculatus*), a Small Fish in Svalbard Waters // *Biomolecules*. 2020. 10(3):368. <https://doi.org/10.3390/biom10030368>
22. Phleger C.F., Nelson M.M., Mooney B.D., Nichols P.D. Wax esters versus triacylglycerols in myctophid fishes from the Southern Ocean // *Antarctic Science*. 1999. V. 11(4). P. 436-444
23. Nevenzel J.C. Occurrence, function and biosynthesis of wax esters in marine organisms // *Lipids*. Vol. 5. № 3. P. 308-319.
24. Sargent J.R. Marine wax esters // *Sci. Progr.* 1978. Vol. 65. P. 437–458.
25. Hochachka P.W., Somero G.N. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. N.Y.: Oxford University Press, 2002. 466 p.
26. Lee R.F. Lipid composition of the copepod *Calanus hyperboreus* from the Arctic Ocean. Changes with depth and season // *Marine biology*. 1974. V. 26(4). P. 313–318.
27. Falk-Petersen S., Mayzaud P., Kattner G., Sargent J.R. Lipids and life strategy of Arctic *Calanus* // *Marine Biology Research*. 2009. V. 5(1). P. 18-39.
28. Schots P.C., Pedersen A.M., Eilertsen K.-E., Olsen R.L., Larsen T.S. Possible health effects of a wax ester rich marine oil // *Front. Pharmacol.* 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00961>
29. Yang Z.H., Emma-Okon B., Remaley A.T. Dietary marine-derived long-chain monounsaturated fatty acids and cardiovascular disease risk: a mini review // *Lipids in health and disease*. 2016. V. 15(1). P. 201.
30. Ponomarenko A.I., Tyrtysnaia A.A., Pisyagin E.A., Dyuizen, I.V., Sultanov R.M., Manzhulo I.V. N-docosahexaenoylethanolamine reduces neuroinflammation and cognitive impairment after mild traumatic brain injury in rats // *Sci. Rep.* 2021. 11. 756.
31. Обухова Е.С., Рожина А.А., Воронин В.П., Дгебуадзе П.Ю., Мурзина С.А. Антимикробная активность липидный экстрактов иглокожих залива Нячанг (Южно-Китайское море) // *ДАН. Наука о жизни*. 2022. Т. 502. С. 41-48.

**Сведения об авторах**

**Светлана Александровна Мурзина,**  
заведующая лабораторией  
Института биологии – обособленное подразделение Фе-  
дерального исследовательского центра  
“Карельский научный центр Российской академии  
наук” (ИБ КарНЦ РАН)  
Петрозаводск, Россия  
**E-mail:** murzina.svetlana@gmail.com

**Виктор Петрович Воронин,**  
аспирант  
Института биологии – обособленное подразделение Фе-  
дерального исследовательского центра  
“Карельский научный центр Российской академии  
наук” (ИБ КарНЦ РАН)  
Петрозаводск, Россия  
**E-mail:** voronen-viktor@mail.ru

**Дмитрий Владимирович Артеменков,**  
старший научный сотрудник  
Всероссийский научно-исследовательский институт  
рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)  
Москва, Россия  
**E-mail:** artemenkov@vniro.ru

**Алексей Маркович Орлов,**  
заведующий лабораторией  
Института океанологии  
им. П. П. Шириова РАН (ИО РАН)  
Москва, Россия  
**E-mail:** orlov@vniro.ru

**Information about authors**

**Svetlana Alexandrova Murzina,**  
Head of laboratory,  
Institute of Biology  
of the Karelian research Centre of the Russian Academy  
of Sciences  
Petrosavodsk, Russia  
**E-mail:** murzina.svetlana@gmail.com

**Viktor Petrovich Voronin,**  
PhD student,  
Institute of Biology  
of the Karelian research Centre  
of the Russian Academy of Sciences  
Petrosavodsk, Russia  
**E-mail:** voronen-viktor@mail.ru

**Dmitry Vladimirovich Artemenkov,**  
Senior Researcher,  
Russian Federal Research Institute Of Fisheries and  
Oceanography  
Moscow, Russia  
**E-mail:** artemenkov@vniro.ru

**Alexey Markovich Orlov,**  
Head of Laboratory,  
P.P. Shirshov Institute of Oceanology of the Russian  
Academy of Sciences  
Moscow, Russia  
**E-mail:** orlov@vniro.ru

УДК 661.98:547.963.4  
ГРНТИ 31.15.21, 31.21.18  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.203-206

<sup>1</sup>О. В. Космачевская, <sup>1</sup>Э. И. Насыбуллина,  
<sup>1</sup>И. С. Пугаченко, <sup>1</sup>К. Б. Шумаев,  
<sup>2</sup>Н. Н. Новикова, <sup>1</sup>А. Ф. Топунов  
<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные  
основы биотехнологии» Российской академии наук  
<sup>2</sup>НИЦ "Курчатовский институт"

**ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА ЗАЩИЩАЮТ ГЕМОГЛОБИН  
ОТ ОКИСЛЕНИЯ**

Динитрозильные комплексы железа, связанные с гемоглобином (Hb), разрушаются под действием пероксинитрита. При этом они защищают Hb от окислительной модификации: препятствуют образованию карбонильных производных, окислению триптофановых остатков, деградации гема, образованию межбелковых сшивок.

**Ключевые слова:** гемоглобин, динитрозильные комплексы железа, оксид азота, пероксинитрит, окислительная модификация

<sup>1</sup>O. V. Kosmachevskaya, <sup>1</sup>E. I. Nasybullina,  
<sup>1</sup>I. S. Pugachenko, <sup>1</sup>K. B. Shumaev, <sup>2</sup>N. N. Novikova,  
<sup>1</sup>A. F. Topunov  
<sup>1</sup>Federal Research Center of Biotechnology  
<sup>2</sup>Kurchatov Institute

**DINITROSYL IRON COMPLEXES PROTECT HEMOGLOBIN FROM  
OXIDATION**

Hemoglobin-bound dinitrosyl iron complexes (Hb-DNICs) are dose-dependently degraded by peroxyxynitrite. At the same time, they protect Hb from oxidative modification: they prevent the

*formation of carbonyl derivatives, the oxidation of tryptophan residues, the degradation of the heme group, and the formation of crosslinks between subunits.*

**Key words:** *hemoglobin, iron dinitrosyl complexes, nitric oxide, peroxy-nitrite, oxidative modification.*

### Введение

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются одной из физиологических форм оксида азота (NO) в организме и функционируют в качестве доноров NO и/или  $Fe-(NO)_2$  [1-3]. В различных экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo* было доказано, что NO может действовать как антиоксидант, вступая в реакцию с радикалами ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ,  $Tyr^{\cdot}$ ,  $RS^{\cdot}$ ,  $\cdot NO_2$ ,  $ROO^{\cdot}$ ). Метаболиты NO – ДНКЖ также проявляют антиоксидантные свойства. Низкомолекулярные и связанные с белками ДНКЖ перехватывают супероксидный анион-радикал [4]. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (GS-ДНКЖ) препятствуют окислительной модификации гемоглобина, вызванной пероксинитритом [5], а ДНКЖ, связанные с гемоглобином (Hb), защищают входящие в их состав тиоловые группы от окисления [6].

**Цель работы** Изучить действие ДНКЖ на окислительную модификацию гемоглобина пероксинитритом.

### Материалы и методы

Деструкцию связанных с гемоглобином ДНКЖ (Hb-ДНКЖ) под действием пероксинитрита ( $ONOO^-$ ) изучали с помощью ЭПР-спектроскопии при комнатной температуре. Количественную оценку карбонильных производных гемоглобина производили по методу Абаленихиной и Фоминой [7]. Концентрацию гема определяли пиридингемохромовым методом [8]. Свободные сульфгидрильные группы определяли с помощью тиол-специфичного реагента *ThioGlo1* [9]. Состояние триптофановых и тирозиновых остатков в молекуле гемоглобина изучали с помощью флуоресцентной спектроскопии. Образование межсубъединичных сшивок и агрегатов белка регистрировали методом денатурирующего SDS-электрофореза в 12% ПААГ. ДНКЖ с фосфатными лигандами синтезировали по методу [7]. Для получения Hb-ДНКЖ к раствору Hb добавляли ДНКЖ с фосфатными лигандами в соотношении 1,8 комплексов на 1 тетрамер Hb.  $ONOO^-$  получали, быстро смешивая 0,6 М раствор  $NaNO_2$  и 0,6 М раствор  $H_2O_2$  в 0,7 М HCl.

### Полученные результаты

Hb-ДНКЖ количественно разрушались под действием пероксинитрита. Кинетика этого процесса имела двухфазный характер. Первая фаза быстрого разрушения Hb-ДНКЖ длилась 4-5 минут, что, вероятно, связано с взаимодействием комплексов с пероксинитритом и его реакционно-активными производными. При молярном соотношении Hb к  $ONOO^-$  1 : 12 концентрация ДНКЖ снижалась на ~75%, а при соотношении 1 : 14,5 парамагнитные ДНКЖ почти полностью разрушались. В течение второй, более медленной фазы скорость распада Hb-ДНКЖ в контрольном образце и в присутствии  $ONOO^-$  практически не отличалась. При этом ДНКЖ оказывали выраженное ингибирующее действие на образование карбонильных производных Hb. Они защищали белок в широком диапазоне концентраций  $ONOO^-$  от 0,38 до 4,20 мМ. При концентрации  $ONOO^-$  1 мМ карбонильных производных Hb-ДНКЖ было на 60% меньше, чем в контрольном белке, не содержащем ДНКЖ.

Hb-ДНКЖ тормозили разрушение гемовой группы. В контроле доля разрушенного гема находилась в прямой зависимости от концентрации окислителя. При концентрации  $ONOO^-$  4,2 мМ разрушалось 50% гемов Hb, в то время как в Hb-ДНКЖ – только 25%.

Спектрофлуориметрическое исследование тирозиновых остатков Hb при действии  $ONOO^-$  показало, что интенсивность их флуоресценции в Hb и Hb-ДНКЖ возрастала при увеличении концентрации  $ONOO^-$ , что связано с образованием 3,3'-дитирозина. Однако, начиная с концентрации 1,6 мМ, флуоресценция Hb-ДНКЖ снижалась, вероятно, из-за образования 3-нитротирозина. Была изучена и зависимость интенсивности флуоресценции триптофана от концентрации  $ONOO^-$ . В Hb она дозозависимо уменьшалась, что свидетельствует об окислении остатков триптофана. В Hb-ДНКЖ при низких концентрациях окислителя флуоресценция незначительно возрастала и только начиная с концентрации  $ONOO^-$  = 2,6 мМ снижалась относительно исходного уровня, что может быть обусловлено распадом ДНКЖ.

При взаимодействии  $ONOO^-$  с Hb происходило незначительное окисление



реакционноспособных остатков цистеина (Cys93β). Уменьшение на ~10 % интенсивности флуоресценции тиольного аддукта с ThioGlo1 наблюдалось при 0,6 мМ ONOO<sup>-</sup>. Дальнейшее увеличение концентрации ONOO<sup>-</sup> не приводило к усилению окисления SH-групп Hb. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о том, что основной мишенью пероксинитрата в Hb являются не остатки Cys93β, гемовая группа.

Связанные с белком ДНКЖ препятствовали образованию межбелковых связей. В контрольном варианте при всех концентрациях ONOO<sup>-</sup> происходило дозозависимое образование димеров субъединиц Hb и высокомолекулярных агрегатов. При концентрациях ONOO<sup>-</sup> 2,6 и 4,2 мМ агрегация была настолько сильной, что белок даже не проникал в концентрирующий гель. Если SH-группы Hb были включены в ДНКЖ как лиганды, белок агрегировал только при концентрации ONOO<sup>-</sup> 2,6 и 4,2 мМ и в меньшей степени, чем в контрольных образцах. При этом степень сшивания молекул Hb не зависела от наличия восстановителя – дитиотреитола, что включает вклад дисульфидных связей в агрегацию белка.

### Выводы

Показано защитное действие ДНКЖ по отношению к гемопротеиду – гемоглобину, что делает этот метаболит NO перспективным веществом для использования в качестве протектора миокарда к ишемии, когда повышено образование пероксинитрата.

### Заключение

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

- 1) Низкомолекулярные и связанные с белком ДНКЖ снижают выход свободнорадикальных продуктов в реакции с пероксинитритом. При этом пероксинитрит дозозависимо разрушает ДНКЖ, связанные с гемоглобином (Hb-ДНКЖ).
- 2) ДНКЖ защищают гемоглобин от окислительной модификации: препятствуют образованию карбонильных производных, окислению триптофановых остатков, дегградации гемовой группы, образованию межбелковых сшивков.
- 3) Обнаруженные эффекты могут быть связаны с восстановлением и нитрозилированием оксоферрильной формы гема, а также со способностью трансформировать пероксинитрит в нерадикальные продукты.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.*

### Список литературы

1. Tsai M.-L., Tsou C.-C., Liaw W.-F. Dinitrosyl iron complexes (DNICs): From biomimetic synthesis and spectroscopic characterization toward unveiling the biological and catalytic roles of DNICs. // *Acc. Chem. Res.* 2015. V. 48. P. 1184–1193.
2. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working form” of endogenous nitric oxide. // *Nitric Oxide.* 2016. V. 54. P. 15–29.
3. Hsiao H.-Y., Chung C.-W., Santos C.-W., Villaflora O.B., Lu T.-T. Fe in biosynthesis, translocations, and signal transduction of NO toward bioinorganic engineering of dinitrosyl iron complexes into NO delivery scaffolds for tissue engineering. // *Dalton Trans.* 2019. V. 48. P. 9431–9453.
4. 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.
5. Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Шумаев К.Б., Чумикина Л.В., Арабова Л.И., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Топунов А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами перехватывают пероксинитрит и защищают гемоглобин от окислительной модификации. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2021. Т. 57. № 4. С. 315-325.
6. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. // *Methods in Enzymology.* 2008. V. 436. P. 445-461.

7. *Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Окислительная модификация белков и активность катепсина и тимоцитов крыс в условиях in vitro модулирования синтеза оксида азота (II). // Казанский медицинский журнал. 2014. Т. 95. № 4. С. 553–557.*
8. *Riggs, A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. Methods Enzymol. 1981, 76, 5–29.*
9. *Hoff S., Larsen F.H., Andersen M.L., Lund M.N. Quantification of protein thiols using ThioGlo1 fluorescent derivatives and HPLC separation. // Analyst. 2013. V. 138. P. 2096–2103*

**Сведения об авторах**

**Ольга Владимировна Космачевская,**  
канд. биол. наук, ст. науч. сотр.  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук  
Москва, Россия  
<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [rizobium@yandex.ru](mailto:rizobium@yandex.ru)

**Эльвира Ильгизовна Насыбуллина,**  
канд. биол. наук, науч. сотр.  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук  
Москва, Россия  
<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [lvirus198709@rambler.ru](mailto:lvirus198709@rambler.ru)

**Игорь Сергеевич Пугаченко,**  
мл. науч. сотр.  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук  
Москва, Россия  
<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [gewalthaber-igor@mail.ru](mailto:gewalthaber-igor@mail.ru)

**Константин Борисович Шумаев,**  
д-р биол. наук., ст. науч. сотр.  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук  
Москва, Россия  
<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [tomorov@mail.ru](mailto:tomorov@mail.ru)

**Наталья Николаевна Новикова,**  
д-р физ.-мат. наук, вед. науч. сотр.  
НИИ "Курчатовский институт"  
Москва, Россия

**E-mail:** [nn\\_novikova@crys.ras.ru](mailto:nn_novikova@crys.ras.ru)

**Алексей Федорович Топунов,**  
д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук  
Москва, Россия  
<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [aftopunov@yandex.ru](mailto:aftopunov@yandex.ru)

**Information about authors**

**Olga Vladimirovna Kosmachevskaya,**  
PhD, Senior Research Scientist,  
Federal Research Center  
of Biotechnology  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [rizobium@yandex.ru](mailto:rizobium@yandex.ru)

**Elvira Ilgizovna Nasybullina,**  
PhD Research Scientist,  
Federal Research Center  
of Biotechnology  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [lvirus198709@rambler.ru](mailto:lvirus198709@rambler.ru)

**Igor Sergeevich Pugachenko,** Junior Research Scientist,  
Federal Research Center  
of Biotechnology  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [gewalthaber-igor@mail.ru](mailto:gewalthaber-igor@mail.ru)

**Konstantin Borisovich Shumaev,**  
DBS,  
Senior Research Scientist,  
Federal Research Center  
of Biotechnology  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [tomorov@mail.ru](mailto:tomorov@mail.ru)

**Natalya Nikolaevna Novikova,**  
DFS, Leading Research Scientist,  
Kurchatov Institute  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [nn\\_novikova@crys.ras.ru](mailto:nn_novikova@crys.ras.ru)  
**Alexey Fedorovich Topunov,**  
DBS  
Head of Laboratory,  
Federal Research Center  
of Biotechnology  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [aftopunov@yandex.ru](mailto:aftopunov@yandex.ru)

УДК 546.72+544.4+577.3  
 ГРНТИ 31.17.15, 31.15, 31.27  
 DOI  
 10.47501/978-5-6044060-2-1.207-210

<sup>1</sup>О. В. Покидова, <sup>1</sup>В. О. Новикова,  
<sup>1,2</sup>Н. С. Емельянова, <sup>1</sup>Б. Л. Психа,  
<sup>1,2</sup>А. В. Куликов, <sup>1,2,3</sup>Н. А. Санина

<sup>1</sup>Институт проблем химической физики РАН,  
<sup>2</sup>Московский государственный университет  
 имени М.В. Ломоносова,

<sup>3</sup>Научно-образовательный центр «Медицинская  
 химия» Московского государственного  
 областного университета

## ВЛИЯНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА РАСПАД N-ЭТИЛТИОМОЧЕВИННОГО НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА

*Изучен процесс распада нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинными лигандами в различных растворителях (вода, ДМСО, этанол) и в смеси с гемоглобином. Показано, что комплекс наиболее стабилен в растворе ДМСО. В присутствии белка комплекс становится более пролонгированным донором NO.*

**Ключевые слова:** нитрозильные комплексы железа, доноры NO, гемоглобин, квантово-химическое моделирование, кинетическое моделирование.

<sup>1</sup>O. V. Pokidova, <sup>1</sup>V. O. Novikova, <sup>1,2</sup>N. S. Emel'yanova, <sup>1</sup>B.  
 L. Psikha, <sup>1,2</sup>A. V. Kulikov, <sup>1,2,3</sup>N. A. Sanina

<sup>1</sup>Institute of Problems of Chemical Physics of Russian  
 Academy of Sciences

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University Moscow

<sup>3</sup>Scientific and Educational Center "Medical Chemistry" of Mos-  
 cow State Regional University

## EFFECT OF HEMOGLOBIN AND SOLVENTS ON THE DECOMPOSITION OF N-ETHYLTHIOUREA NITROSYL IRON COMPLEX

*The process of decomposition of the nitrosyl iron complex with N-ethylthiourea ligands in various solvents (water, DMSO, ethanol) and in a mixture with hemoglobin was studied. It was shown that the complex is most stable in DMSO solution. In the presence of protein, the complex becomes a more prolonged NO donor.*

**Key words:** nitrosyl iron complexes, NO donors, hemoglobin, quantum chemical modeling, kinetic modeling.

### Введение

Нитрозильные негемовые комплексы железа (НКЖ) являются источником свободного NO в организме. Их синтетический аналог, НКЖ с N-этилтиомочевинными лигандами состава  $[Fe(C_3N_2H_8S)Cl(NO)_2]^0[Fe(NO)_2(C_3N_2H_8S)_2]^+Cl^-$  (комплекс **1**) [1], показал высокую кардиотропную [2] и цитотоксическую активность (по отношению к клеткам глиобластомы) [3], и является перспективным пролекарством для лечения социально значимых заболеваний. Комплекс **1** представляет собой сокристалл двух динитрозильных НКЖ: катионного с N-этилтиомочевинными лигандами и нейтрального с N-этилтиомочевинной и хлором.

Характерной особенностью данного класса соединений является их лабильность. В условиях *in vivo*  $[Fe(NO)_2]^+$  фрагмент может легко переходить с одних лигандов на другие, образуя в процессе такой трансформации более устойчивые высокомолекулярные белковые НКЖ. Так, ранее в работе [4] методом ЭПР-спектроскопии было показано образование альбумин- и гемоглобин-связанных нитрозильных комплексов, полученных после введения низкомолекулярных НКЖ в кровяное русло. В связи с данной спецификой, для понимания механизмов действия исследуемого соединения **1** в качестве потенциального лекарственного средства необходимо комплексно изучить возможные процессы трансформации, которым он будет подвергаться в живых системах. Кроме того, следует учесть, что комплекс **1** постепенно распадается в водных растворах, поэтому, прежде всего, перед проведением *in vivo* исследований, необходимо подобрать

подходящий растворитель, который окажет стабилизирующее действие и улучшит растворимость.

С этой точки зрения целью настоящей работы является изучение процессов распада комплекса **1** в различных растворителях (в ДМСО, этаноле и водном растворе) и в модельной системе с гемоглобином.

### Полученные результаты

Установлено, что растворитель играет существенную роль в процессе трансформации комплекса **1**. Согласно данным ЭПР-спектроскопии, в буфере сразу после растворения комплекса сохраняется его катионная часть, в ДМСО – нейтральная, в спирте – смесь обеих частей. Следует отметить, что во всех случаях, согласно квантово-химическому моделированию, распад комплекса **1** сопровождается увеличением координационного числа до 5 или 6 за счет координации молекул растворителя.

Наиболее устойчивым оказался раствор комплекса **1** в ДМСО. Как в УФ-, так и в ЭПР-спектрах наблюдается постепенное уменьшение интенсивности сигнала. Интересной особенностью в данном случае является то, что спектр ЭПР дает именно нейтральный фрагмент комплекса **1**, а катионный переходит в продукт – биядерный диамагнитный комплекс состава  $[Fe_2(NHC_2H_5)(SC(NH_2))((CH_3)_2SO)(NO)_4] \cdot 3(CH_3)_2SO$ , который, согласно квантово-химическим расчетам, должен слабо генерировать *NO*.

В этаноле, как и в ДМСО, энергия отщепления *NO*-групп довольно высока, что свидетельствует о слабых *NO*-донорных свойствах комплекса **1** в этом растворителе. Однако в воде, в отличие от ДМСО и этанола, процесс выделения *NO* протекает достаточно легко. Это также подтверждается экспериментами с использованием селективного сенсорного электрода.

В первом приближении предложены общие схемы превращения комплекса **1** в исследуемых растворителях и рассчитаны константы скорости этих процессов. Наиболее полное описание процесса разложения комплекса **1** получено для водного раствора. Установлено, что скорость донирования *NO* из нейтральной части выше, чем из катионной, что согласуется с результатами квантово-химических расчетов. Константа скорости, описывающая необратимое разложение комплекса в ДМСО, имеет наименьшее значение из всех рассчитанных:  $k = (6.9 \pm 3) \cdot 10^{-6} \cdot c^{-1}$ . Это подтверждает полученные экспериментальные и теоретические данные о том, что наиболее медленное разложение комплекса **1** происходит именно в ДМСО.

Таким образом, для улучшения растворимости и сохранения *NO*-донорных свойств комплекс **1** необходимо растворять в водных растворах ДМСО. Поэтому для дальнейшего анализа трансформации комплекса **1** в модельной системе с гемоглобином было принято решение растворять комплекс в ДМСО в анаэробных условиях, а затем вводить в водные растворы белка.

Гемоглобин представляет собой уникальный белок, который может связывать НКЖ и *NO* различными способами. Согласно литературным данным [5] *NO* может реагировать с гемом и остатками цистеина (Cys93) с образованием нитрозилированного гемоглобина (*HbNO*) и S-нитрозогемоглобина, соответственно. Также тиоловая группа Cys93 может образовывать белок-связанный НКЖ, аналогично альбумину [6]. Причем продукты зависят от формы гемоглобина: в дезоксигемоглобине образуется только *HbNO* ( $Hb + NO \leftrightarrow HbNO$ ), а в смеси с оксигемоглобином наблюдается окислительно-восстановительный процесс с образованием метгемоглобина ( $HbO_2 + NO \rightarrow MetHb + NO_3^-$ ) и, кроме того, реакция может происходить по аминокислотному остатку Cys93, доступному только в данной конформации. В условиях *in vivo* должны протекать все реакции, при этом образующиеся комплексы не являются «тупиковыми» продуктами, а претерпевают дальнейшие превращения.

На рис. 1 показаны изменения спектров поглощения системы «комплекс **1** - белок». Установлено, что при увеличении концентрации белка наблюдается уменьшение скорости реакции, что свидетельствует о стабилизации комплекса **1** на поверхности белка: образование *NO* из белок-связанного комплекса происходит медленнее.

Наблюдаемая в ЭПР-спектрах анизотропия g-фактора указывает на сильное торможение вращения парамагнитных фрагментов комплекса за счет их связывания с молекулой белка. Кроме того, в системе комплекса **1** с  $HbO_2$  экспериментально установлено, что помимо *metHb* образуются нитрозотиолы (по свободной SH-группе  $Cys93$ ), нитраты и нитриты. Таким образом, можно предположить, что гемоглобин должен принимать активное участие в биотрансформации комплекса **1**.

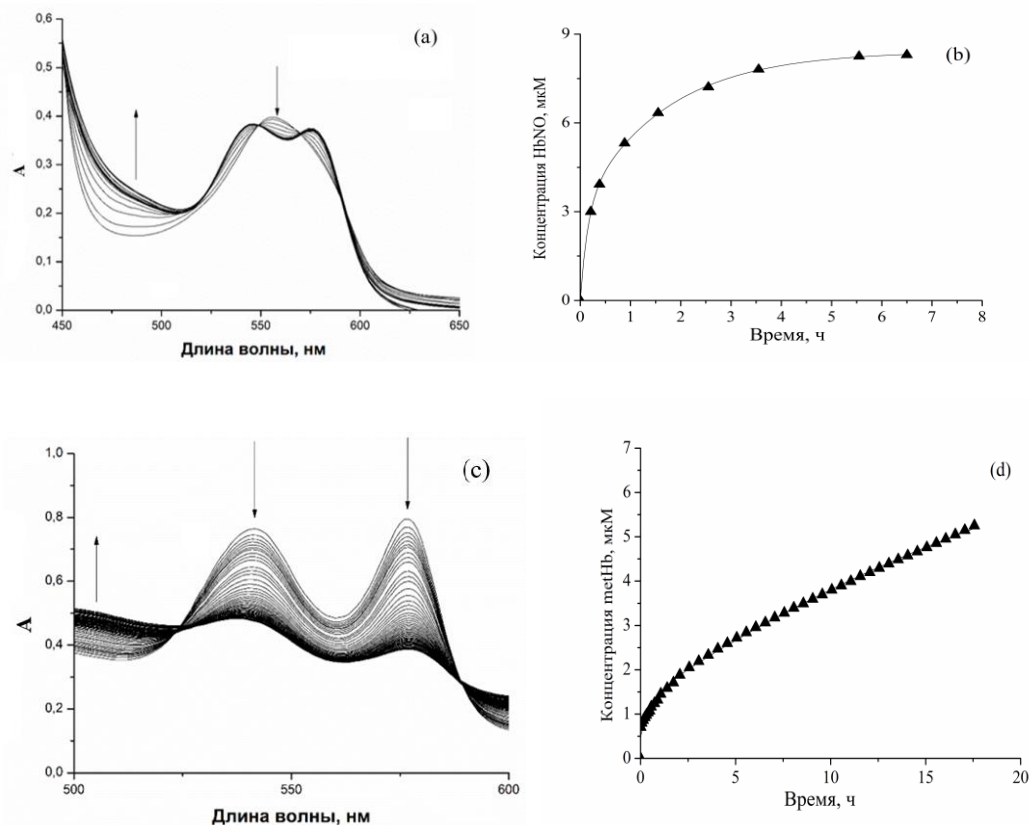


Рис. 1. Изменение спектров поглощения при взаимодействии *Hb* (а) и *HbO*<sub>2</sub> (с) с комплексом **1**. Кинетические зависимости накопления *HbNO* (b) и *metHb* (d). Условия реакции: концентрация комплекса **1** -  $3 \cdot 10^{-5}$  М (а-d), *Hb* -  $8 \cdot 10^{-6}$  М (а,b),  $1.5 \cdot 10^{-5}$  М (с,d); растворитель -Трис-НСl буфер, рН 7.0, 23 °С.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: комплекс **1** наиболее стабилен в ДМСО, и его растворы в смеси ДМСО-вода могут быть использованы для улучшения его биодоступности в дальнейших исследованиях *in vitro* и *in vivo*; гемоглобин эффективно стабилизирует комплекс **1**, что приводит к его более длительному действию в качестве донора *NO*. При включении этого белка в метаболизм комплекса **1** он будет в широкой степени влиять на процесс распада **1** и тем самым модулировать его свойства как потенциального лекарственного препарата.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-73-00316).*

#### Список литературы

1. Sanina N.A., Shmatko N.Y., Korchagin D.V., Shilov G.V., Terent'ev A.A., Stupina T.S., Balakina A.A., Komleva N.V., Ovanesyan N.S., Kulikov A.V., Aldoshin S.M. A new member of the cationic dinitrosyl iron complexes family incorporating N-ethylthiourea is effective against human HeLa and MCF-7 tumor cell lines // *Journal of Coordination Chemistry*. 2016. V. 69. P. 812–825.
2. Akentieva N.P., Sanina N.A., Gizatullin A.R., Shkondina N.I., Prihodchenko T.R., Shram S.I., Zhelev N., Aldoshin S.M. Cytoprotective Effects of Dinitrosyl Iron Complexes on Viability of Human Fibroblasts and Cardiomyocytes // *Frontiers in Pharmacology*. 2019. V. 10. 1277.
3. Sanina N.A., Shmatko N.Y., Stupina T.S., Balakina A.A., Terent'ev A.A. *NO*-Donor Iron

*Nitrosyl Complex with N-Ethylthiourea Ligand Exhibits Selective Toxicity to Glioma A172 Cells // Molecules. 2017. V. 22. P. 14.*

4. *Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl Iron Complexes Bind with Hemoglobin as Markers of Oxidative Stress // Methods in Enzymology. 2008. V. 436. P. 445–461.*
5. *Luchsinger B.P., Rich E.N., Gow A.J., Williams E.M., Stamler J.S., Singel D.J. Routes to S-nitroso-hemoglobin formation with heme redox and preferential reactivity in the subunits // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. V. 100. P. 461–466.*
6. *Gow A.J., Luchsinger B.P., Pawloski J.R., Singel D.J., Stamler J.S. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide // Proc. Natl. Acad. Sci. 1999. V. 96. P. 9027–9032.*

**Сведения об авторах**

**Олеся Викторовна Покидова**

к.х.н., с.н.с.

Институт проблем  
химической физики РАН  
Черноголовка, Россия

**E-mail:** pov@icp.ac.ru

**Вероника Олеговна Новикова**

аспирант

Институт проблем  
химической физики РАН  
Черноголовка, Россия

**E-mail:** veronika@icp.ac.ru

**Нина Сергеевна Емельянова**

к.х.н., с.н.с.

Институт проблем химической физики РАН  
Черноголовка, Россия  
Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова  
Москва, Россия

**E-mail:** n\_emel@mail.ru

**Борис Львович Психа**

д.х.н.,

ученый секретарь  
Институт проблем химической физики РАН  
Черноголовка, Россия

**E-mail:** psi@icp.ac.ru

**Александр Васильевич Куликов**

г.н.с., проф., д.ф.-м.н.

Институт проблем химической физики  
РАН  
Черноголовка, Россия  
Московский государственный университет имени М.В.  
Ломоносова  
Москва, Россия

**E-mail:** kulav@icp.ac.ru

**Наталья Алексеевна Санина**

д.х.н., зав.отделом,

Институт проблем химической физики РАН  
Черноголовка, Россия  
Московский государственный университет имени  
М.В. Ломоносова  
Научно-образовательный центр «Медицинская химия»  
Московского государственного областного универси-  
тета  
Москва, Россия

**E-mail:** sanina@icp.ac.ru

**Information about authors**

**Olesya Viktorovna Pokidova,**

Ph.D Senior researcher,

Institute of Problems of Chemical Physics of Russian  
Academy of Sciences  
Chernogolovka, Russia

**E-mail:** pov@icp.ac.ru

**Veronika Olegovna Novikova**

Graduate student

Institute of Problems of Chemical Physics of Russian  
Academy of Sciences  
Chernogolovka, Russia

**E-mail:** veronika@icp.ac.ru

**Nina Sergeevna Emel'yanova,**

Ph.D, Senior researcher,

Institute of Problems  
of Chemical Physics of Russian Academy of Sciences  
Chernogolovka, Russia  
Lomonosov Moscow State University  
Moscow, Russia

**E-mail:** n\_emel@mail.ru

**Boris Lvovich Psikha**

Doctor of Science, Scientific Secretary,

Institute of Problems of Chemical Physics of Russian  
Academy of Sciences  
Chernogolovka, Russia

**E-mail:** psi@icp.ac.ru

**Alexander Vasilievich Kulikov**

Doctor of Science,

Chief Researcher,  
Institute of Problems of Chemical Physics of Russian  
Academy of Sciences  
Chernogolovka, Russia  
Lomonosov Moscow State University  
Moscow, Russia

**E-mail:** kulav@icp.ac.ru

**Natalia Alekseevna Sanina**,

Doctor of Science, Head of Department,

Institute of Problems of Chemical Physics of Russian  
Academy of Sciences  
Chernogolovka, Russia  
Lomonosov Moscow State University,  
Moscow, Russia

Scientific and Educational Center

“Medical Chemistry” of Moscow State Regional Uni-  
versity

**E-mail:** sanina@icp.ac.ru

УДК 546.173+547.514.47:579.842.11  
ГРНТИ 31.17.15, 31.27  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.211-215

Э. И. Насыбуллина, И. С. Пугаченко,  
О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук

## КАРБОНИЛЬНЫЙ СТРЕСС В БАКТЕРИЯХ. АНТИГЛИКИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НИТРОКСИЛА

Бактерии испытывают карбонильный стресс при резком переходе на высокоуглеводные субстраты или в стационарной фазе. Метилглиоксаль (MG) тормозил рост бактерий и увеличивал количество конечных продуктов гликирования. Нитроксил снижал токсическое действие MG на бактерии в условиях низкой аэрации.

**Ключевые слова:** карбонильный стресс, метилглиоксаль, нитроксил, оксид азота, бактерии, *Escherichia coli*

E. I. Nasybullina, I. S. Pugachenko, O. V. Kosmachevskaya,  
A. F. Topunov  
Federal Research Center of Biotechnology

## CARBONYL STRESS IN BACTERIA. ANTI-GLYCATION EFFECT OF NITROXYL ON ESCHERICHIA COLI CELLS

*Bacteria suffer carbonyl stress at sudden transition to high-level carbohydrate substrates or in a stationary phase. Methylglyoxal (MG) inhibited bacterial growth and increased advanced glycation end products. Nitroxyl prevented the toxic effect of MG in a low-aerated cell culture.*

**Key words:** carbonyl stress, methylglyoxal, nitroxyl, nitric oxid, bacteria, *Escherichia coli*

### Введение

Понятие «карбонильный стресс» в биологическую науку ввел *Baunes* в 1991 году [1]. Оно аналогично понятию «окислительного стресса». Под карбонильным стрессом понимают повышение концентрации сахаров (глюкозы, дезоксиглюкозы, фруктозы, рибозы и триозофосфатов) и активных дикарбонильных соединений, которое приводит к увеличению скорости образования конечных продуктов гликирования (КПГ).

В биологических образцах было идентифицировано более 20 активных альдегидов и кетонов, основными из которых являются глиоксаль, метилглиоксаль, 3-деокси-глюкозон и малоновый диальдегид. Особое внимание заслуживает метилглиоксаль (MG). Токсичное действие MG обусловлено его способностью вступать в реакции с amino- и SH-группами аминокислотных остатков белков, формируя ковалентно связанные КПГ [2].

Карбонильному стрессу подвержены бактериальные клетки в условиях резкого перехода на субстраты с высокой концентрацией углеводов или в стационарной фазе [3]. Избыточное образование активных форм кислорода может быть еще одним механизмом развития карбонильного стресса в прокариотической клетке. Впервые неферментативное гликирование белка в *Escherichia coli* было показано в работах Мироновой с соавт. [4]. Нам также удалось выделить неферментативно гликированный левоглобин (гемоглобин бобовых растений) из клеток *E. coli*, содержащих плазмиду с геном левоглобина сои [5].

В экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo* было показано, что оксид азота (NO) и его доноры ингибируют образование КПГ [6, 7]. Антигликирующее действие NO обусловлено его антиоксидантными и антирадикальными свойствами [8, 9]. Еще более сильным антиоксидантом является нитроксил (HNO) – продукт одноэлектронного восстановления и протонирования NO [10]. Есть много данных об антиоксидантном и антирадикальном действии нитроксила, например, понижая продукцию супероксида за



счет ингибирования НАДН-оксидазы [11]. Антиоксидантное действие нитроксила может быть связано и с образованием ДНКЖ [12, 13], поскольку нитрозильные комплексы гемового и негемового железа являются эффективными антиоксидантами [8, 9].

**Цель работы.** Изучить защитное действие нитроксила на клетки *E. coli*, культивируемые в условиях, моделирующих карбонильный стресс.

#### Материалы и методы

Антигликирующую активность донора нитроксила - соли Ангели (*Angeli's Salt*) изучали *in vitro* в реакции цитохрома *c* с метилглиоксалем. В качестве стандартного антигликирующего соединения использовали амингуанидин. Антигликирующую активность оценивали по способности подавлять развитие флуоресценции КПП ( $\lambda_{\text{возб}} = 320$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 440$  нм).

Эксперименты с бактериальными культурами проводили на клетках *E. coli* (штамм ТВ-1), которые высевали в жидкую питательную среду *LB* и культивировали на термошейкере при 37 °С. В начале логарифмической фазы роста вносили *MG* и/или кислоту Пилоти (*Piloty's Acid*), длительно высвобождающую *HNO*. Концентрацию клеток в культуре измеряли по величине оптической плотности при 600 нм. В белковом экстракте бактериальных клеток регистрировали автофлуоресценцию КПП при  $\lambda_{\text{возб}} = 325$  нм,  $\lambda_{\text{исп}} = 492$  нм. Цитотоксическое и цитопротекторное действие *MG* и *HNO/NO*<sup>-</sup> на бактерии оценивали по восстановлению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) цитоплазматическими дегидрогеназами в нерастворимый формазан, количество которого коррелирует с метаболической активностью клеток и способностью к делению. Количество формазанов определяли спектрофотометрически, используя коэффициент миллимолярной экстинкции  $\epsilon_{560} = 7,2 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ .

#### Полученные результаты.

В реакции цитохрома с *MG* соль Ангели существенно замедляла образование флуоресцирующих КПП (концентрация полумаксимального ингибирования  $IC_{50} = 1,7$  мМ). Антигликирующая активность амингуанидина в данной реакционной системе оказалась ниже, чем у донора *HNO/NO*<sup>-</sup>. Это связано с принципиально разными механизмами действия этих соединений на реакции неферментативного гликирования. Амингуанидин образует нереакционноспособные аддукты *MG*. Действие нитроксила, как мы полагаем, связано с его способностью снижать уровень свободнорадикальных интермедиатов реакции неферментативного гликирования. Также нельзя исключить, что антигликирующее действие *HNO/NO*<sup>-</sup> также может быть обусловлено образованием нитро- и нитрозопроизводных оснований Шиффа, которые далее не претерпевают превращение в КПП.

Карбонильный стресс в бактериях индуцировали добавлением *MG*. В качестве донора нитроксила в этих экспериментах использовали кислоту Пилоти в концентрации, не ингибирующей рост бактерий. Известно, что биологический эффект нитроксила зависит от концентрации кислорода [14], поскольку нитрозильные комплексы гемового и негемового железа являются эффективными. При повышении концентрации кислорода происходит инверсия антиоксидантных свойств нитроксила в прооксидантные, а в гипоксических условиях значительно снижается токсичность этого соединения [14, 15]. В связи с этим мы использовали два типа культур: растущие в условиях нормальной аэрации (коэффициент заполнения колбы 0,17) и растущие в условиях пониженной аэрацией (коэффициент заполнения колбы 0,43). Добавление *MG* приводило к полному подавлению роста низкоаэрируемых бактерий в период с 2 до 10 часов, в то время как в нормально аэрируемых культурах происходило замедление роста. Также было различно и влияние донора *HNO/NO*<sup>-</sup> на бактериальные культуры. В первом случае он проявлял цитопротекторное действие, во втором случае эффект был противоположным.

В низкоаэрируемых культурах уровень связанных с белками КПП практически в два раза превышал их уровень в нормально аэрируемых клетках. Это объясняется



активацией гликолиза и связанной с этим повышенной продукцией *MG*. Метилглиоксаль в обоих типах культур усиливал процессы образования КППГ ~ на 25%, в то время как нитроксил снижал ~ на 15%. Более выражено антигликирующее действие нитроксила было в присутствии *MG*. В низкоаэрируемых культурах  $HNO/NO^-$  снижал содержание КППГ до уровня контрольного варианта.

Под действием *MG* жизнеспособность бактерий, оцениваемая по МТТ-тесту, в обоих типах культур была снижена: на 40% в низкоаэрируемых и на 20% в нормально аэрируемых. Однако в первом случае нитроксил оказывал цитопротекторное действие, а во втором – цитотоксическое.

#### **Выводы.**

Показано, что донор нитроксила может оказывать цитопротекторное и цитотоксическое действие в условиях карбонильного стресса. Цитопротекторное действие нитроксила может быть обусловлено снижением уровня ассоциированных с белками свободных радикалов и продуктов неферментативного гликирования, возникающих при взаимодействии аминокислотных остатков с *MG*; цитотоксическое – образованием пероксинитрита в реакции с молекулярным кислородом. Результаты этого исследования важны для понимания механизмов защитного и регуляторного действия  $HNO/NO^-$  в клетках.

#### **Заключение.**

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

- 1) Донор нитроксила соль Ангели ингибировал образование конечных продуктов гликирования цитохрома в реакции с метилглиоксалем ( $IC_{50}$  1,7 мМ).
- 2) Метилглиоксаль, добавленный в культуру *E. coli*, тормозил рост бактерий. При этом возрастало количество флуоресцирующих продуктов неферментативного гликирования белков.
- 3) Донор нитроксила кислота Пилоти снижал токсическое действие метилглиоксала на бактериальную культуру, что выражалось в увеличении жизнеспособности клеток, и снижении автофлуоресценции связанных с белками продуктов неферментативного гликирования.
- 4) Влияние донора нитроксила на бактериальные клетки зависело от степени аэрации культуры. В условиях пониженной аэрации нитроксил оказывал цитопротекторное действие.

***Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.***

#### **Список литературы.**

1. Baynes J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. // *Diabetes*. 1991. V. 40. P. 405-412.
2. Thornalley P.J. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1043. P. 111-117.
3. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. Carbonyl stress in bacteria: Causes and consequence. // *Biochemistry (Moscow)*. 2015. V. 80. P. 1655-1671.
4. Mironova R., Niwa T., Dimitrova R., Boyanov M., Ivanov I. Glycation and posttranslational processing of human interferon gamma expressed in *Escherichia coli*. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 51068-51074.
5. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Образование гликированного рекомбинантного легоглобина в клетках *Escherichia coli*. // *Прикл. биохим. микробиол.* 2010. Т. 46. С. 324-330.
6. Asahi K., Ichimori K., Nakazawa H., Izuhara Y., Inagi R., Watanabe T., Miyata T.,

- Kurokawa K. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products. // *Kidney International*. 2000. V. 58. P. 1780-1787.
7. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014. V. 52. P. 161-168.
  8. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigoryeva D.V., Panasenko O.M., Vanin A., Topunov A., Terekhova M., Sokolov A., Cherenkevich S.N., Ruuge E.K. Protective effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione in red blood cell lysis induced by hypochlorous acid. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. V. 2019. e2798154.
  9. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., Timoshin A.A., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. A possible mechanism of the antioxidant action of dinitrosyl iron complexes. // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021. V. 15. P. 313-319.
  10. DuMond J.F., King S.B. The chemistry of nitroxyl-releasing compounds. // *Antioxid Redox Signal*. 2011. V. 14. P. 1637-1648.
  11. Lin E.Q., Irvine J.C., Cao A.H., Alexander A.E., Love J.E., Patel R., McMullen J.R., Kaye D.M., Kemp-Harper B.K., Ritchie R.H. Nitroxyl (HNO) stimulates soluble guanylyl cyclase to suppress cardiomyocyte hypertrophy and superoxide generation. // *PloS One*. 2012. V. 7. e34892.
  12. Liu T., Zhang M., Terry M.H., Schroeder H., Wilson S.M., Power G.G., Li Q., Tipple T.E., Borchardt D., Blood A.B. Hemodynamic effects of glutathione-liganded binuclear dinitrosyl iron complex: evidence for nitroxyl generation and modulation by plasma albumin. // *Mol. Pharmacol.* 2018. V. 93. P. 427-437.
  13. 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. P. 153-160.
  14. Shoman M.E., Aly O.M. Nitroxyl (HNO): A reduced form of nitric oxide with distinct chemical, pharmacological, and therapeutic properties. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. e4867124.
  15. Smulik R., Dębski D., Zielonka J., Michałowski B., Adamus J., Marcinek A., Kalyanaraman B., Sikora A. Nitroxyl (HNO) reacts with molecular oxygen and forms peroxynitrite at physiological pH. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 35570-35581.

**Сведения об авторах**

**Эльвира Ильгизовна Насыбуллина,**

канд. биол. наук, науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** lvirus198709@rambler.ru

**Игорь Сергеевич Пугаченко,**

мл. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** gewalthaber-igor@mail.ru

**Information about authors**

**Elvira Ilgizovna Nasybullina,**

PhD Research Scientist,

Federal Research Center

of Biotechnology

Moscow, Russia

**E-mail:** lvirus198709@rambler.ru

**Igor Sergeevich Pugachenko, Junior Re-**

**search Scientist,**

Federal Research Center

of Biotechnology

Moscow, Russia

**E-mail:** gewalthaber-igor@mail.ru

**Ольга Владимировна Космачевская,**  
канд. биол. наук, ст. науч. сотр.  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные ос-  
новы биотехнологии» Российской академии наук  
Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** rizobium@yandex.ru

**Алексей Федорович Топунов,**  
д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные ос-  
новы биотехнологии» Российской академии наук  
Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** aftopunov@yandex.ru

**Olga Vladimirovna Kosmachevskaya,**  
PhD, Senior Research Scientist,  
Federal Research Center  
of Biotechnology  
Moscow, Russia

**E-mail:** rizobium@yandex.ru

**Alexey Fedorovich Topunov,**  
DBS  
Head of Laboratory,  
Federal Research Center  
of Biotechnology  
Moscow, Russia

**E-mail:** aftopunov@yandex.ru

УДК 546.173:547.963.4  
ГРНТИ 31.17.15, 31.23.27  
DOI  
10.47501/978-5-6044060-2-1.215-219

**И. С. Пугаченко, Э. И. Насыбуллина,  
О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов**  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук

## **ВЛИЯНИЕ НИТРОКСИЛА НА МОДИФИКАЦИЮ ГЕМОГЛОБИНА ОКИСЛЕНИЕМ И ГЛИКИРОВАНИЕМ**

*Нитроксил в биологических системах может работать как классический антиоксидант. Он снижает выход свободных радикалов в реакции гемоглобина с пероксидом трет-бутила. Благодаря этому нитроксил замедляет образование продуктов неферментативного гликирования в реакции гемоглобина с метилглиоксалем.*

**Ключевые слова:** гемоглобин, нитроксил, метилглиоксаль, неферментативное гликирование, окислительная модификация

**I. S. Pugachenko, E. I. Nasybullina, O. V. Kosmachevskaya,  
A. F. Topunov**  
Federal Research Center of Biotechnology

## **EFFECT OF NITROXYL ON MODIFICATION OF HEMOGLOBIN BY OXIDATION AND GLYCATION**

*Nitroxyl in biological systems can work as a classic antioxidant. It has been shown that nitroxyl reduces the yield of free radical products in the reaction of hemoglobin with tert-butyl peroxide. Due to this, nitroxyl slows down the formation of non-enzymatic glycation products in the reaction of hemoglobin with methylglyoxal.*

**Key words:** hemoglobin, nitroxyl, methylglyoxal, non-enzymatic glycation, oxidative modification.

### **Введение**

Оксид азота (NO) в организме может окисляться с образованием катиона нитрозония (NO<sup>+</sup>) и восстанавливаться с образованием нитроксила (HNO). Нитроксил и его депротонированная форма нитроксильный анион обладают высокой биологической активностью, перекрывающейся с действием NO или ONOO<sup>-</sup> [1]. В последние годы наблюдается повышенный интерес к биологии и химии HNO, хотя до сих пор не ясно, существуют ли специализированные биохимические пути образования этой молекулы.

Нитроксил имеет короткое время жизни. Поэтому в исследовательских целях и в

фармакологии используют молекулы-доноры, которые выделяют HNO в ответ на внешние стимулы. Наиболее часто используемые доноры HNO – соль Ангели (триоксодинитрат натрия) и кислота Пилоти (N-гидроксibenзолсульфонамид). К настоящему времени эти доноры HNO/NO<sup>-</sup> хорошо себя зарекомендовали в лечении алкоголизма, сердечно-сосудистых заболеваний и рака [1]. Особенно перспективно их использование в качестве кардиопротекторных средств, поскольку они обладают гипотензивным действием, а также способны улучшать сократимость миокарда и ингибировать его гипертрофию [2-4]. Также известно, что HNO предотвращают ангиогенез в раковой опухоли и вызывает апоптоз раковых клеток [2, 5]. Антираковое действие доноров HNO/NO<sup>-</sup>, по-видимому, связано с образованием ONOO<sup>-</sup>, который вызывает окислительную деградацию ДНК [6].

Помимо антиоксидантного или прооксидантного действия, HNO/NO<sup>-</sup> может влиять на метаболизм клетки за счет модификации тиолсодержащих и железо-гемовых белков [9]. Причем HNO, в отличие от NO, непосредственно взаимодействует с тиолами и тиолсодержащими белками.

В литературе имеются данные о взаимодействии NO с продуктами неферментативного гликирования (AGEs – *Advanced Glycation End products*) [7-10]. В то же время в работе [8] показано, что различные доноры NO ингибируют образование продуктов конечного гликирования – пентозидинов. Антигликирующее действие доноров NO обусловлено способностью оксида азота перехватывать свободные радикалы, возникающие в реакциях неферментативного гликирования [11]. Однако, к настоящему времени в литературе отсутствуют данные о влиянии нитроксила на модификацию белков метилглиоксалем (MG).

**Цель работы.** Изучить влияние антиоксидантное и антигликирующее действие нитроксила по отношению к гемоглобину.

#### Материалы и методы

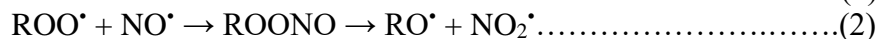
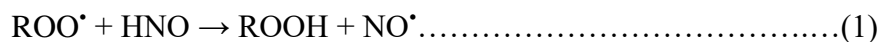
Окислительную модификацию гемоглобина (*Hb*) под действием пероксида *трет*-бутила (*t*-BOOH) и метилглиоксала оценивали по количеству карбонильных производных, с помощью спектрофотометрической детекции аддуктов с 2,4-динитрофенилгидразином по методу [12]. Концентрацию гема определяли пиридингемохромовым методом. Образование межсубъединичных сшивок и агрегатов белка регистрировали методом денатурирующего SDS-электрофореза в 12% ПААГ и жидкостной хроматографии на *Toyopearl HW-55F*. Неферментативно гликированный *Hb* получали в системе *in vitro* при инкубации в стерильных условиях с различными концентрациями MG в присутствии или в отсутствие доноров нитроксила в течении 1-4 суток при 37 °C. Избыток MG удаляли диализом. Степень гликирования *Hb* оценивали по флуоресценции AGEs ( $\lambda_{\text{возб}} = 334 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{исп}} = 440 \text{ нм}$ ). Антиоксидантное и антирадикальное действие донора нитроксила соли Ангели оценивали в реакции *метHb* с *t*-BOOH с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции, а также по скорости образования оксоферрил*Hb* ( $\text{Hb}^{\text{IV}}=\text{O}$ ).

#### Полученные результаты

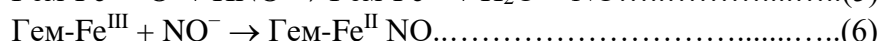
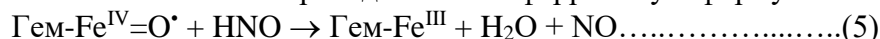
Донор нитроксила – соль Ангели препятствовал образованию карбонильных производных гемоглобина и деградации его гемовой группы под действием различных концентраций *t*-BOOH. Известно, что в реакции органических гидропероксидов с гемопротеидами образуются радикальные продукты ( $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ,  $\text{RO}^{\bullet}$ ,  $\text{ROO}^{\bullet}$ ), которые вызывают окисление гема и аминокислотных остатков белка. Протекторное действие HNO в этой системе, вероятно, связано с его способностью нейтрализовать органические свободные радикалы.

С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции было показано, что HNO/NO<sup>-</sup> дозозависимо снижает выход свободнорадикальных интермедиатов в реакции *метHb* ( $\text{Hb}^{\text{III}}-\text{H}_2\text{O}$ ) с *t*-BOOH. Антирадикальное действие нитроксила можно

объяснить его способностью вступать в реакцию с алкоксильными (RO•) и алкилпероксильными (ROO•) радикалами с образованием нитрозо- и нитропроизводных (реакции 1-4).



Нитроксил также существенно ингибировал образование оксоферрилHb в реакции метHb с t-BOOH, что связано с его способностью восстанавливать и нитрозилировать оксоферрилHb и метHb (реакции 5 и 6). Через 9 мин от начала реакции весь метHb в реакционной смеси окислялся до оксоферрилHb, тогда как в присутствии HNO/NO<sup>-</sup>, только половина метHb переходила в оксоферрильную форму.



Мы предположили, что представленные реакции могут лежать в основе механизма антигликирующего действия HNO. Способность нитроксила купировать реакции неферментативного гликирования изучали в системе *in vitro* при инкубации метHb с высокой концентрацией MG (1 : 90 мМ). В этой системе нитроксил дозозависимо ингибировал образование флуоресцирующих AGEs. Причем в данной системе HNO/NO<sup>-</sup> был более эффективен, чем амингуанидин (стандартное антигликирующее соединение). Нитроксил также снижал количество высокомолекулярных агрегатов субъединиц Hb, возникающих в реакции неферментативного гликирования метилглиоксалем.

Антигликирующее действие соли Ангели было менее выражено по отношению к комплексу Hb с азидом (Hb-Fe<sup>III</sup>-N<sub>3</sub>). Этот факт указывает на то, что антигликирующий эффект нитроксила во многом обусловлен действием HNO/NO<sup>-</sup> на железо гемовой группы. Также в случае Hb-Fe<sup>III</sup>-N<sub>3</sub> было незначительно влияние нитроксила на образование белковых карбониллов.

### **Выводы**

Показанное в работе антиоксидантное и антигликирующее действие нитроксила в сочетании с его кардио- и вазопротекторными свойствами может послужить основой для разработки на основе доноров нитроксила фармакологических препаратов с синергетическим терапевтическим действием, которые будут эффективно защищать клетки сердечно-сосудистой системы и нервной ткани при карбонильном стрессе.

### **Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения. С помощью различных физико-химических методов показано, что донор нитроксила соль Ангели обладает антиоксидантным и антирадикальным действием в системах, моделирующих окисление гемоглобина. Нитроксил замедляет образование карбонильных производных белка, образование межсубъединичных сшивок и деградацию гемовой группы. Также нитроксил снижает выход свободно-радикальных продуктов в реакции Hb с органической перекисью и с метилглиоксалем. Эти эффекты лежат в основе антигликирующего действия нитроксила по отношению к гемоглобину, инкубируемого с метилглиоксалем.

***Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.***

### **Список литературы.**

1. Fukuto J.M. A recent history of nitroxyl chemistry, pharmacology and therapeutic potential. // Br. J. Pharmacol. 2019. V. 176. P. 135-146.

2. Flores-Santana W., Salmon D.J., Donzelli S., Switzer C.H., Basudhar D., Ridnour L., Cheng R., Glynn S.A., Paolucci N., Fukuto J.M., Miranda K.M., Wink D.A. The specificity of nitroxyl chemistry is unique among nitrogen oxides in biological systems. // *Antioxid Redox Signal*. 2011. V. 14. N 9. P. 1659-1674.
3. Andrews K.L., Lumsden N.G., Farry J., Jefferis A.-M., Kemp-Harper B.K., Chin-Dusting J.P.F. Nitroxyl: a vasodilator of human vessels that is not susceptible to tolerance. // *Clin. Sci. (Lond)*. 2015. V. 129. P. 179-187.
4. Keceli G., Majumdar A., Thorpe C.N., Jun S., Tocchetti C.G., Lee D.I., Mahaney J.E., Paolucci N., Toscano J.P. Nitroxyl (HNO) targets phospholamban cysteines 41 and 46 to enhance cardiac function. // *J. Gen. Physiol*. 2019. V. 151. P. 758-770.
5. Lin E.Q., Irvine J.C., Cao A.H., Alexander A.E., Love J.E., Patel R., McMullen J.R., Kaye D.M., Kemp-Harper B.K., Ritchie R.H. Nitroxyl (HNO) stimulates soluble guanylyl cyclase to suppress cardiomyocyte hypertrophy and superoxide generation. // *PloS One*. 2012. V. 7. P. 6-16.
6. Shoman M.E., Aly O.M. Nitroxyl (HNO): a reduced form of nitric oxide with distinct chemical, pharmacological, and therapeutic properties. // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016. V. 2016. P. 1-15.
7. Smulik-Izydorzyc R., Dębowska K., Rostkowski M., Adamus J., Michalski R., Sikora A. Kinetics of azanone (HNO) reactions with thiols: effect of pH. // *Cell Biochem Biophys*. 2021. V. 79. N 4. P. 845-856.
8. Asahi K., Ichimori K., Nakazawa H., Izuhara Y., Inagi R., Watanabe T., Miyata T., Kurokawa K. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products. // *Kidney International*. 2000. V. 58. N 4. P. 1780-1787.
9. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Ванин А.Ф., Бурбаев Д.Ш., Мох В.П., Топунов А.Ф., Рууге Э.К. Образование нового типа динитрозильных комплексов железа, связанных с цистеином, модифицированным метилглиоксалем. // *Биофизика*. 2013. Т. 58. № 2. С. 239-245.
10. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., Timoshin A.A., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. A possible mechanism of the antioxidant action of dinitrosyl iron complexes. // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021. V. 15. N 4. P. 313-319.
11. Шумаев К.Б., Губкина С.А., Кумскова Е.М., Шепелькова Г.С., Рууге Э.К., Ланкин В.З. Механизм образования супероксидного радикала при взаимодействии L-лизина с дикарбонильными соединениями. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. № 4. С. 568-574.
12. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Окислительная модификация белков и активность катепсина и тимоцитов крыс в условиях *in vitro* модулирования синтеза оксида азота (II). // *Казанский медицинский журнал*. 2014. Т. 95. № 4. С. 553–557.

**Сведения об авторах**

**Игорь Сергеевич Пугаченко,**

мл. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [gewalthaber-igor@mail.ru](mailto:gewalthaber-igor@mail.ru)

**Эльвира Ильгизовна Насыбуллина,**

канд. биол. наук, науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [lvirus198709@rambler.ru](mailto:lvirus198709@rambler.ru)

**Information about authors**

**Igor Sergeevich Pugachenko,** Junior Research Scientist,

Federal Research Center

of Biotechnology

Moscow, Russia

**E-mail:** [gewalthaber-igor@mail.ru](mailto:gewalthaber-igor@mail.ru)

**Elvira Ilgizovna Nasybullina,**

PhD

Research Scientist,

Federal Research Center

of Biotechnology

Moscow, Russia

**E-mail:** [lvirus198709@rambler.ru](mailto:lvirus198709@rambler.ru)



**Ольга Владимировна Космачевская,**  
канд. биол. наук, ст. науч. сотр.  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные ос-  
новы биотехнологии» Российской академии наук  
Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** rizobium@yandex.ru

**Алексей Федорович Топунов,**  
д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные ос-  
новы биотехнологии» Российской академии наук  
Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** aftopunov@yandex.ru

**Olga Vladimirovna Kosmachevskaya,**  
PhD, Senior Research Scientist,  
Federal Research Center  
of Biotechnology  
Moscow, Russia  
**E-mail:** rizobium@yandex.ru

**Alexey Fedorovich Topunov,**  
DBS  
Head of Laboratory,  
Federal Research Center  
of Biotechnology  
Moscow, Russia  
**E-mail:** aftopunov@yandex.ru

УДК 546.173:547.963.4

ГРНТИ 31.17.15, 31.23.27

DOI

10.47501/978-5-6044060-2-1.219-224

**Е. Е. Текуцкая, И. И. Павлюченко, Л. Р. Гусарук**  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский  
университет» министерства здравоохранения РФ

### **ПОЛИМОРФИЗМ rs652438 ГЕНА MMP-12 И АНАЛИЗ СТЕПЕНИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК**

*В статье проводится сравнительный анализ степени окислительного повреждения ДНК при буллезном эпидермолизе (БЭ) и бронхиальной астме (БА). Установлено, что концентрация модифицированного основания 8-оксогуанина у больных БЭ в 1,9 раза выше по сравнению с контрольной группой. Различная концентрация 8-оксогуанина при БЭ и БА свидетельствует о выраженности структурных повреждений ДНК при БЭ и практически отсутствии окислительной модификации ДНК при БА.*

**Ключевые слова:** буллезный эпидермолиз, бронхиальная астма, генотипы, окислительное повреждение ДНК, 8-оксогуанин.

**Elena Evgenievna Tekutskaya, Ivan Ivanovich  
Pavlyuchenko, Lyubov Ramazanovna Gusaruk**  
Kuban State University  
Kuban State Medical University

### **rs652438 POLYMORPHISM OF THE MMP-12 GENE AND ANALYSIS OF DEGREE OF OXIDATIVE DAMAGE TO GENOMIC DNA**

*The article provides a comparative analysis of the degree of oxidative DNA damage in epidermolysis bullosa (EB) and bronchial asthma (BA). It was found that the concentration of the modified base 8-oxoguanine in patients with BE is 1.9 times higher than in the control group. Different concentrations of 8-oxoguanine in BE and BA indicate the severity of structural DNA damage in BE and the almost absence of oxidative modification of DNA in AD.*

**Key words:** Epidermolysis bullosa, bronchial asthma, genotypes, oxidative damage to DNA, 8-oxoguanine.

#### **Введение**

Буллезный эпидермолиз (БЭ) – *Epidermolysis bullosa*, клинически и генетически гетерогенная группа орфанных заболеваний, включающих около 30 генотипических и фенотипических форм. Все они характеризуются врожденной склонностью к образованию булл (пузырей) на коже и слизистых оболочках пищевода, кишечника, дыхательной, мочеполовой систем[1]. Эрозивно-язвенные дефекты могут сохраняться на коже от одного месяца до нескольких лет, являясь предрасполагающим фактором к образованию плоскоклеточного рака кожи - основной причины преждевременной смерти

больных [2,3]. Внекожные проявления и их осложнения в других эпителизированных органах делают БЭ мультисистемным заболеванием с высокой смертностью [4, 5]. Бронхиальная астма (БА) является широко распространенным хроническим заболеванием, которым страдает 300 млн человек в мире. Основой патогенеза БА является тяжелой воспалительный процесс, включающий морфологические и функциональные изменения бронхиального дерева, характеризующиеся существенным вкладом в их развитие наследственной компоненты [6]. БА и БЭ относят к мультифакториальным заболеваниям и возникают при взаимодействии неблагоприятных факторов наследственной и не наследственной природы.

Известно, что ксенобиотики, высокорекреационные клеточные метаболиты, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение приводят к активации процессов свободно-радикального окисления и, как следствие, накоплению в клетках активных форм кислорода (свободных радикалов, перекиси водорода, синглетного кислорода и пр.). Вызывая окислительную модификацию различных клеточных структур, они воздействуют, в том числе, на ее генетический материал, приводя к повреждению азотистых оснований ДНК, дестабилизируя геном. Наиболее распространенным продуктом такой окислительной модификации азотистых оснований является 8-оксо-7,8-дигидрогуанин (8-*oxoG*) [7]. В организме выработана многоуровневая система защиты и репарации генетического аппарата. Образуясь при повреждении ДНК, 8-*oxoG* устраняется или модифицируется за счет наличия мультифакторной системы антиоксидантной защиты и системы эксцизионной репарации. В результате функционирования фермента 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазы происходит последовательный гидролиз *N*-гликозидной связи с 3'конца от повреждения и связывание 8-*oxoG* активным центром. Одновременно фермент проявляет высокоспецифичную  $\beta$ -лиазную активность в отношении оставшихся *AP*-сайтов, «выворачивая» 8-*oxoG* из молекулы ДНК. Накапливаясь в биологических жидкостях, 8-*oxoG* служит одним из лучших биомаркеров генотоксического оксидативного стресса при различных патофизиологических состояниях и заболеваниях [8]. С образованием 8-*oxoG* в ДНК тесно связывают такие процессы в организме как канцерогенез, воспаление, старение, развитие ряда возрастных патологий. По данным *ESCODD* (*European Standards Committee on Oxidative DNA Damage*) уровень эндогенного 8-*oxoG* в ДНК составляет ~1 8-*oxoG* на 10<sup>6</sup>G. При генотоксическом оксидативном стрессе этот показатель увеличивается в несколько раз [9]. Прослеживается тесная связь *MMP-12* с заболеваниями бронхолегочной системы и о значительная роль соответствующего энзима в реакциях легких на неблагоприятные факторы. Установлено, что уровень *MMP-12* зависит от тяжести заболевания при астме и ХОБЛ [10] и независимо от полиморфизма *rs2276109*, значительно выше у пациентов с ХОБЛ. На основании того, что экспрессия *MMP12* значительно повышена у пациентов с астмой, делается вывод о возможности использования кодирующего данный белок гена в качестве диагностического биомаркера заболевания [11]. Для гена *MMP-12* известно несколько полиморфных вариантов, при которых измененная структура гена приводит к изменению его функционала [12]. Полиморфный локус *rs652438 MMP-12* является несинонимичным (*Sift Score*=0,01), связан с заменой *Asp357Ser*, расположен в экзоне 8 в области модифицированных белков-гистонов, маркирующих промоторы (*H3K9 ac*), энхансеры (*H3K4me1*, *H3K27ac*), а также находится в неравновесии по сцеплению с однонуклеотидными полиморфизмами, влияющими на экспрессию *MMP-12*.

**Целью** настоящей работы явилось изучение частот индивидуальных полиморфных вариантов *rs652438* гена *MMP-12*, выявление характера окислительного повреждения геномной ДНК при БА и БЭ и сравнительная оценка степени окислительного повреждения ДНК больных БЭ и БА.

#### Материалы и методы

В исследовании приняли участие 85 пациентов с установленным диагнозом БА (J45; МКБ-10), выборка из шести больных БЭ и 93 условно здоровых донора, сравнимых по полу и возрасту. Материалом для молекулярно-генетического исследования



служила ДНК, выделенная из цельной крови. Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА. Выделение ДНК производили сорбционным методом, используя наборы реагентов «ДНК-Сорб В» (ФГУН ВНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Типирование полиморфного варианта rs652438 гена *ММП12* осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью TaqMan-зондов на амплификаторе *Rotor-Gene* (Qiagen, Германия) наборами реагентов «Синтол» (Россия).

Для определения устойчивости геномного материала к окислительной модификации в условиях окислительной нагрузки образцы цельной крови обрабатывали электромагнитным полем (ЭМП) частотой 3, 30 и 50 ГЦ в соответствии с методикой, описанной ранее [13]. Степень окислительного повреждения ДНК оценивали по уровню концентрации 8-*oxoG* в сыворотке крови, содержание которого определяли методом иммуноферментного анализа с моноклональными антителами наборами реагентов *DNA Damage, ELISA Kit (Immundiagnostic, Германия)* на микропланшетном ридере *Thermo Fisher Scientific Multiskan* (Финляндия) [14].

Соответствие распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга оценивали в *on-line* сервисе *WpCalc* (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>). Для сравнения частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий  $\chi^2$ . Характер взаимосвязи *SNP* с заболеванием оценивали по отношению шансов (OR) при 95% доверительном интервале. При  $OR > 1$  исследуемый фактор является фактором риска заболевания, при  $OR = 1$  – ассоциация отсутствует, если  $OR < 1$ , фактор рассматривается, как протекторный развития заболевания.

Достоверность степени окислительного повреждения ДНК оценивали непараметрическим *U*- критерием Манна-Уитни. Различия по всем изучаемым параметрам считали статистически значимыми при  $P \leq 0,05$ . Для статистической обработки использовался пакет программ *StatPro*.

#### Результаты и обсуждение

Соотношение аллелей и генотипов в контрольной группе и группе пациентов с бронхиальной астмой представлены в таблице. Из данных, представленных в таблице, видно, что в контрольной группе условно здоровых доноров преобладающим является генотип *AA* – 68 человек, что составляет 73%. На долю генотипа *AG* – приходится 25% (23 человека), генотипа *GG* – 2% (2 человека). В группе больных БА так же преобладающим оказался генотип *AA*. Его носителями являются 75 человек, что составляет 88% от общего количества наблюдаемых больных. Гетерозиготный генотип *AG* имеют 9 человек – 11% и гомозиготный генотип по аллелю *GG* в данной группе выявлен у одного пациента, что составляет менее 1%.

Таблица. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs 652438 гена *ММП-12* у наблюдаемых пациентов с бронхиальной астмой в сравнении с показателями контрольной группы

Генотипы, аллели	Контрольная группа N=93 чел Абс, %	Больные бронхиальной астмой N=85 чел Абс, %
AA	68	75
	73%	88%
AG	23*	9*
	25%*	11%*
GG	2	1
	2%	1%
A	0,85	0,94
G	0,15	0,06

\* $df=2$ ;  $\chi^2=8.898$  Критическое значение  $\chi^2$  при  $p=0.05$ -5.991  $p<0.05$  Уровень значимости  $p=0.012$

## Секция 5. ГЕМОГЛОБИНЫ, КРОВЬ, ЖЕЛЕЗО И СТРЕСС

Сопоставление частот генотипов между двумя группами показало наличие достоверных различий для гетерозигот. В контрольной группе этот показатель в 2,3 больше чем при БА ( $p < 0.05$ ). Частоты генотипов *AA* и *GG* достоверно не отличаются.

Протекторный эффект полиморфного варианта локуса *rs652438* в отношении развития БА на наш взгляд обусловлен снижением экспрессивности гена *MMP12*, и как следствие, снижением степени деструкции бронхиального дерева. Подавление активности гена может происходить если между аллелями *A* и *G* наблюдается разница в способности респонсивных элементов промотора связываться с транскрипционным фактором. Очевидно, для аллеля *G* это взаимодействие является менее эффективным, чем для аллеля *A*. С другой стороны, вызванная данным полиморфизмом замена аспарагина на серин сопровождается изменением структуры кодируемого фермента [Chang J.J., et al., 2016.], что тоже может приводить к снижению его активности и агрессивности.

Для выявления степени окислительного повреждения ДНК, рассматривали показатель концентрации *8-oxoG* в сыворотке крови. В контрольной группе этот параметр варьирует от 3,1 до 11,0 нг/мл, в среднем составляя  $7,7 \pm 1,4$  нг/мл (Рис.).

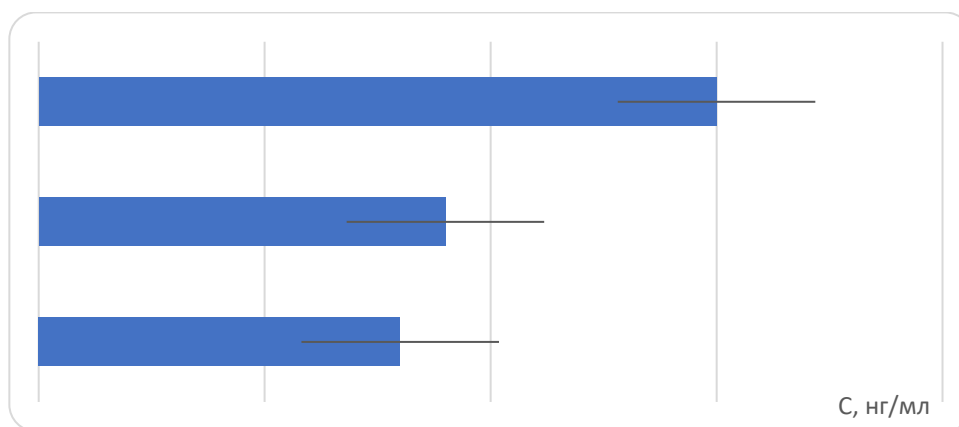


Рис. Содержание *8-oxoG* в сыворотке крови здоровых (контроль), больных БЭ и больных БА. ( $U = 1,5$ ;  $U$  критическое = 3 при  $p \leq 0,01$ ;  $U$  критическое = 7 при  $p \leq 0,05$ ). С-концентрация *8-oxoG*.

В группе больных БЭ уровень содержания *8-oxoG* изменяется от 10,0 до 22,2 нг/мл и в среднем составляет  $14,8 \pm 2,1$  нг/мл, что в 1,9 раза выше, чем в контроле. Критерий Манна-Уитни  $U=1,5$  свидетельствует о малой зоне перекрещивающихся значений между двумя выборками и достоверности выявленных отличий ( $p \leq 0,01$ ). При БА уровень изучаемого метаболита составил в среднем по выборке  $9,4 \pm 1,7$  нг/мл, что сопоставимо с контролем. Это дает основание не рассматривать БА как фактор выраженного окислительного стресса, проявляющегося на субклеточном уровне и значимо влияющего на целостность наследственного аппарата.

Почти двукратное увеличение концентрации *8-oxoG* при БЭ свидетельствует о значительной степени нарушения структуры молекулы ДНК. Так как большая часть *8-oxoG* образуется в результате воздействия активных форм кислорода, наблюдаемая в данном случае дестабилизация генома происходит в результате наличия окислительного генотоксического стресса, который формируется в результате активации реакций свободно-радикального окисления и недостаточности систем антиоксидантной защиты. Главное биологическое последствие образования *8-oxoG* – мутагенез. Окисленный гуанин способен комплементарно соединяться не только с цитозином, но и с аденином, образуя стабильную неканоническую (Хугстиновскую) пару *oxoG-A*. В следующем цикле репликации возникает мутация по типу трансверсии *G/C → T/A* [15]. Выработанная в организме система защиты, призвана восстановить повреждения. Однако, имеющее место при БЭ накопление *8-oxoG*, может служить триггером мутаций, которые способны ослабить процессы эксцизионной репарации, не позволяя обеспечить восстановление структуры ДНК. Таким образом, статистически значимое повышение уровня *8-oxoG* и накопление его в сыворотке крови больных БЭ свидетельствует о том,

что при данной патологии происходят значительные деструктивные нарушения генома и причиной этих нарушений, прежде всего, является избыточность процессов оксидативного характера.

#### **Заключение**

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

1. Определены частоты генотипов и аллелей полиморфного локуса *rs652438* гена *ММР12* в контрольной группе и при бронхиальной астме.

2. Характер окислительного повреждения ДНК, вызванного действием ЭМП, свидетельствует о более раннем по сравнению с контролем истощении адаптационных механизмов генома при БА.

3. Повышение концентрации 8-*охоG* в биологических жидкостях наблюдаемых пациентов, являющегося молекулярным маркером генотоксического стресса, дает основание считать, что при БА происходит значительное оксидативное повреждение структуры ДНК, нарушающее молекулярно-генетический статус организма. Возможно, это является одной из причин замедления процессов эксцизионной репарации. Выявление характера повреждения генетического материала клеток при БА может внести определенный вклад в дальнейшее понимание этиологии и патогенеза данной патологии.

4. При БА количество изучаемого метаболита не отличается от контроля, что позволяет предположить, что репарационные механизмы при данной патологии, в отличие от БА в целом сохраняются. Это, вероятно, объясняется наличием достаточных резервов системы клеточной антиоксидантной защиты у данной категории больных.

**Источник финансирования** *Исследование проведено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках выполнения проекта МФИ-20.1/119.*

#### **Список литературы**

1. Shinkuma S. *Dystrophic epidermolysis bullosa: a review. Clinikal, cosmetic and Investigational Dermatology.* 2015; 8: 275-284. DOI:10.2147/CCID.S54681.
2. Kiritsi D., Gacia M., Brander R., Has C., Meijer R., Escamez M.J., Kohlhase J., van der Akker P., Scheffer H., Jonkman M.F., del Rio M., Bruckner-Tuderman L., Pasmooij A.M.G. *Mechanisms of Natural Gene Therapy in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. Journal of Investigative Dermatology.* 2014; 134: 2097-2104. DOI:10.1038/jid.2014.118.
3. Bruckner-Tudermann L., Yas K. *Desorders of cutaneous basement membran zone-the paradigm of epidermolysis bullosa. Matrix Biology.* 2014; 33: P.29-34. DOI: 10.1016/j.matbio.
4. Kuhl T., Mezger M., Hausser I., Guey L.T., Handgretinger R., Bruckner-Tuderman L., Nystrom A. *Collagen VII Half-Life at the Dermal-Epidermal Junction Zone: Implication for Mechanisms and Therapy of Genodermatoses. Journal of Investigative Dermatology.* 2016; 136: 1116-1123. DOI: 10.1016/j.jid.2016.02.002.
5. Uitto J., Bruckner-Tuderman L., McGrath J.A., Riedl R., Robinson C. *EB-2017-Progress in Epidermolysis Bullosa Research toward Treatment and Cure. Journal of Investigative Dermatology.* 2018; 138:1010-1016. DOI:10.1016/j.jid.
6. Kachkovska VV, Kovchun AV, Moyseyenko IO, Dudchenko IO, Prystupa LN. *Arg16Gly Polymorphism in the  $\beta$ 2-adrenoceptor gene in patients with bronchial asthma. Wiadomosci Lekarskie.* 2021;74(5):1200-1203. PMID: 34090290.
7. Ba Xueqing, Aguilera-Aguirre L., Rashid Q.T.A.N., Basci A., Radak Z., Sur S., Hosoki K., Hegde M.L., Boldogh I. *The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation. Reviewe. International Journal of Molecular Sciences.* 2014; 15 (9): 16975-16997. DOI:10.3390/ijms150916975.
8. Лукина М.В., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. *Кинетический анализ узнавания поврежденных нуклеотидов мутантными формами 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы HOGG1. Биоорганическая химия.* 2017; 43(1): 4-17 DOI:10.7868/S0132342317010055.

9. Жарков Д.О. ДНК- гликозилазы-основные элементы системы репарации ДНК. Вестник Российской академии наук. 2013; 83(3):112-119. DOI: 10.7868/S0869587313010180.
10. Abd-Elaziz K, Jesenak M, Vasakova M, Diamant Z. Revisiting matrix metalloproteinase 12: its role in pathophysiology of asthma and related pulmonary diseases. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2021 Jan;27(1):54-60. doi: 10.1097/MCP.0000000000000743.
11. Du L, Chen F, Xu C, Tan W, Shi J, Tang L, Xiao L, Xie C, Zeng Z, Liang Y, Guo Y. Increased MMP12 mRNA expression in induced sputum was correlated with airway eosinophilic inflammation in asthma patients: Evidence from bioinformatic analysis and experiment verification. *Gene*. 2021 Dec 15;804:145896. doi:10.1016/j.gene.2021.145896.
12. Strelkova M.I., Senatorova G.S., Polyakov V.V. The role of polymorphisms of matrix metalloproteinases' polymorphisms 1 and 12 in the formation of wheezing syndrome among children with recurrent bronchitis. *Wiadomosci Lekarskie* . 2021;74(7):1595-1599. PMID: 34459757.
13. Текуцкая Е.Е., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Влияние переменного магнитного поля на хемилюминесценцию лимфоцитов периферической крови человека и производство ими провоспалительных цитокинов. *Биофизика* Т.67, №1.С.113-120 doi: 10.31857/s0006302922010112
14. Павлюченко И.И., Гусарук Л.Л., Текуцкая Е.Е., Рубцова И.Т. Распространенность и молекулярно-генетические особенности буллезного эпидермолиза в популяции жителей Краснодарского края. *Кубанский научный медицинский вестник* 2020; 27(5): С.88-99. doi: 10.25207/1608-6228-2020-27-5-88-99.
15. Попов А.В., Юдкина А. В., Воробьев Ю.Н., Жарков Д.О. Каталитически компетентные конформации активного центра 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека. *Биохимия*. 2020; 85 (2): 225-238. DOI: 10.31857/S0320972520020062

**Сведения об авторах**

**Елена Евгеньевна Текуцкая,**

к.х. н., доцент,  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»,  
Краснодар, Россия

**E-mail:** tekytska@mail.ru

**Иван Иванович Павлюченко,**

д.м.н., профессор  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный  
медицинский университет» министерства  
здравоохранения РФ,  
Краснодар, Россия

**E-mail:** pavluc@mail.ru

**Любовь Рамазановна Гусарук,**

к.б.н., доцент,  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный  
медицинский университет»  
министерства здравоохранения РФ,  
Краснодар, Россия

**E-mail:** gusaruk@yandex.ru

**Information about authors**

**Elena Evgenievna Tekutskaya, Ph.D., Associate Professor,**

Kuban State University  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** tekytska@mail.ru

**Ivan Ivanovich Pavlyuchenko,**

Doctor of Medical Sciences, Professor,  
Kuban State Medical University  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** pavluc@mail.ru

**Lyubov Ramazanovna Gusaruk, Ph.D., Associate Professor,**

Kuban State Medical University  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** gusaruk@yandex.ru

УДК 577.29  
ГРНТИ 34.15.01  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.224-230

<sup>1,2</sup>М.В. Беженар, <sup>1</sup>М. И. Дроботенко, <sup>1,2</sup>А. А. Свидлов,  
<sup>1</sup>О. М. Лясота, <sup>3</sup>В. В. Точеная, <sup>3</sup>А. О. Сулима

<sup>1</sup>Кубанский государственный университет

<sup>2</sup>ЮНЦ РАН

<sup>3</sup>МАОУ лицей № 4

**ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА СТАБИЛЬНОСТЬ  
МОЛЕКУЛЫ ДНК**

*В статье на основе численного решения механической математической модели гена интерферона альфа 17 и фрагмента гена дрозофилы проведен анализ влияния вязкости внешней среды на динамику молекулы ДНК и ее стабильность. Показано, что увеличение вязкости приводит к быстрой стабилизации угловых колебаний азотистых оснований, а уменьшение вязкости изменяет динамику ДНК: увеличивается скорость изменения угловых отклонений азотистых оснований и угловые деформации нитей ДНК увеличиваются в каждый момент времени.*

**Ключевые слова:** открытые состояния молекулы ДНК, механическая модель молекулы ДНК, угловые отклонения цепочки гена

<sup>1,2</sup>М. В. Bezhenar, <sup>1</sup>М. I. Drobotenko, <sup>1,2</sup>А. А. Svidlov, <sup>1</sup>О. М. Lyasota, <sup>3</sup>В. V. Tochenaya, <sup>3</sup>А. О. Sulima

<sup>1</sup>Kuban State University

<sup>2</sup>SSC RAS

<sup>3</sup>Krasnodar Lyceum No. 4

## **INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS ON THE STABILITY OF THE DNA MOLECULE**

*In the article, based on the numerical solution of a mechanical mathematical model of the interferon alpha 17 gene and a fragment of the drosophila gene, the influence of the viscosity of the external environment on the dynamics of the DNA molecule and its stability is analyzed. It is shown that an increase in viscosity leads to rapid stabilization of the angular oscillations of nitrogenous bases, and a decrease in viscosity changes the dynamics of DNA: the rate of change in the angular deviations of nitrogenous bases increases and the angular deformations of DNA strands increase at each moment of time.*

**Keywords:** open states of the DNA molecule, mechanical model of the DNA molecule, angular deviations of the gene chain.

### **Введение**

Колебания вязкости в ядре клетки имеют широкие пределы. Когда молекула ДНК переходит из области высоких значений вязкости в область низких значений, могут возникать открытые состояния, пузырьки денатурации и расплетение нитей ДНК. Эти процессы приводят к нестабильности ДНК, которая со временем увеличивается. Таким образом, в работе рассматривается влияние вязкости внешней среды на диссипацию энергии колебательных движений азотистых оснований молекулы ДНК. Изучение на основе описанной модели молекулярной динамики физиологических процессов при различных показателях реологического поведения нуклеоплазмы позволит получить более глубокое понимание процессов неравновесной физики активного вещества в живом организме.

Изучение поведения нуклеиновых кислот под действием внешней силы при различных показателях энтропии в биологических молекулах является актуальной задачей [1, 2]. Необходимо отметить, что почти все взаимодействия нуклеопротеидов и манипуляции с ДНК связаны с ее механическими деформациями. Вариации механических свойств ДНК играют фундаментальную роль в регуляции разнообразных процессов, вовлеченных в организацию хроматина в масштабе всего генома [3], а механика ДНК является важным компонентом ее функциональных особенностей [3, 4]. На сегодняшний день механические модели являются мощным исследовательским методом [5, 6], не требующим наличия суперкомпьютера для проведения расчетов.

### **Цель работы**

В нашей работе методом математического моделирования исследуется влияние вязкости внешней среды на внутреннюю динамику и стабильность молекулы ДНК.

### **Материалы и методы**

В представленной работе в рамках механической модели проведены оценочные

эксперименты по влиянию вязкости внешней среды на процессы раскрытия пар оснований.

Для моделирования динамики молекулы ДНК использовали математическую модель, описывающую вращательное движение азотистых оснований вокруг сахаро-фосфатной цепочки. Для построения модели используется аналогия между молекулой ДНК и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников. При этом вращающимся маятникам соответствуют азотистые основания, а упругой нити, к которой прикреплены эти маятники, - сахаро-фосфатные цепочки молекулы ДНК; водородной связи пары комплементарных азотистых оснований соответствует упругая связь соответствующей пары маятников [6].

Влияние вязкости внешней среды на динамику ДНК будем исследовать на примере гена интерферона alpha 17 ( $n = 980$ ) и фрагмента гена дрозофилы ( $n = 5000$ ) [25]. изменению параметра  $\lambda$  будет соответствовать изменение вязкости внешней среды. Параметр  $\lambda$  взят от 0.1 до 4, поскольку вязкость окружающей среды может меняться в широких пределах [7].

### Полученные результаты

Исследование динамики ДНК проведено на основе численного решения задачи [8], результаты расчетов представлены в графическом виде.

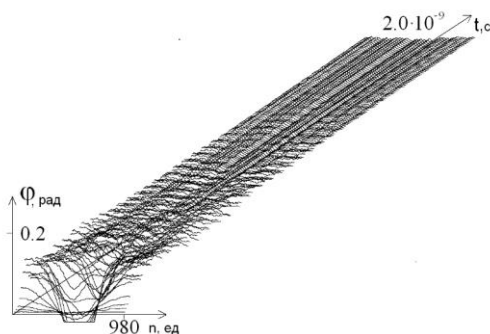


Рисунок 1. Графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале  $[0; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$  при  $\lambda = 1.0$ .

Из рисунка 1 видно, что после выведения системы из равновесия происходит постепенная стабилизация амплитуды угловых колебаний.

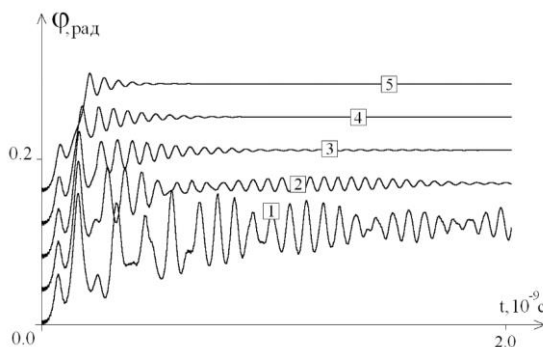


Рисунок 2. Графики средних угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале  $[0; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ : 1 – при  $\lambda = 0.1$ ; 2 - при  $\lambda = 0.5$ ; 3 - при  $\lambda = 1.0$ ; 4 - при  $\lambda = 2.0$ ; 5 - при  $\lambda = 4.0$ .

Из рисунка 2 видно, что уменьшение вязкости внешней среды приводит к увеличению амплитуды средних угловых отклонений азотистых оснований, что может привести к возникновению открытых состояний и расплетению молекулы ДНК.

На рисунках 3 и 4 изображены графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале  $[1.9 \cdot 10^{-9} \text{ с}; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$  при  $\lambda = 1.0$  и  $\lambda = 0.1$  соответственно. Видно, что при  $\lambda = 0.1$  графики угловых отклонений цепочки ДНК изменяются во

## Секция 5. ГЕМОГЛОБИНЫ, КРОВЬ, ЖЕЛЕЗО И СТРЕСС

времени значительно, чем при  $\lambda = 1.0$ , что объясняет увеличение амплитуды средних угловых отклонений. Кроме того, в каждый момент времени при  $\lambda = 0.1$  первая цепочка ДНК испытывает значительно большие угловые деформации, чем при  $\lambda = 1.0$ , что ведет к уменьшению стабильности молекулы ДНК.

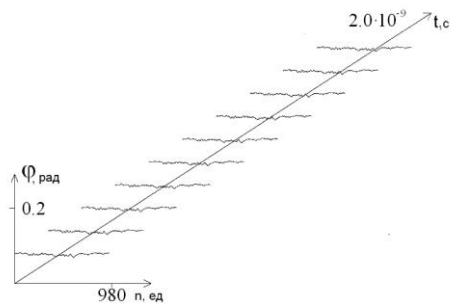


Рисунок 3. Графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале  $[1.9 \cdot 10^{-9} \text{ с}; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$  при  $\lambda = 1.0$ .

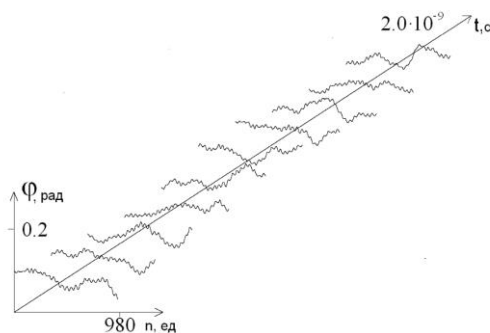


Рисунок 4. Графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале  $[1.9 \cdot 10^{-9} \text{ с}; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$  при  $\lambda = 0.1$ .

Для  $\lambda = 0.1$  был увеличен временной интервал исследования до  $[0; 6 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ , результаты приведены рисунку 5 (представлены графики средних угловых отклонений первой цепочки гена интерферона), на рисунках 6 и 7 изображены графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале  $[5.9 \cdot 10^{-9} \text{ с}; 6 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$  при  $\lambda = 1$  и  $\lambda = 0.1$  соответственно.

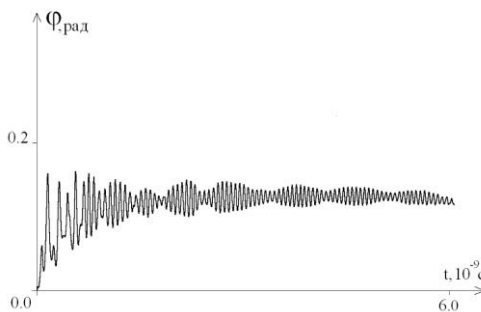


Рисунок 5. График средних угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале  $[0; 6 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$  при  $\lambda = 0.1$ .

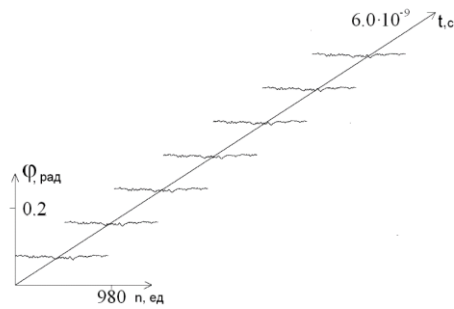


Рисунок 6. Графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале  $[5.9 \cdot 10^{-9}$  с;  $6 \cdot 10^{-9}$  с] при  $\lambda = 1.0$ .

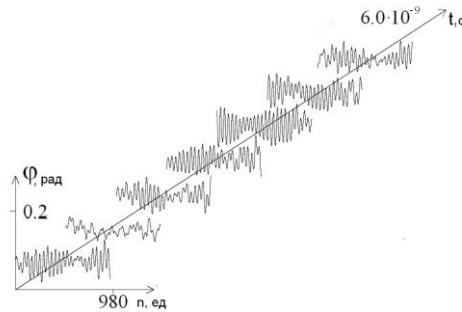


Рисунок 7. Графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале  $[5.9 \cdot 10^{-9}$  с;  $6 \cdot 10^{-9}$  с] при  $\lambda = 0.1$ .

Из приведенных рисунков видно, что при малой вязкости растворителя ( $\lambda = 0.1$ ) на достаточно длинном временном интервале не наблюдается затухание амплитуды угловых отклонений азотистых оснований (рассеивание энергии колебаний), т.е. происходит нарушение стабильности молекулы ДНК.

На рисунке 8 приведены графики средних угловых отклонений первой цепочки фрагмента (5000 оснований) гена дрозофилы на интервале  $[0; 2 \cdot 10^{-9}$  с] для различных значений параметра  $\lambda$ .

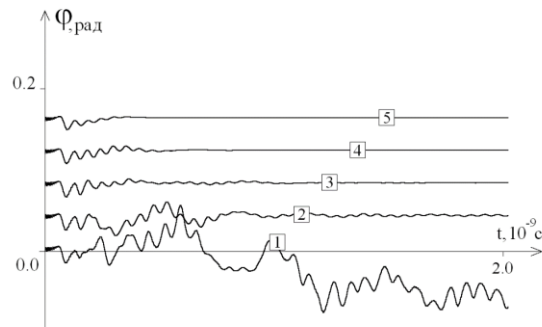


Рисунок 8. Графики средних угловых отклонений первой цепочки фрагмента гена дрозофилы на интервале  $[0; 2 \cdot 10^{-9}$  с]: 1 - при  $\lambda = 0.1$ ; 2 - при  $\lambda = 0.5$ ; 3 - при  $\lambda = 1.0$ ; 4 - при  $\lambda = 2.0$ ; 5 - при  $\lambda = 4.0$ .

Таким образом, результаты расчетов указывают на адекватность используемой механической модели и значений коэффициентов. Как было отмечено ранее, механические модели ДНК являются мощнейшим средством исследования ее свойств [9]. При этом, используемая нами механическая модель учитывает неоднородность последовательности пар нуклеотидов, энергию водородных связей между парами азотистых оснований, взаимодействие с окружающей средой, возникновение открытых состояний, позволяет заменять атом водорода на дейтерий в водородных связях между парами оснований и т.д. Модель позволяет производить расчеты следующих параметров: вероятности возникновения открытых состояний в зависимости от критической энергии водородных связей; вероятность возникновения пузырьков денатурации различной длины по всему гену [10]; определять наиболее вероятные места возникновения открытых состояний в гене [11]; рассчитывать частоты колебаний гена в зависимости от внешнего воздействия [8] и т.д.



### Выводы

Показано, что увеличение вязкости приводит к быстрой стабилизации угловых колебаний, а уменьшение вязкости изменяет динамику молекулы ДНК: увеличивается скорость изменения угловых отклонений азотистых оснований и в каждый момент времени увеличиваются угловые деформации цепочек молекулы ДНК. Эти процессы приводят к нестабильности молекулы ДНК, которая увеличивается с ростом времени.

### Заключение

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

В работе на основе численного решения механической математической модели для гена интерферона альфа 17 и фрагмента гена дрозофилы выполнен анализ влияния вязкости внешней среды на динамику молекулы ДНК и ее стабильность. Важно подчеркнуть, что вязкостно упругая реорганизация нуклеоплазмы, по-видимому, определяет быструю компоненту релаксации ДНК внутри ядра, поддерживая, например, ее суперспирализацию и предупреждая возникновение аномальных угловых отклонений, стимулирующих возникновение открытых состояний. При этом для генов с меньшей нуклеотидной последовательностью характерна большая амплитуда угловых колебаний, что увеличивает риск возникновения сбоев в считывании информации при транскрипции. Моделирование динамики молекулы ДНК с помощью представленной в работе математической модели, описывающей вращательное движение азотистых оснований вокруг сахара-фосфатной цепочки, представляет интерес для определения рисков сбоев в считывании генетической информации при заболеваниях, сопровождающихся нарушениями микрореологических показателей в ядре, что может наблюдаться при различной патологии (нейродегенеративных заболеваниях старения, онкологии и других). Также изучение на базе описанной модели молекулярной динамики физиологических процессов при разных показателях реологического поведения нуклеоплазмы позволит получать более глубокие представления о процессах неравновесной физики активного вещества в живой клетке.

**Работа выполнена при финансовой поддержке Кубанского научного фонда (проект Н-21.1/11) и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-2366.2022.1.4).**

### Список литературы

1. Einert T.R., Orland H., Netz R.R. Secondary structure formation of homopolymeric single-stranded nucleic acids including force and loop entropy: implications for DNA hybridization // *Eur Phys J E Soft Matter*. 2011; No. 34. P. 55.
2. Kinoshita M. Roles of translational motion of water molecules in sustaining life // *Frontiers in Bioscience*. 2009. No 9(14). P. 3419-3454.
3. Basu A, Bobrovnikov DG, Ha T. DNA mechanics and its biological impact // *J Mol Biol*. 2021. No 433(6). P. 166861.
4. Basu A, Bobrovnikov DG, Qureshi Z, Kayikcioglu T, Ngo TTM, Ranjan A, Eustermann S, Cieza B, Morgan MT, Hejna M, Rube HT, Hopfner KP, Wolberger C, Song JS, Ha T. Measuring DNA mechanics on the genome scale. *Nature*. 2021. No 589(7842). P. 462-467.
5. Manghi, M., Destainville, N. Physics of base-pairing dynamics in DNA // *Physics Reports*. 2016. No 631. P. 1–41.
6. Yakushevich, L.V.; Krasnobaeva, L.A. Ideas and methods of nonlinear mathematics and theoretical physics in DNA science: the McLaughlin-Scott equation and its application to study the DNA open state dynamics. *Biophys Rev*. 2021. No 13. P. 315–338.
7. Ferreira L.A., Uversky V.N., Zaslavsky B.Y. Effects of amino acids on solvent properties of water // *Journal of Molecular Liquids* 2019. No 277. P. 123 – 1311.
8. Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. DNA dynamics under periodic force effects // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol.22. No 15. P. 7873.
9. Shigaev, A.S.; Ponomarev, O.A.; Lakhno, V.D. Theoretical and experimental investigations of DNA open states. *Math. Biol. Bioinform*. 2013. No 8. P. 553–664.
10. Svidlov A.A., Drobotenko M.I., Basov A.A., Elkina A.A., Gerasimenko E.O., Malyshko V.V., Baryshev M.G., Dzhimak S.S. Influence of the 2H/1H isotope composition of the water

*environment on the probability of denaturation bubble formation in a DNA molecule // Physics of Wave Phenomena. 2021. Vol. 29. No 2. P. 180–185.*

11. 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. Vol. 25, No 16. P. 3753.*

**Сведения об авторах**

**Мария Викторовна Беженар,**  
преподаватель, младший научный сотрудник  
Кубанский государственный университет,  
Краснодар, Россия  
ЮНЦ РАН,  
Ростов-на-Дону, Россия  
**E-mail:** mia1610@yandex.ru

**Михаил Иванович Дроботенко,**  
к.ф.-м.н., старший научный сотрудник  
Кубанский государственный университет,  
Краснодар, Россия  
**E-mail:** mdrobotenko@mail.ru

**Александр Анатольевич Свидлов,**  
к.ф.-м.н., научный сотрудник  
Кубанский государственный университет,  
Краснодар, Россия  
ЮНЦ РАН  
**E-mail:** svidlov@mail.ru

**Оксана Михайловна Лясота,**  
ведущий инженер НИЧ  
Кубанский государственный университет,  
Краснодар, Россия  
**E-mail:** artsybasheva@mail.ru

**Вероника Владиславовна Точеная,**  
учащаяся  
МАОУ лицей № 4,  
Краснодар, Россия  
**E-mail:** nikole.nii2000@gmail.com

**Анна Олеговна Сулима,**  
учащаяся  
МАОУ лицей № 4,  
Краснодар, Россия  
**E-mail:** sulimaanyla@icloud.com

**Information about authors**

**Maria Viktorovna Bezhenar,**  
Research Scientist  
Kuban State University,  
Krasnodar, Russia  
SSC RAS  
Rostov na Donu

**E-mail:** mia1610@yandex.ru  
**Mikhail Ivanovich Drobotenko,**  
PhD, Research Scientist  
Kuban State University  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** mdrobotenko@mail.ru  
**Alexander Anatolievich Svidlov,**  
PhD, Research Scientist  
Kuban State University,  
SSC RAS  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** svidlov@mail.ru  
**Oksana Mikhailovna Lyasota,**  
Leading engineer  
Kuban State University  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** artsybasheva@mail.ru  
**Veronika Vladislavovna Tochenaya,** Krasnodar Lyceum No. 4  
Krasnodar, Russia  
**E-mail:** nikole.nii2000@gmail.com

**Anna Olegovna Sulima,**  
Krasnodar Lyceum No. 4  
Krasnodar, Russia  
**E-mail:** sulimaanyla@icloud.com

УДК 577.12  
ГРНТИ 34.15.15, 31.27.15  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.230-235

**Е. А. Судакова, А. В. Шулькин, Ю. В. Абаленихина,  
Е. Н. Якушева**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ОКСИДА АЗОТА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ Р - ГЛИКОПРОТЕИНА**

*В статье говорится о влиянии оксида азота (NO) на функционирование белка-транспортера Р-гликопротеина (Pgp) в клетках линии Сасо-2. Донором NO выступает S-нитрозоглутатион (GSNO). При воздействии специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы было показано повышение относительного количества Pgp.*

**Ключевые слова:** Р - гликопротеин; S - нитрозоглутатион; оксид азота; клеточная линия Сасо - 2.

## STUDY OF THE EFFECTS OF NITRIC OXIDE ON FUNCTIONING P - GLYCOPROTEIN

*The article talks about the effect of nitric oxide (NO) on the functioning of the P-glycoprotein (Pgp) transporter protein in Caco-2 cells. The NO donor is S-nitrosoglutathione (GSNO). When exposed to a specific inhibitor of soluble guanylate cyclase, an increase in the relative amount of Pgp was shown.*

**Key words:** P - glycoprotein; S - nitrosoglutathione; nitrogen oxide; cell line Caco - 2.

P-гликопротеин (*Pgp*) – это эффлюксный белок транспортер, принадлежащий к суперсемейству ABC-транспортеров и обеспечивающий выведение субстратов из клеток. *Pgp* локализуется в клетках желудочно-кишечного тракта, мочевыделительной системы, гистогематических барьерах, опухолевых клетках и др. Его основными функциями являются: участие в фармакокинетике лекарственных веществ и развитии резистентности опухолей к химиотерапии [1, с. 4132].

Оксид азота является важным внутриклеточным мессенджером, который может оказывать как регуляторное действие через цГМФ - сигнальный путь [2, с. 375], так и токсическое, взаимодействуя с активными формами кислорода (АФК), образуя пероксинитрит [3, с. 523].

Механизмы регуляции *Pgp* активно изучаются, постоянно ведётся поиск веществ, модулирующих активность белка-транспортёра.

При изучении влияния доноров NO на функционирование *Pgp* были получены противоречивые результаты [4, с. 367], поэтому целью нашего исследования стала оценка влияния донора NO-нитрозоглутатиона на функционирование данного белка-транспортёра.

### Материалы и методы

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (*Caco-2*) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO<sub>2</sub> в инкубаторе *WS-189C* (*World Scienc*, Корея) в Дульбекко модифицированной среде Игла (*DMEM*) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (*Sigma-Aldrich*, США), с добавлением *L*-глутамин (4 мМ) (*Sigma-Aldrich*), 15% бычьей сыворотки (*Sigma-Aldrich*), 100 ед/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (*Sigma-Aldrich*), соответственно. Для моделирования нитрозативного стресса использовали донор оксида азота - *S*-нитрозоглутатион (*GSNO*, *Sigma Aldrich*, США) [5, с. 3174]. *GSNO* добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях 1; 10; 50; 100 и 500 мкМ и инкубировали 3, 24 и 72 часа.

После инкубации клеток с *GSNO* их снимали с лунок раствором, состоящим из 0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА (*Sigma-Aldrich*, США).

Клетки в количестве  $1 \times 10^6$  промывали фосфатным буфером pH 7,4 (*BioRad*, США). Далее клеточную культуру лизировали ледяным буфером в объеме 150 мкл. Состав лизирующего буфера: 50 мМ, pH 7,4 трис-НСl, 150 мМ КCl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензенсульфонил флуорида гидрохлорид (*AEBSF*) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1мМ, эпоксисукцинил-лейцингуанидинобутиламид (*E-64*) 14 мкМ, лейпептин 1мкМ, (*Sigma-Aldrich*, США). Полученную клеточную суспензию встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 минут. Затем центрифугировали в течение 10 минут при 5000 g (*CM-50*, *Eppendorf*, Германия). Цитоплазматическую фракцию использовали для определения уровня биохимических показателей.

Клетки контрольной группы культивировали с добавлением воды для инъекций (растворитель *GSNO*) в эквивалентном объёме. Все опытные серии выполнены в трех

повторениях. Во время 72 часового эксперимента питательную среду меняли каждые 24 часа.

Относительное количество *Pgp* определяли методом вестерн-блоттинга с использованием первичных мышинных моноклональных антител (*P-Glycoprotein Antibody MA5-13854; Invitrogen*) в концентрации 1:200. Количество *Pgp* оценивали относительно содержания белка *GAPDH* и выражали в % [6, с. 39].

При оценке механизма индукции *Pgp* под действием *GSNO* в питательную среду за 30 мин до добавления донора NO вносили: ингибитор растворимой гуанилатциклазы - 1Н-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хиноксалин-1-он (*ODQ, Sigma Aldrich, Германия*) в концентрации 10 мкМ [7, с. 1159].

Определение уровня метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов, NOx) осуществляли колориметрическим методом. Определение концентрации пероксинитрита регистрировали спектрофотометрически [8, с. 197]. Определение концентрации битирозина регистрировали по интенсивности флуоресценции в фосфатном буфере [9, с. 378]. Полученные результаты выражали в нмоль/мг белка. Для количественного определения белка в пробах использовали метод Бредфорда [10, с. 249].

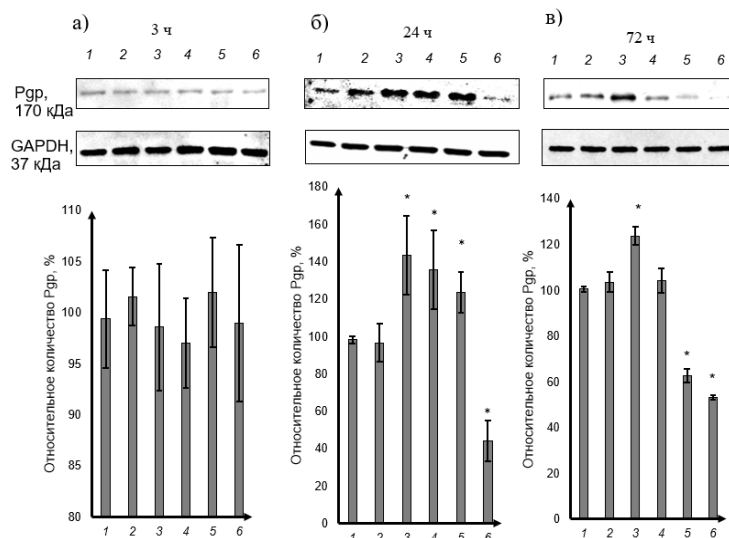
Попарные сравнения полученных результатов оценивали с помощью критерия множественного сравнения Ньюмена-Кейлса (*StatSoft Statistica 13.0*), статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Результаты представляли в виде  $M \pm SD$ .

### Результаты

Уровень метаболитов NOx достоверно возрастал при всех исследуемых концентрациях *GSNO* (1-500 мкМ) и сроках эксперимента, с максимальными значениями при 100 и 500 мкМ. Так, при 3-х ч инкубации данный показатель увеличивался относительно контроля при действии 100 мкМ *GSNO* на 35,1% ( $p=0,0002$ ), при 500 мкМ *GSNO* на 51,8% ( $p=0,0002$ ). При 24 ч экспозиции 100 мкМ *GSNO* повышал показатель на 50,5% ( $p=0,0002$ ), 500 мкМ *GSNO* на 58,9% ( $p=0,0002$ ) напротив контроля. Во время 72 ч эксперимента уровень оксида азота рос относительно контрольных значений под действием 100, 500 мкМ *GSNO* на 65,7% ( $p=0,0002$ ) и на 68,5% ( $p=0,0002$ ) соответственно.

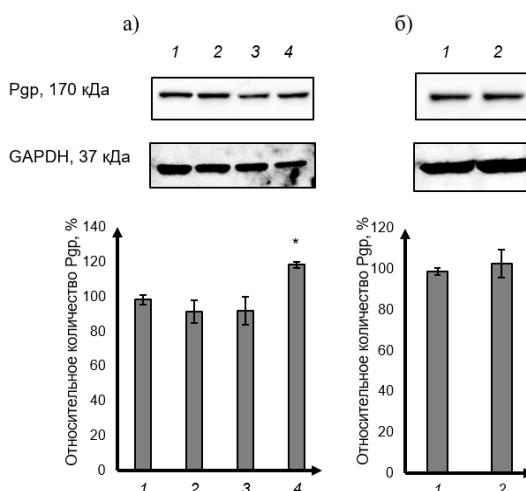
При длительности эксперимента 3 ч и концентрации *GSNO* 100 мкМ и 500 мкМ содержание пероксинитрита увеличивалось на 68,1% ( $p=0,001$ ) и 92,6% ( $p=0,0002$ ) по сравнению с контролем, а при 24 ч и концентрации *GSNO* 100 мкМ и 500 мкМ – на 34,0% ( $p=0,01$ ) и 53,6% ( $p=0,001$ ) соответственно. При 72 ч исследуемый показатель, под влиянием *GSNO*, статистически значимо повышался во всех экспериментальных моделях с максимальным значением относительно контроля на 83,6% ( $p=0,0002$ ) при 100 мкМ и на 84,4% ( $p=0,0002$ ) при 500 мкМ.

При экспозиции клеток *Caco-2* в течение 3 ч уровень битирозина не изменялся. Увеличение сроков инкубации до 24 ч привело к повышению показателя от контроля под влиянием *GSNO* в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ на 18,3% ( $p=0,006$ ), на 22,1% ( $p=0,003$ ), на 29,4% ( $p=0,001$ ) и на 34,9% ( $p=0,0002$ ) соответственно. Содержание битирозина статистически значимо увеличивалось относительно контрольных показателей, при 72 ч воздействии *GSNO* в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ на 30,3% ( $p=0,001$ ), на 27,3% ( $p=0,007$ ), на 32,6% ( $p=0,005$ ), на 38,3% ( $p=0,0003$ ), соответственно. Относительное количество *Pgp* при инкубация клеток в течение 3-х ч с *GSNO* в исследуемых концентрациях достоверно не отличалось от контроля (рис. 1а). При увеличении сроков экспозиции до 24 ч относительное количество *Pgp* возрастало при концентрациях *GSNO* 10 мкМ – на 46,2% ( $p=0,01$ ), 50 мкМ 38,1% ( $p=0,02$ ) и 100 мкМ 25,8% ( $p=0,045$ ) по сравнению с контролем. При увеличении концентрации *GSNO* до 500 мкМ отмечалось снижение уровня *Pgp* на 54,9% ( $p=0,002$ ) (рис. 1б). В эксперименте протяженностью 72 ч, 10 мкМ *GSNO* повышал относительное количество *Pgp* на 23,1% ( $p=0,0002$ ), 1 и 50 мкМ *GSNO* не влиял данный показатель, а в концентрациях 100 и 500 мкМ вызывал его снижение на 37,0% ( $p=0,0002$ ) и 47,1% ( $p=0,0002$ ) соответственно (рис. 1в).



**Рис. 1.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (а), 24 (б) и 72 (в) ч ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ ). 1- контроль, 2, 3, 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50, 100 мкМ в сочетании с ODQ в концентрации 10 мкМ. \* - статистически значимые отличия от контроля,  $p < 0,05$ .

При совместном инкубировании *GSNO* с ингибитором растворимой гуанилатциклазы *ODQ* в течение 24 ч не происходило повышение относительного количества *Pgp* при концентрации донора NO 10-50 мкМ, при концентрации *GSNO* 100 мкМ относительное количество *Pgp* превышало показатели контроля на 24,9%, ( $p=0,03$ ) (рис. 2а). При 72 ч экспозиции *ODQ* также предотвращал увеличение уровня белка-транспортера при концентрации *GSNO* 10 мкМ, данный показатель достоверно не отличался от контроля (рис. 2б).



**Рис. 2.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием растворимой гуанилатциклазы (*ODQ*, 10 мкМ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч. 1- контроль, 2, 3, 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50, 100 мкМ в сочетании с *ODQ* в концентрации 10 мкМ. \* - статистически значимые отличия от контроля,  $p < 0,05$ .

В настоящем исследовании проанализировано влияние NO на функционирование *Pgp*. Выявлено увеличение концентрации метаболитов NOx, это подтверждает, что *GSNO* является донором NO. Увеличение уровня пероксинитрита и битирозина свидетельствует о развитии НС.

Далее в эксперименте было выявлено увеличение количества белка-транспортера при действии *GSNO* 10 – 100 мкМ в течение 24 ч и 10 мкМ в течение 72 ч. Увеличение концентрации *GSNO* до 500 мкМ при 24 ч и до 100, 500 мкМ при 72 ч воздействии приводило к снижению *Pgp*. Уменьшение количества *Pgp* происходило при максимальных концентрациях *GSNO*, что совпадало с наибольшей степенью выраженности НС.

На следующем этапе было оценено влияние NO-цГМФ сигнального пути на

увеличение количества *Pgr*. NO-цГМФ сигнальный путь выступает главным механизмом, опосредующим физиологические эффекты NO [11, с. 1]. Показано, что *ODQ* при совместном инкубировании с *GSNO* 10-50 мкМ при 24 ч, а также при концентрации 10 мкМ при 72 ч препятствовал росту количества *Pgr*.

Авторы считают, что в данном исследовании демонстрируется новая роль NO-цГМФ сигнального пути в увеличении относительного количества *Pgr* при низких концентрациях донора NO *GSNO*. При высоких концентрациях *GSNO*, в связи с развитием НС, наблюдаемое снижение количества *Pgr* может объясняться повреждением его молекулы, например, нитрозилированием по *SH*-группам остатков цистеина.

**Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ (МК-1856.2020.7).**

### Список литературы

1. Borst P., Schinkel A.H. *P-glicoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals* // *The Journal of clinical investigation*. 2013. V.123. N10. P.4131-33.
2. Gantner B., LaFond K., Bonini M. *Nitric oxide in cellular adaptation and disease* // *Redox Biology*. 2020. 34:101550,
3. Абаленихина Ю.В., Космочевская О.В., Топунов А.Ф. Пероксинитрит: токсический агент и сигнальная молекула // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т.56. № 6. С.523-535.
4. Shchulkin A.V., Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Mylnikov P.Y., Yakusheva E.N. *Mechanisms of regulation of the P-glycoprotein transporter protein functioning under the action of nitric oxide* // *Biochemistry (Moscow)*. 2022. V. 87. P.366–379.
5. Broniowska K.A., Diers A.R., Hogg N. *S-Nitrosoglutathione* // *Biochim Biophys Acta*. 2013. 1830(5). P.3173-81.
6. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Слепнев А.А., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. Влияние оксида азота на функционирование белка-транспортёра гликопротеина-Р // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022. Т. 173. № 1. С.38-42.
7. Hwang T.L., Wu C.C., Teng C.M. *Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea* // *British journal of pharmacology*. 1998. 125(6). P.1158-63.
8. Lobysheva I.I., Serezhenkov V.A., Vanin A.F. *Interaction of peroxy nitrite and hydrogen peroxide with dinitrosyl iron complexes containing thiol ligands in vitro* // *Biochemistry (Moscow)*. 1999. V. 64, N2. P. 194-200.
9. Amadò R., Aeschbach R., Neukom H. *Dityrosine: in vitro production and characterization* // *Methods Enzymol*. 1984. V. 107. P.377-388.
10. Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding* // *Analytical biochemistry*. 1976. 7(72). P.248-254.
11. Gomes F., Cunha F.Q., Cunha T.M. *Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain* // *Biochemical Pharmacology*. 2020. V. 176. 113862.

### Сведения об авторах

**Елена Александровна Судакова**

ассист. каф. биологической химии с курсом КЛД ФДПО.  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Рязань, Россия

Эл. почта: sudakova.ea@inbox.ru

**Алексей Владимирович Шулькин**

д-р. мед. наук, доц., проф.

каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО.

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

Рязань, Россия

Эл. почта: alekseyshulkin@rambler.ru

### Information about authors

**Elena Alexandrovna Sudakova,**

assistant of the Department biological chemistry  
Ryazan State Medical University

Ryazan, Russia

E-mail: sudakova.ea@inbox.ru

**Aleksey Vladimirovich Shchulkin,**

MD, PhD, Professor of the Department of Pharmacology

with Course of PFAPE

Ryazan State Medical University. Ryazan, Russia.

E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

**Юлия Владимировна Абаленихина**

канд. биол. наук., доц.

каф. биологической химии с курсом КЛД ФДПО.

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Рязань, Россия

Эл. почта: abalenihiina88@mail.ru

**Елена Николаевна Якушева**

д-р, мед.наук, проф., зав. каф. фармакологии с курсом фармациии ФДПО.

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Рязань, Россия

Эл.почта: e.yakusheva@rzgmu.ru

**Yulia Vladimirovna Abalenikhina,**

PhD, Associate Prof. of the Depart. biological chemistry

Ryazan State Medical University,

Ryazan, Russia.

E-mail: balenihiina88@mail.ru

**Elena Nikolaevna Yakusheva,**

MD, PhD, Professor, Head of the Department of Pharmacology with Course of PFAPE

Ryazan State Medical University.

Ryazan, Russia.

E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

УДК 796/799

ГРНТИ 76.35.41

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.235-241

**И. В. Кобелькова, М. М. Коростелева**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Федеральный исследовательский центр питания,

биотехнологии и безопасности пищи

Академия постдипломного образования

ФГБУ ФНКЦ ФМБА России,

Федеральное государственное автономное образовательное

учреждение высшего профессионального образования

«Российский университет дружбы народов»

## **СВЯЗЬ РАЦИОНА ПИТАНИЯ С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНЫМИ СОСТОЯНИЯМИ СПОРТСМЕНОВ**

*Продолжительный дисбаланс между повышенными потребностями в макро- и микро-нутриентах и их фактическим поступлением с пищевыми продуктами может привести к быстрой утомляемости, что выражается снижением выносливости и спортивной результативности. Причиной этих симптомов могут являться железодефицитные состояния, широко распространенные среди спортсменов. Исследование особенностей фактического питания, взаимосвязи потребления мясной и молочной продукции с пищевым статусом и состоянием здоровья спортсменов с высоким и крайне высоким уровнем физической нагрузки является весьма актуальным.*

**Ключевые слова:** спортсмены, фактическое питание, железодефицитные состояния, лактоферрин

**V. Kobelkova, M. M. Korosteleva**

Federal State Budgetary Institution of Science Federal Re-

search Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety

Academy of Postgraduate Education of FSBI FNCC FMBA of Russia

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional

Education «Peoples' Friendship University of Russia»

## **RELATIONSHIP OF DIET WITH IRON DEFICIENCY IN ATHLETES**

*A short-term imbalance between increased needs for macro- and micronutrients and their actual intake can lead to rapid fatigue, which is expressed in a decrease in endurance and sports performance. The cause of these symptoms may be iron deficiency conditions, which are widespread among athletes. The study of the features of actual nutrition, the relationship between the consumption of meat and dairy products with the nutritional status and health status of athletes with a high and extremely high level of physical activity is very relevant.*

**Keywords:** athletes, actual nutrition, iron deficiency, lactoferrin

### **Введение**

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) считает дефицит железа

глобальной проблемой здравоохранения, особенно актуальной в группах высокого риска, в том числе у спортсменов. Нередко причиной отсутствия мотивации к тренировкам, снижения выносливости и спортивной результативности у спортсменов различного уровня квалификации являются железодефицитные состояния [1, 2].

Для коррекции железодефицитных состояний применяют железосодержащие препараты, которые можно разделить на несолевые и солевые. Последние обладают хорошей растворимостью и высокой диссоциацией в растворах, что позволяет поступившему в организм железу быстро вступать в соединения с апотрансферрином, который превращаясь в насыщенный железом трансферрин, участвует в последующих биохимических трансформациях вплоть до синтеза гема, цитохромов и других железосодержащих соединений. При этом быстрая растворимость и высокая диссоциация солевых ФП вызывает металлический привкус, потемнение зубов и десен, диспептические явления, аллергические реакции. Наряду с фармакологической коррекцией достаточное потребление молока, молочных и мясных продуктов может вносить существенный вклад в поддержание оптимальной обеспеченности железом спортсменов. Стандартным подходом к профилактике и коррекции железодефицитных состояний является оптимизация рациона питания и назначение препаратов, влияющих на обмен железа. К основным пищевым источникам железа относят мясо и субпродукты, содержащие данный микроэлемент в биологически доступной гемовой форме. Другой важной группой пищевой продукции в рационах населения Российской Федерации является молоко и молочные продукты, которые содержат полноценный белок, углеводы, жиры и различные биологически активные соединения: пептиды, минеральные вещества и витамины, играющие ключевую роль в обмене веществ.

Лактоферрин (железосвязывающий гликопротеин) является одним из важных соединений молока, обладает высокой функциональной активностью, включая иммуномодулирующую, противомикробную, противовоспалительную и антиканцерогенную [3,4]. Он образует хелатные соединения с рядом металлов: Fe (III), Al (III), Cu (II), Mg (II), Mn (II), что позволяет рассматривать его в качестве важного участника гомеостаза некоторых микроэлементов в организме спортсменов. По результатам рандомизированного контролируемого исследования установлено, что употребление лактоферрина, полученного от крупного рогатого скота, является перспективной альтернативой сульфату железа при лечении железодефицитной анемии поскольку не вызывает неблагоприятных побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта [1].

С другой стороны индивидуальные особенности пищевых предпочтений, религиозные убеждения могут приводить к нарушению структуры рациона в результате исключения из него некоторых основных групп пищевых продуктов. В связи с этим представлялось интересным изучить, как сознательное самоограничение и орторексия (расстройство приема пищи, характеризующееся навязчивым стремлением к «здоровому и правильному питанию», приводящее к значительным ограничениям в выборе пищевых продуктов) могут влиять на пищевой статус спортсмена.

### **Цель работы**

Исследовать фактическое питание и пищевой статус спортсменов, профессионально занимающихся академической греблей, включая антропометрические данные, клинические и биохимические показатели крови.

### **Материалы и методы**

В данной статье рассматриваются результаты обследования 1 спортсмена (N) с особенностями пищевого поведения из 16 обследованных, занимающегося академической греблей, пол – мужской, возраст 21 год, стаж в данном виде спорта 5 лет, квалификация - мастер спорта, дал письменное информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии». Гематологические показатели (NE, NE%, LY, LY%, RBC, MO, MO%, EO, EO%, BA, BA%, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, PLT, PCT, MPV,



PDW, СОЭ) оценивали с помощью автоматического гематологического анализатора *МЕК 7222К* (Япония). Исследование биохимических показателей в сыворотке крови: определение активности аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы (АЛТ, АСТ), концентрации глюкозы, креатинина, общего холестерина (ОХ), липопротеидов высокой (ХС-ЛПВП) и низкой плотности (ХС-ЛПНП) проводилось с помощью автоматического гематологического анализатора *МЕК 7222К* (Япония). Уровень сывороточного железа определяли в сыворотке крови натощак с помощью автоматического биохимического анализатора Сапфир 400 (Япония). В соответствии с отечественными клиническими рекомендациями и рекомендациями ВОЗ в качестве одного из показателей обеспеченности железом установлена концентрация железа в сыворотке венозной крови (нижняя граница нормы 10,6 мкмоль/л у мужчин, 6,6 мкмоль/л у женщин). Антропометрические измерения проводили по стандартной методике. Длину тела определяли с помощью антропометра «Мартина» с точностью до 1 мм; массу тела - с помощью аппарата для биоимпедансного измерения состава тела *ACCUNIQ BC310* (Ю. Корея) с точностью до 0,1 кг. Индекс массы тела рассчитывали по формуле  $ИМТ = \text{масса тела (кг)} / \text{длина тела (м)}^2$ . Биоимпедансные измерения выполняли с помощью анализатора состава тела *ABC-01 «МЕДАСС»* (НТЦ «МЕДАСС», Россия) по стандартной схеме с креплением одноразовых биоадгезивных электродов *F3001ECG (Fiab)* в области запястного и голеностопного суставов в положении спортсмена лежа на спине. Фактическое питание спортсменов изучали частотным методом с использованием компьютерной программы «Анализ состояния питания человека» (версия 1.2.4 ГУ НИИ питания РАМН 2004 г., программа зарегистрирована Российским агентством по патентам и товарным знакам 09.02.2004 № 2004610397). Количество потребляемой пищи оценивали с помощью альбома порций продуктов и блюд, содержащего фотографии порций разной величины наиболее часто употребляемой пищи.

### Полученные результаты

При оценке результатов мы использовали данные двух отечественных антропометрических стандартов для спортсменов, участвующих в гребном спорте и собственных данных, полученных на группе 16 спортсменов-гребцов [5]. Рост спортсмена *N* соответствовал стандартным значениям (190,4 см), а масса тела (95,1 кг) выходила за референсные пределы. Индекс массы тела (ИМТ) составил 26,2 кг/м<sup>2</sup>, обхват талии (ОТ) - 87 см, окружность бедер (ОБ) – 102 см, соотношение ОТ/ОБ=0,85. Для обычного здорового человека этого возраста ИМТ свидетельствует об избыточной массе тела. Анализ компонентов состава тела с помощью биоимпедансного анализатора показал, что доля скелетно-мышечной массы (46,6%) не достигала референсных значений, а жировой компонент в абсолютном и относительном значениях превышал их (15,6 кг и 16,3 %). Таким образом, у спортсмена с целью повышения силы и выносливости может стоять задача снизить долю жировой массы тела и повысить скелетно-мышечную за счет оптимизации питания и тренировочного процесса.

Исследование фактического питания спортсмена *N* показало количественный и качественный дисбаланс потребления пищевых веществ и энергии. Частота потребления отдельных групп продуктов не соответствовала рекомендуемой для хлебобулочных изделий и картофеля (отсутствовали в рационе), молочных (0,6 порции в день), овощей и фруктов (менее 3-х порций в день). Необходимо отметить, что в целом удовлетворительное потребление группы мясных продуктов обеспечивалось в подавляющем большинстве случаев за счет гастрономических мясных изделий, но не натурального мяса. Кондитерские изделия включались в рацион питания не менее 5 раз в сутки, что значительно превышало рекомендации по оптимальному питанию

Оценка пищевой ценности рациона питания показала, что соотношение белков, жиров и углеводов было неоптимальным и составило 16,8% 39,6% и 43,6% от энергетической ценности, соответственно. Рацион спортсмена *N* характеризуется избыточным потреблением жиров, сниженным - углеводов и достаточным белков. При этом, содержание насыщенных жирных кислот также было высоким – 59 г/сут,

полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) -22%. При этом, потребление  $\omega$ -3 ПНЖК составило 3,3 г/сут, что можно связать с высоким потреблением рыбы и рыбных продуктов (212 г/сут).

В приложении 1 к приказу Министерства спорта утверждена более высокая энергетическая ценность рациона питания для спортсменов, выступающих в видах спорта, связанных с длительными и напряженными физическими нагрузками, включая академическую греблю (5500 ккал) [7]. У обследованного спортсмена при достаточном потреблении белка, доля жиров почти на треть превышает рекомендованные значения, что сказывается на компонентном составе тела. Отмечается дефицит углеводов в структуре рациона, что может служить причиной снижения показателей выносливости и эффективности тренировочного процесса.

В условиях сборов структура питания спортсмена изменилась, с учетом предлагаемого меню на предприятии общественного питания. Было учтено, что за предшествующий опросу месяц спортсмен 20 дней питался дома и 10 дней – на сборах. В связи с этим, частота потребления некоторых групп продуктов увеличилась. Структура потребления мясных продуктов была не оптимальна: потребление мясных гастрономических изделий составило 150 г/сут, мяса птицы (преимущественно грудка) – 107 г/сут, котлет – 36 г/сут, говядины – только 17 г/сут, что ограничивает поступление высокодоступной гемовой формы железа. Следует учитывать, что колбасные изделия (мясная гастрономия) в структуре пищевой ценности на 100 г в среднем содержат 11 г белка и 22 г жира, обеспечивают поступление 44 ккал и 198 ккал соответственно. Анализ источников потребления белка показал, что их основное поступление обеспечивают группа мясных (32,7% от энергетической ценности) и рыбных продуктов (28,9%), а также крупы (14,1%). Доля жира от суточной калорийности рациона питания, полученного за счет группы мясных продуктов составила 42 %, из кондитерских изделий – 25%. Основными источниками моно- и дисахаров являлись кондитерские изделия (53,9% от энергетической ценности), на втором месте – фрукты (26%). При этом спортсмен в среднем потреблял 108 г шоколада и шоколадных конфет, 28 г торта или пирожных, 35 г пряников, 23 г варенья и по 17 г сдобных булок и пирожков с начинкой. Потребление яблок составило в среднем 143 г, ягод 46 г, соков – 356 мл, безалкогольных напитков 299 мл. Крупы обеспечивали поступление 74,1 % крахмала, овощи - 11,4 %. Среднесуточное потребление добавленного сахара составило 132 г/сут или 14,5% от суточной калорийности, что превышает рекомендуемые уровни (не более 10%), при этом такое потребление обеспечивалось в основном за счет кондитерских изделий (98%). Основным источником пищевых волокон служили овощи (37,8%) и фрукты (33,5%), однако поступление пищевых волокон было относительно низким. Потребление холестерина с рационом питания соответствовало рекомендуемым значениям и составило 383 мг, обеспечивалось за счет мяса (46,4%) и рыбы (16,2%). Потребление молочных продуктов было крайне низким, в частности размер порций творога и сыра составлял 20,1 г/сут и 1,3 г/сут, соответственно. Приказ Министерства спорта РФ № 999 от 30.10.2015 «Об утверждении требований к обеспечению подготовки спортивного резерва для спортивных сборных команд РФ» регламентирует достаточно высокое потребление молока, творога и сыра (800 мл, 100 г и 30 г в сутки, соответственно) [6].

При анализе витаминов и минеральных веществ в рационе питания установлено, что содержание Na составило 6,51 г/сут при рекомендуемом ВОЗ уровне потребления не более 2 г, это связано с частым потреблением мясной гастрономии. Содержание кальция и фосфора было на уровне 966 мг/сут и 2265 мг/сут, а их соотношение 1:2,2, что отражает неоптимальное поступление данных элементов с рационом и в дальнейшем может привести к повышенному риску травм вследствие нарушения минерализации костной ткани. Рацион питания обеспечивает несколько повышенное поступление железа (27 мг) и витамина С (342 мг). В то же время, содержание витаминов В<sub>1</sub> (1,35 мг) и В<sub>2</sub> (1,65 мг) относительно низкое для спортсмена, что связано с практически полным отсутствием хлебобулочных продуктов из муки грубого помола.

Спортсмен N имеет определенные индивидуальные особенности пищевого

поведения. В частности, при отсутствии каких-либо медицинских противопоказаний к употреблению коровьего молока, заменил его в своем рационе на растительные напитки на основе орехов и злаков, потребление которых составило в среднем 500 мл/сут. Наряду с этим, на протяжении года спортсмен исключал мясо и субпродукты из рациона, ограничивал добавленный сахар, дополнительно включал орехи, семена чиа. Известно, что в 100 г напитков на растительной основе содержание белка колеблется от 0,1 до 3 г, углеводов - от 0,1 до 6,8 г, жиров - от 0,9 до 1,5 г, а энергетическая ценность составляет 12-44 ккал. Все напитки обогащены трикальцийфосфатом до уровня кальция 120 мг/100 г, соответствующего таковому в молоке. Был оценен их вклад в пищевую и энергетическую ценность рациона питания. Напитки на растительной основе обладают более низкой калорийностью и содержат небольшое количество жира, при этом общее содержание белка в молоке коровьем (2,9 г/100 г) значительно выше, чем в растительных аналогах (0,1-0,4 г/сут), только соевый напиток имеет относительно высокое содержание белка. Однако, аминокислотный состав белков молока близок к эталонному, тогда как напитки на растительной основе содержат менее полноценный с биологической точки зрения растительный белок, лимитирующими аминокислотами для него являются метионин и цистин. При употреблении миндального напитка спортсмен получал на 13 г (то есть на 85% меньше, чем из молока коровьего) полноценного белка. Следует отметить, что некоторые напитки содержат дополнительные количества добавленного сахара и соли, что также может приводить к избыточному потреблению этих компонентов питания. Кокосовое молоко содержит большое количество насыщенных жиров, а также как и аналоги на основе других видов орехов может являться пищевым аллергеном. Сывороточный белок молока обладает сбалансированным аминокислотным составом и является одним из наиболее распространенных компонентов специализированных пищевых продуктов для питания спортсменов (СПП), направленных на ускорение восстановительных и анаболических процессов после интенсивных физических нагрузок [7].

Были изучены данные клинического и биохимического анализов крови. Клинический анализ крови показал, что у спортсмена *N* повышено абсолютное содержание моноцитов ( $0,8 \cdot 10^9/\text{л}$  при норме  $0,09-0,6 \cdot 10^9/\text{л}$ ) и базофилов ( $0,1 \cdot 10^9/\text{л}$  при норме  $0-0,065 \cdot 10^9/\text{л}$ ). Это может свидетельствовать о наличии инфекционных или воспалительных процессов в организме, а базофилия могла быть вызвана высоким уровнем инсоляции в период проведения тренировок на открытой воде (в течение предшествующих забору крови 10 дней температура окружающей среды составляла  $+33 \pm 2$  °C в тени). Количество остальных форменных элементов крови, их распределение, качественные и количественные характеристики укладывались в границы нормы. Следует отметить, что содержание гемоглобина, как важного гематологического показателя в обеспечении работающих[ мышц кислородом и поддержании достаточной скорости аэробного гликолиза, было в границах нормы для мужчин – 156 г/л. Диагноз дефицита железа основывается на анализе данных анамнеза, физикального осмотра и лабораторных исследованиях. В качестве диагностических критериев железодефицитных состояний используют показатели сывороточного железа, трансферрина, ферритина, общую и латентную железосвязывающую способность сыворотки (ОЖСС и ЛЖЖСС) и коэффициент насыщения железом трансферрина. Абсолютный дефицит железа диагностируется при уровне сывороточного ферритина менее 30 нг/мл [10]. Повышение уровня железосвязывающей способности сыворотки свидетельствует о низком уровне железа в крови, что характерно для железодефицитной анемии, которая вызвана хроническими кровопотерями, недостатком железа в рационе, а также нарушением его всасывания в желудочно-кишечном тракте. Это один из самых ранних биомаркеров дефицита железа. Уменьшение (менее 20%) указывает на дефицит железа, абсолютный или функциональный. Трансферрин синтезируется печенью, его концентрация в крови зависит от нормальной работы этого органа и от количества железа в сыворотке крови. Около трети трансферрина в норме циркулирует в крови в комплексе с железом. Количество железа, которое он способен связать (100%), называется общей железосвязывающей

способностью сыворотки (ОЖСС). А латентная железосвязывающая способность сыворотки (ЛЖСС) отражает количество трансферрина, которое не связано с железом. Гемоглобин не снижается до тех пор, пока не истощится значительный процент железа в организме. Следовательно, нормальный гемоглобин не исключает дефицита железа. Латентная железосвязывающая способность сыворотки крови – это потенциальная способность сыворотки крови к связыванию железа. Этот показатель наиболее точно отражает обмен железа в организме. Главная функция железа в составе гемоглобина эритроцитов – перенос кислорода. Железо, которое не входит в состав гемоглобина, не хранится в депо (в виде ферритина) и не используется по-другому организмом, находится в комплексе с белком трансферрином. Растворимый рецептор трансферрина (sTfR) и индекс sTfR-ферритина - sTfR повышается при дефиците железа из-за активации рецепторов трансферрина. Это может помочь дифференцировать абсолютный (повышенный sTfR) и функциональный дефицит железа (нормальный sTfR) [8]. Содержание гемоглобина в ретикулоцитах - позволяет оценить доступность железа для выработки эритроцитов. Количество цинк-протопорфирина - соединения, обнаруживаемого в эритроцитах, когда синтез гема ингибируется недостатком ионов железа, при котором вместо слияния с ионом железа для формирования гема, протопорфирин IX, непосредственный предшественник гема, объединяется с ионом цинка. Также рекомендовано УЗИ органов брюшной полости, в частности для оценки размеров селезенки, определение гормонов щитовидной железы, проведение функциональных печеночных проб, оценка свертывающей системы крови, клиренса креатинина для оценки функции почек.

Наше исследование подтверждает вывод о необходимости применения других критериев обеспеченности железом спортсменов. Несмотря на удовлетворительное содержание гемоглобина (137 г/л), обнаружен дефицит сывороточного железа - 7,9 мкмоль/л (при норме 10,6-28,3 мкмоль/л), что свидетельствует об имеющемся у спортсмена железодефицитном состоянии. Отмечена незначительная гипогликемия, что может указывать на низкое потребление углеводов и дефицит энергетической ценности рациона питания и приводить к недостаточному восполнению депо гликогена в мышцах, следствием которого является снижение выносливости и спортивной результативности на предстоящей тренировке. Снижение уровня ЛПВП и ЛПНП также может свидетельствовать о недостаточной калорийности рациона питания. Отмечено незначительное превышение концентрации креатинина (116 мкмоль/л при верхней границе 115 мкмоль/л), что подтверждает неадекватное восстановление после интенсивных нагрузок, которое может вызывать состояние функционального перенапряжения.

### **Выводы**

По результатам выявленных нарушений в структуре питания, пищевом статусе, включая изменения биохимических показателей крови, спортсмену даны рекомендации по оптимизации рациона питания с целью коррекции обеспеченности железом и повышения выносливости. Рекомендовано увеличить потребление «красного» мяса (нежирной говядины, баранины, свинины), молока и кисломолочных продуктов до 500 мл в сутки, дополнить рацион субпродуктами (печень говяжья, свиная), картофелем, хлебом из муки грубого помола, и снизить потребление мясных гастрономических и кондитерских изделий. При невозможности обеспечить адекватное поступление железа из традиционных пищевых источников в рацион необходимо введение СПП, обогащенных лактоферрином или железом, предпочтительнее в гемовой форме.

### **Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: исследование фактического питания является одним из базовых пунктов в диагностических мероприятиях. Для более точной и ранней диагностики железодефицитных состояний у спортсменов даже на фоне нормальных значений гемоглобина, необходимо проведение расширенного биохимического анализа с изучением уровней трансферрина и сывороточного ферритина как наиболее информативных показателей.

Рациональная организация тренировочного процесса и оптимизация базового рациона питания, в том числе с помощью специализированных пищевых продуктов для питания спортсменов, содержащих гемовое железо, лактоферрин в сочетании с витаминами А, Е, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> и фолиевой кислотой, могут явиться ключом к повышению уровня работоспособности и выносливости спортсменов, особенно в циклических видах спорта.

### Список литературы

1. Briguglio M., Hrelia S., Malaguti M. *The Central Role of Iron in Human Nutrition: From Folk to Contemporary Medicine / Nutrients*. 2020. Vol. 12. № 6.- P.1761. doi: 10.3390/nu12061761.
2. Sim, M., Garvican-Lewis L.A., Cox G.R. *Iron considerations for the athlete: a narrative review // Eur. J. Appl. Physiol*. 2019. Vol. 0119. № 7. P. 1463-1478. doi: 10.1007/s00421-019-04157-y.
3. Hao, L. *Lactoferrin: Major Physiological Functions and Applications/ L.Hao, Q.Shan, J.Wei, F. Ma // Curr Protein Pept Sci.- 2019. -Vol. 20.- № 2.-P. 139-144. doi: 10.2174/1389203719666180514150921.*
4. Rosa L., Cutone A., Lepanto M.S. *Physico-chemical properties influence the functions and efficacy of commercial bovine lactoferrins// Biometals*. 2018. Vol. 31. № 3. P. 301-312. doi: 10.1007/s10534-018-0092-8.
5. Сняжков А.Ф., Комаров А.Ф. *Физическая работоспособность и состав тела у гребцов высокой квалификации в подготовительном периоде // Греб. спорт : Ежегодник*. М., 1986. С. 42-45.
6. Приказ Минспорта РФ от № 999 30.10.15 «Об утверждении требований к обеспечению подготовки спортивного резерва для спортивных сборных команд РФ»
7. Park Y., Park H.Y., Kim J. *Effects of whey protein supplementation prior to, and following, resistance exercise on body composition and training responses: A randomized double-blind placebo-controlled study // J. Exerc. Nutr. Biochem.- 2019. -Vol. 23.- P. 34–44. doi: 10.20463/jenb.2019.0015/*
8. Peyrin-Biroulet L., Williet N., Cacoub P. *Guidelines on the diagnosis and treatment of iron deficiency across indications: a systematic review// Am J Clin Nutr*. 2015. Vol. 102. № 6. P.1585-94. doi: 10.3945/ajcn.114.103366.

### Сведения об авторах

**Ирина Витальевна Кобелькова,**

к.м.н., в.н.с.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи

Академия постдипломного образования

ФГБУ ФНКЦ ФМБА России

Москва, Россия

**E-mail:**irinavit66@mail.ru

**Коростелева Маргарита Михайловна,**

к.м.н., с.н.с.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов»

Москва, Россия

**E-mail:**korostel@bk.ru

### Information about authors

**Irina Vitalievna Kobelkova,**

Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher Federal State Budgetary Institution of Science Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety

Academy of Postgraduate Education of FSBI FNCC FMBA of Russia

Moscow, Russia

**E-mail:**irinavit66@mail.ru

**Margarita Mikhailovna Korosteleva,**

Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher Federal State Budgetary Institution of Science Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education «Peoples' Friendship University of Russia»

Moscow, Russia

**E-mail:**korostel@bk.ru

### ЭКСПРЕССИРОВАННЫЙ ГЕМОГЛОБИН БОБОВЫХ КАК КОМПОНЕНТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ «РАСТИТЕЛЬНОГО МЯСА»

*Клетки Escherichia coli со встроенным геном легоглобина (Lb) сои производят этот белок в восстановленном оксигенированном состоянии. Клетки, синтезирующие Lb, оказались более чувствительны к действию индукторов окислительного и нитрозативного стресса, чем клетки без Lb. Предложено объяснение этому факту.*

**Ключевые слова:** легоглобин, рекомбинантный белок, экспрессия, *Escherichia coli*, растительное мясо

А. Ф. Topunov  
О. V. Kosmachevskaya, E. I. Nasybullina,  
Federal Research Center of Biotechnology

### EXPRESSED PLANT HEMOGLOBIN AS AN INGREDIENT FOR PRODUCTION OF «PLANT-BASED MEAT»

*Escherichia coli cells with an embedded soybean leghemoglobin (Lb) gene produce this protein in a reduced oxygenated state. The cells synthesizing Lb turned out to be more sensitive to the action of oxidative and nitrosative stress inducers, than cells without Lb.*

**Key words:** leghemoglobin, recombinant protein, expression, *Escherichia coli*, “plant-based meat”.

#### Введение

Долгое время гемоглобин бобовых растений — легоглобин (*Lb*) изучали только как компонент азтфиксирующей симбиотической системы, необходимый для функционирования бобово-ризобиального симбиоза. В последнее время интерес к этому белку возобновился. Возник спрос на создание продуктов из растительного сырья, имитирующих мясные продукты животного происхождения — «растительное мясо» (Plant-Based Meat). Легоглобин оказался единственным растительным гемопротеидом, который может выступать в качестве ингредиента для придания органолептических свойств растительной основе [1, 2]. Первая экспрессия *Lb* была выполнена в 1995 г. в нашей совместной работе с Институтом биоорганической химии Польской АН (Познань), и Европейской лабораторией молекулярной биологии (Гамбург, Германия) [3]. Была проведена экспрессия *Lb* I люпина в клетках *E. coli* штамм BL21. Впоследствии различными авторами были проведены работы по экспрессии и другим растительным гемоглобинам.

При этом *Lb* для клеток *E. coli* — чужеродный белок, на синтез которого тратится часть биохимического ресурса бактериальной клетки. Поэтому такие клетки могут иметь пониженный адаптационный потенциал, что может помешать эффективному биотехнологическому синтезу *Lb*.

**Цель работы.** Изучить, как экспрессия *Lb* влияет на способность клеток *E. coli* переносить окислительный и нитрозативный стресс.

#### Материалы и методы

В работе использовали клетки *Escherichia coli* штамм ТВ-1, модифицированный плазмидой pEMBL18<sup>+</sup>::*SyLba* со встроенным геном *Lba* сои. В качестве контроля использовали аналогичный штамм без плазмиды. Исследования проводили на трех типах культур клеток: не синтезирующие *Lb* ( $C_{Lb-}$ ) — 0,08 мкг гема/мг белка, синтезирующие *Lb* в малых количествах ( $C_{Lb+}$ ) — 0,15 мкг гема/мг белка, и активно синтезирующие *Lb* ( $C_{Lb++}$ ) — 0,45 мкг гема/мг белка. Для создания в клетках условий окислительного и нитрозативного стрессов использовали S-нитрозоглутатион (*GSNO*), гидропероксид *трет*-бутила (*t*-BOOH) и бензилвиологен (*Bv*). Спектры поглощения целых клеток записывали на спектрофотометре “Beckman Coulter DU 650” (США) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см относительно среды *LB*. Концентрацию *Lb* определяли с помощью модифицированного пиридингеохромного метода.

#### Полученные результаты

Штамм *E. coli*, использованный в данной работе, обладает высоким уровнем экспрессии

*Lba*, о чем свидетельствует выраженный розовый цвет клеток. Большие количества *Lba* в бактериальных клетках позволяют спектрофотометрически регистрировать состояние *Lb* в целых клетках. Спектры поглощения целых клеток обнаруживали максимумы, характерные для оксигенированного *Lb*, то есть леоглобин находился в бактериальных клетках в физиологически активном восстановленном состоянии и идентичен *Lb* сои дикого типа. В поддержании *Lb* в восстановленном состоянии в клетках *E. coli* могут участвовать бактериальные редуктазы [3]. Экспрессионная система, использованная в нашей работе, позволяла получать белок в растворимом состоянии, что очень важно для биотехнологического использования.

Рост всех культур в середине логарифмической фазы роста (7 часов) подавлялся гидропероксидом *трет*-бутила. Клетки экспрессирующие *Lb* на низком уровне ( $C_{Lb+}$ ) обнаруживали большую чувствительность к *t*-ВООН: уровень их роста к 7 часам по сравнению с контролем составлял 43%, в то время как  $C_{Lb-}$  и  $C_{Lb++}$  – 66 %. Рост всех типов клеток в условиях индуцированного *t*-ВООН окислительного стресса стимулировался нитрозоглутатионом (*GSNO*), даже при концентрациях *t*-ВООН, вызывавших полное подавление роста штаммов [4].

В бактериальной клетке на фоне таких эффективных антиоксидантных ферментов, как супероксиддисмутаза и каталазы-пероксидазы, антиоксидантное действие леоглобина мало заметно. Следует отметить, что леоглобин является чужеродным белком для клеток *E. coli*, на синтез которого клетка расходует энергетические и пластические ресурсы, необходимые ей для синтеза антиоксидантных ферментов *de novo* в условиях окислительного и нитрозативного стресса. Ситуацию могут усугублять феррильная и оксоферрильная формы *Lb*, образующиеся в реакции с пероксидами, и сами являющиеся сильными окислителями. Например, эти супероксидные формы *Lb* окисляют липиды мембран. При этом в растениях пероксидазная, *NO*-диоксигеназная и пероксинитрит-изомеразная активности леоглобина могут вносить существенный вклад в общую антиоксидантную защиту инфицированной клетки клубенька бобовых, в которой концентрация *Lb* очень высока.

В настоящее время экспрессию *Lb* рассматривают в одном ряду с синтезом других гемоглобинов, как потенциально важный биотехнологический процесс [5]. Уже имеются попытки закрепления возможности использования *Lb*, как и некоторых других гемоглобинов, для получения растительного мяса, в патентах. В качестве примера можно привести патент РФ [6], оформленный американскими авторами. В связи с этим сохранение жизнеспособности микроорганизмов, синтезирующих *Lb*, на высоком уровне становится важной биотехнологической задачей. Поэтому необходимы дополнительные исследования, которые позволят уменьшить негативные последствия синтеза *Lb* на клетки-продуценты.

### Выводы

Клетки *E. coli* со встроенным геном леоглобина сои (*Lba*) производят этот белок в восстановленном и оксигенированном, то есть физиологически активном состоянии. Клетки, синтезирующие *Lb*, были более чувствительны к действию индукторов окислительного и нитрозативного стресса, по сравнению с клетками без *Lb*, что, вероятно, связано с включением этого гемоглобина в процессы, связанные с обменом активных форм кислорода и, соответственно, с усилением стрессовых условий в самих клетках.

### Заключение

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

1. Клетки *E. coli*, синтезирующие *Lb*, более чувствительны к действию индукторов окислительного и нитрозативного стресса, по сравнению с клетками без *Lb*,
2. Большая чувствительность бактерий-продуцентов *Lb* может быть связана с включением *Lb* в процессы, связанные с обменом активных форм кислорода и с синтезом его супероксидных форм (феррильной и оксоферрильной), что усиливает окислительный стресс в клетках.
3. Сохранение жизнеспособности микроорганизмов, синтезирующих *Lb*, на высоком уровне становится важной биотехнологической задачей. Необходимы дополнительные исследования, которые позволят уменьшить негативные последствия синтеза *Lb* на клетки-продуценты.

*Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-318 от 20 апреля 2022 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».*

Список литературы

1. Fraser R.Z., Shitut M., Agrawal P., Mendes O., Klapholz S. Safety evaluation of soy leghemoglobin protein preparation derived from *Pichia pastoris*, intended for use as a flavor catalyst in plant-based meat. // *Int. J. Toxicol.* 2018. V. 37. P. 241–262.
2. Reyes T.F., Chen Y., Fraser R.Z., Chan T., Li X. Assessment of the potential allergenicity and toxicity of *Pichia* proteins in a novel leghemoglobin preparation. // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2021. V. 119. e104817.
3. Sikorski M.M., Topunov A.F., Strozycki P., Vorgias C.E., Wilson K.S., Legocki A.B. Cloning and expression of plant leghemoglobin cDNA of *Lupinus luteus* in *Escherichia coli* and purification of the recombinant protein. // *Plant Sci.* 1995. V. 108. P. 109-117.
4. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Topunov A.F. Expressed soybean leghemoglobin: Effect on *Escherichia coli* at oxidative and nitrosative stress. // *Molecules.* 2021. V. 26. e7207.
5. Zhao Xinrui, Zhou Jingwen, Du Guocheng, Chen Jian. Recent advances in the microbial synthesis of hemoglobin. // *Trends in Biotechnology.* 2021. V. 39. P. 286-297.
6. Патент RU 2653751 С2 Российская Федерация. Способы и композиции для предметов потребления / Браун П.О., Врльиц М., Варадан Р., Айзен М., Соломатин С.; заявитель и патентообладатель «Импоссибл Фудз Инк» (US). – № 2014104812; заявл. 12.07.2012; опубл. 14.05.2018; Бюл. № 14. – 77 с.

Сведения об авторах

**Алексей Федорович Топунов,**

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [aftopunov@yandex.ru](mailto:aftopunov@yandex.ru)

**Ольга Владимировна Космачевская,**

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [rizobium@yandex.ru](mailto:rizobium@yandex.ru)

**Эльвира Ильгизовна Насыбуллина,**

канд. биол. наук, науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [lvirus198709@rambler.ru](mailto:lvirus198709@rambler.ru)

Information about authors

**Alexey Fedorovich Topunov,**

DBS

Head of Laboratory,

Federal Research Center  
of Biotechnology

Moscow, Russia

**E-mail:** [aftopunov@yandex.ru](mailto:aftopunov@yandex.ru)

**Olga Vladimirovna Kosmachevskaya,**

PhD, Senior Research Scientist,

Federal Research Center  
of Biotechnology

Moscow, Russia

**E-mail:** [rizobium@yandex.ru](mailto:rizobium@yandex.ru)

**Elvira Ilgizovna Nasybullina,**

PhD

Research Scientist,

Federal Research Center  
of Biotechnology

Moscow, Russia

**E-mail:** [lvirus198709@rambler.ru](mailto:lvirus198709@rambler.ru)

УДК 523.98

ГРНТИ 41.21

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.244-247

**М. В. Рагульская**

Институт земного магнетизма и распространения радиоволн

РАН

**ПАНДЕМИЯ COVID-19 ЭПОХИ ГЛОБАЛЬНОГО МИНИМУМА СОЛНЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ: ГЕНОГЕОГРАФИЯ, ЛОКДАУНЫ, ВАКЦИНАЦИЯ**

Пандемия COVID-19 стартовала в минимумах 11-летнего и квази - векового солнечного цикла. Генетические популяционные особенности сыграли решающую роль в развитии локальных эпидемий коронавируса в условиях глобального минимума SA. Их вклад составляет более 500%



*против 20-30%, приходящихся на остальные факторы (кроме вакцинации), таких как средний возраст населения, локдауны, изоляция заболевших, погодные условия, уровень медицины. В Европе заболеваемость COVID-19 на миллион человек в гаплогруппах R1b:R1a:N соотносится как 7:2:1. Это соотношение практически не зависит от волн пандемии, новых штаммов коронавируса и уровня вакцинации населения.*

**Ключевые слова:** пандемия COVID-19, гаплогруппы R1b, R1a и N, 25-й цикл солнечной активности

**M. Ragulskaya**

Institute of Terrestrial Magnetism and Radio Wave Propagation,  
Russian Academy of Sciences

### **COVID-19 PANDEMIC DURING THE GLOBAL SOLAR MINIMUM: GENOGEOGRAPHY, LOCKDOWNS, VACCINATION**

*The COVID-19 pandemic started at the minimums of the 11-year solar cycle and quasi-secular solar cycle. Genetic population characteristics played a decisive role in the development of local coronavirus epidemics under the conditions of the solar activity global minimum. Their contribution is more than 500% against 20-30% accounted for by other factors (except for vaccination), such as the average age of the population, lockdowns, isolation of patients, weather conditions, and the level of medicine. In Europe, the incidence of COVID-19 per million people in the R1b:R1a:N haplogroups correlates as 7:2:1. This ratio is practically independent of the pandemic waves, new coronavirus strains and the level of population vaccination.*

**Keywords:** COVID-19 pandemic, R1b, R1a and N haplogroups, 25th cycle of solar activity

#### **Введение**

Динамика солнечной активности (СА) и генетическая изменчивость людей повышают шансы на выживание человечества как биологического вида во время пандемий. Космическая погода и солнечная активность в первую очередь влияют на мутации и изменчивость вируса, а также повышают вариабельность и адаптационную устойчивость человеческой популяции. В максимуме СА существенным оказывается вклад вариаций геомагнитного поля, вариаций ультрафиолетового излучения Солнца и солнечных космических лучей, а в минимуме на роль основного регуляторного биотропного фактора претендуют галактические космические лучи [2-3].

#### **Солнечная активность и особенности пандемии COVID-19**

Текущая пандемия, начавшаяся одновременно в минимумах 11-летнего и квази-столетнего цикла, в 2020-2021 годах демонстрирует разницу в относительной смертности в различных странах более чем в 5-8 раз (против 2 раз при пандемиях обычного гриппа). По-видимому, существенное геногеографическое различие локальных эпидемий характерно для пандемий глобального минимума солнечной активности. Массовая вакцинация и резкое возрастание солнечной активности во второй половине 2021 года привело соотношение смертности в различных гаплогруппах к стандартному коэффициенту «2». Совокупный анализ данных космической погоды и геомагнитной активности позволяет точнее оценивать эффективность противопандемийных мероприятий, а также делать прогнозы на будущее:

1. Пандемии вирусных инфекций происходят в экстремумах солнечной активности (СА), в зависимости от соотношения фаз 11-летнего цикла и цикла Гляйсберга
2. Анализ динамики вирусных пандемий за последние 270 лет показывает, что в высоких циклах СА развитие пандемий характерно в максимумах 11-летнего цикла СА. При циклах СА с высотой около 100-110 среднегодовых чисел Вольфа развитие пандемий наблюдается как в максимумах, так и в минимумах 11-летнего цикла СА.
3. В условиях текущего глобального минимума СА развитие пандемии в основном определяется геногеографическим распределением населения, а не медицинскими или карантинными мерами. Генетические популяционные особенности сыграли решающую роль в развитии локальных эпидемий коронавируса в условиях глобального минимума СА. Их вклад составляет более 500% против 20-30%, приходящихся

на остальные факторы (кроме вакцинации), таких как средний возраст населения, локдауны, изоляция заболевших, погодные условия, уровень медицины

4. В целом, соотношение заболеваемости и смертности в гаплогруппах R1b : R1a : N в первую и вторую волны коронавируса до начала всеобщей вакцинации в декабре 2020 года составляло примерно 7:2:1. Это же соотношение сохранилось в относительной заболеваемости COVID-19 в 3 волну коронавируса, вне зависимости от штамма коронавируса и процентного соотношения вакцинированного и не вакцинированного населения в различных странах. Вакцинация существенно сказалась на динамике смертности населения европейских стран, значительно уменьшив ее в 3 волну. При этом относительная смертность в России несущественно увеличилась.



Однако 4-я волна коронавируса с штаммом омикрон уравнила относительную смертность европейских стран на уровне около 5, что даже больше, чем относительная смертность в России в первую-вторую волну пандемии COVID-19 до начала всеобщей вакцинации. Таким образом, соотношение количества коронавирусных заболевших соотносится в гаплогруппах R1b:R1a:N как 7:2:1 вне зависимости от штамма коронавируса, локдаунов и вакцинации (Рисунок 1).

Рисунок 1. Динамика относительной заболеваемости 1-4 й волн коронавируса (Бельгия, Италия, Франция, Россия).

5. В ближайшей перспективе, по мере увеличения фазы роста 25 цикла СА, тенденция к двукратному увеличению заболеваемости COVID-19 может сохраниться до 2024 года.
6. В дальнейшей перспективе, при прогнозируемом до середины 21 века длительном сохранении низких циклов СА (с амплитудой в максимуме около 100- 110 среднегодовых чисел Вольфа), вирусные пандемии могут происходить каждые 5-6 лет - и в минимуме и в максимуме 11-летнего цикла СА.

### Заключение

Понимание механизмов солнечно-земных связей выявляет закономерности в развитии вирусных пандемий, не очевидные при рассмотрении данных о заболеваемости и смертности только с точки зрения вирусологии или эпидемиологии. Выявление гено-географических особенностей распространения и тяжести течения пандемии (с учетом динамики солнечной активности) может помочь в планировании эпидемиологических и организационно-карантинных мероприятий, и обеспечить заблаговременное распределение средств и медицинских ресурсов по наиболее проблемным территориям.

### Список литературы:

1. Рагульская М. В. *Солнце и биосфера: миллиарды лет вместе.* 2019, Из-во Радиотехника, 148 стр.
2. *Ragulskaya M. Solar activity and COVID-19 pandemic // Open Astron. 2021; V 30, n. 1.*

P. 149–158 <https://doi.org/10.1515/astro-2021-0020>

3. Ragulskaya M., Tekutskaya E. Solar activity global minimum and genogeographic features of the COVID-19 pandemic, 2021 IOP CS: EES. 853 012002 doi:10.1088/1755-1315/853/1/012002
4. Ishkov V. Space weather forecast. *Space Research*, 2017, v. 55, No. 6, pp 391-98

**Сведения об авторах**

**Мария Валерьевна Рагульская**

к.ф.-м.н., снс

Отдел солнечной физики и солнечно-земных связей

Институт земного магнетизма и распространения

радиоволн РАН;

Москва, Россия;

E-mail: ra\_mary@mail.ru

**Information about authors**

**Ragulskaya Maria**

PhD, Senior Researcher,

Department of Solar Physics and Solar-Terrestrial Relations,

Institute of Terrestrial Magnetism and Radio Wave Propagation, Russian Academy of Sciences

Moscow, Russia

E-mail: ra\_mary@mail.ru

УДК 577.17; 577.12.05; 573.55  
ГРНТИ 31.27.27, 34.39.39, 34.15.15,  
34.03.25  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.247-251

**К. Б. Шумаев, О. В. Космачевская,  
Э. И. Насыбуллина, А. Ф. Топунов**  
Институт биохимии им. А.Н. Баха,  
Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук

**ВОЗНИКНОВЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ СИГНАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ОКСИДА АЗОТА**

*В статье обсуждаются эволюционные аспекты функционирования оксида азота (NO) у различных организмов. Как сигнальная молекула NO имеет широкое распространение как у прокариот, так и у эукариот. Многообразное действие NO обусловлено образованием его биологически активных метаболитов. Формирование этих производных NO было связано с эволюцией энергетического гомеостаза и защиты живых систем от окислительного стресса.*

**Ключевые слова:** оксид азота, динитрозильные комплексы железа, NO-синтазы, нитрат- и нитритредуктазы, антиоксидантные свойства

**К. В. Shumaev, O. V. Kosmachevskaya, E. I. Nasybullina,  
A. F. Topunov**  
Federal Research Center of Biotechnology

**THE ORIGIN AND EVOLUTION OF THE SIGNAL FUNCTION OF NITRIC OXIDE**

*The article discusses the evolutionary aspects of the functioning of nitric oxide (NO) in various organisms. As a signaling molecule, NO is widely distributed in both prokaryotes and eukaryotes. The diverse action of NO is due to the formation of its biologically active metabolites. The formation of these NO derivatives was associated with the evolution of energy homeostasis and protection of living systems from oxidative stress.*

**Key words:** nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, NO-synthases, nitrate and nitrite reductases, antioxidant properties

**Введение**

Формирование сигнальных систем, наряду с появлением матричного синтеза биополимеров и энергетического метаболизма, является важнейшим фактором в зарождении и эволюции жизни на Земле, а также вероятно на экзопланетах. Одна из наиболее

универсальных сигнальных систем основана на функционировании такой простой двухатомной молекулы как оксид азота (NO). Оксид азота представляет собой вторичный мессенджер, относящийся к группе так называемых газотрансмиттеров, наряду с монооксидом углерода (CO), сероводородом (H<sub>2</sub>S), этилен, а также, некоторые другие газы [1]. Высокая реакционная способность оксида азота связана с тем, что в живых системах он представлен в трех формах: свободного радикала (NO<sup>•</sup>), катиона нитрозония (NO<sup>+</sup>) и нитроксильного аниона (NO<sup>-</sup>). Обычно при обсуждении эволюции сигнальных путей, связанных с оксидом азота, обсуждается биосинтез NO и компоненты участвующие в его рецепции. Вместе с тем регуляторную и сигнальную функцию NO нельзя рассматривать в отрыве от действия таких его метаболитов как активные формы азота, динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы [2-5]. С другой стороны, нельзя исключить, что становление NO-сигнальной системы относится самому раннему периоду эволюции биосферы [1, 6, 7], возможно даже до возникновения последнего универсального общего предка (last universal common ancestor, LUCA).

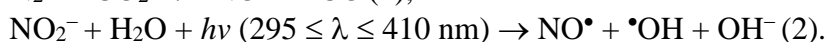
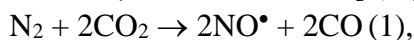
### **Обсуждение**

В настоящее время NO обнаружен практически среди всех исследованных групп животных, а также растений, грибов и бактерий, где он участвует в огромном числе биологических процессов. В частности, оксид азота выполняет роль сигнальной и регуляторной молекулы у пластинчатых (трихоплаксы) и губок, находящихся в основании эволюционного ствола многоклеточных животных [1, 8, 9]. У этих организмов, как и других животных, основным источником оксида азота являются NO-синтазы катализирующие пятиэлектронное окисление азота гуанидиновой группы аргинина. Вместе с тем, у высших растений существование таких ферментов строго не доказано. С другой стороны NO-синтазы, хотя и имеющие специфические структурные особенности, обнаружены у некоторых водорослей. У них также выявлены гомологи растворимых гуанилатциклаз, цГМФ-зависимых протеинкиназ и других компонентов сигнальных каскадов, коррелирующих с присутствием NO-синтаз. Считается, что передача сигнала оксида азота у наземных растений опосредована формированием S-нитрозотиолов и комплексов NO с негемовым и гемовым железом [4,10], но не гемовой группой гуанилатциклазы.

Предполагают, что у растений и прокариот NO преимущественно продуцируется с участием ферментов, обладающих нитрат- и нитритредуктазной активностью [1, 7, 10-12]. Нужно отметить, что восстанавливать нитрит до оксида азота способны некоторые компоненты дыхательной цепи бактерий и митохондрий эукариот. Так, в условиях аноксии у высших растений образование оксида азота из нитрита катализирует IV (цитохромоксидаза) и, вероятно, III комплекс дыхательной цепи, причём в утилизации оксида азота важную роль играют несимбиотические гемоглобины растений [10]. В аналогичных условиях у животных митохондрии также восстанавливают нитрит, причем образующийся NO, включается в состав динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) [13]. Чаще всего в состав ДНКЖ, наряду с NO и негемовым железом, входят серосодержащие соединения, в том числе SH-группы цистеинов и других тиолов. В ряде исследований показано, что этих комплексов обладают антиоксидантными и антирадикальными свойствами [2, 4, 5, 13, 14]. Нами установлено, что ДНКЖ перехватывают свободные радикалы липидов, причём в результате, вероятно, образуются нитролипиды, которые являются ещё одной группой сигнальных молекул [14]. Существенно, что ДНКЖ не только непосредственно ингибируют свободнорадикальное окисление, но и участвуют в сигнализации связанной с окислительным и нитрозативным стрессами. Действительно, у некоторых бактерий формирование ДНКЖ на железосерных центрах транскрипционных факторов является триггером их активности, причём эти факторы регулируют экспрессию генов антиоксидантной защиты [15]. Кроме того, Fe-S кластеры держатся в белках дыхательной цепи и ряде наиболее древних антиоксидантных ферментов анаэробных бактерий и архей. Поскольку железосерные кластеры под

действием оксида азота способны превращаться в структурно-схожие с ними ДНКЖ можно предположить, что метаболизм NO, серосодержащих соединений и железа был взаимосвязан уже у *LUCA*. Более того, такая взаимосвязь могла возникнуть ещё на более ранней стадии эволюции. В связи с этим стоит упомянуть гипотезу «мира сульфидов железа» согласно которой жизнь зародилась в гидротермальных источниках на основе пористых минералов переходных металлов, таких как пирит (сульфид железа) и сфалерит (сульфид цинка) [16].

Предполагают, что на раннем этапе эволюции NO занял центральное место в бактериальной биоэнергетике и глобальном цикле азота, жизненно важном для всех организмов. Источником оксида азота в бескислородной атмосфере архея могли быть электрические разряды, а также фотолиз нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) под действием УФ-излучения, см. реакции 1 и 2, соответственно [1, 6]:



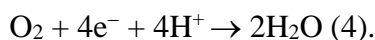
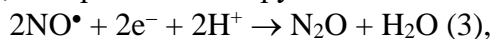
Кроме того, нитрит может восстанавливаться до NO в кислом и насыщенном солями двухвалентного (закисного) железа океане архея в следующей реакции:



Также весьма вероятно, что в этих условиях происходил абиотический синтез ДНКЖ, которые могли накапливаться вблизи источников  $\text{H}_2\text{S}$  и тиосульфата.

Кроме того, реакция 3 могла происходить в хемоавтотрофных микроорганизмах архея как этап  $\text{Fe}^{2+}$ -зависимого восстановления нитрата. В свою очередь нитратредукторы конкурировали с фототрофами осуществлявшими аноксигенный фотосинтез, в котором донором электронов является  $\text{Fe}^{2+}$ , причём NO ингибировал этот вариант фотосинтеза [12]. Таким образом, NO мог играть роль регулятора в экосистемах архейской эры.

Существует достаточно обоснованное мнение, что NO и его производные (нитрит, нитрат) являлись конечными акцепторами электронов в дыхательной цепи ряда прокариот в докислородный период эволюции земной биосферы. Важно, что восстановление оксида азота позволяло создавать электрохимический градиент на мембране этих анаэробных микроорганизмов и обеспечивать синтез АТФ. Считается, что в результате эволюции таких NO-редуктаз возникли цитохромоксидазы аэробных организмов. Действительно имеется структурное сходство цитохромоксидазы и NO-редуктаз некоторых современных бактерий [6,7]. Ниже приведены реакции двух-электронного восстановления NO до закиси азота ( $\text{N}_2\text{O}$ ) и четырех-электронного восстановления кислорода до воды, которые катализируют соответственно NO-редуктаза и цитохромоксидаза:



Вместе с тем нитрозилирование терминальных цитохромов бактериальной дыхательной цепи ингибирует дыхание, усиливает антиоксидантную защиту и влияет на устойчивость к антибиотикам [7].

В работе [1] выдвинуто предположение, что повышение концентрации кислорода в атмосфере Земли (так называемая кислородная катастрофа ~2,4-2,3 млрд. лет назад) не устранило “древние” функции NO, которые существуют до сих пор и обеспечивают важные регуляторные механизмы, действующие в основном в условиях гипоксии. С другой стороны, развитие сигнального пути связанного с зависимым от L-аргинина синтезом NO, вероятно, являются результатом адаптаций к условиям, возникшим после кислородной катастрофы. Действительно, окисление аргинина NO-синтазами могло быть способом защиты от избытка молекулярного кислорода. В то же время у высших растений сохранился восстановительный путь синтеза оксида азота.

### **Заключение**

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

1) Мы полагаем, что NO-зависимая система сигнализации существовала уже у последнего универсального общего предка. Более того эта система, по-видимому,

формировалась ещё на этапе предбиологической эволюции.

2). Эволюция сигнальной функции NO тесно связана с энергетическим метаболизмом, а также обменом железа и тиолов в живых системах.

3) Антиоксидантные свойства оксида азота и его редокс-активных метаболитов сыграли важную роль в развитии различных сигнальных путей и регуляторных механизмов, в которых участвует NO.

3) Возникновении современных NO-зависимых путей регуляции у эукариот, вероятно, было следствием адаптации к условиям «глобального» окислительного стресса в биосфере Земли после кислородной катастрофы.

**Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.**

### Список литературы

1. Moroz L.L., Kohn A.B. *Parallel evolution of Nitric Oxide signaling: Diversity of synthesis & memory pathways // Front Biosci (Landmark Ed). 2011. No 16. P. 2008–2051.*
2. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. *Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress // Meth. Enzymol. 2008. V. 436. P. 445-461.*
3. Vanin A.F. *Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a “working forms” of endogenous nitric oxide // Nitric Oxide. 2016. Vol. 54. No 1. P. 15–29.*
4. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Chumikina L.V., Topunov A.F. *Dinitrosyl Iron Complexes and other Physiological Metabolites of Nitric Oxide: Multifarious Role in Plants // Natural product communications. 2016. V. 11. No 8. P. 1189–1192.*
5. Shumaev K.B., Dudylina A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. *Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria // Biofactors. 2018. Vol. 44. No 3. P. 237-244.*
6. Ducluzeau A.-L., van Lis R., Duval S., Schoepp-Cothenet B., Russell M.J., Nitschke W. *Was nitric oxide the first deep electron sink? // Trends in Biochemical Sciences. 2009. V. 34. No. 1. P. 9-15.*
7. Vázquez-Torres A., Bäuml A. *Nitrate, nitrite and nitric oxide reductases: from the last universal common ancestor to modern bacterial pathogens // Current Opinion in Microbiology. 2016. V. 29. P. 1–8.*
8. Moroz L.L., Romanova D.Y., Nikitin M.A., Sohn D., Kohn A.B., Neveu E., Varoqueaux F., Fasshauer D. *Nitric oxide (NO) signaling in Trichoplax and related species: Microchemical characterization and the lineage-specific diversification // bioRxiv. 2020.*
9. Musser J.M., Moroz L.L., Arendt D. et al. *Profiling cellular diversity in sponges informs animal cell type and nervous system evolution // Science. 2021. V. 374. No 6568. P. 717-723.*
10. Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Shaha J.K., Robert D. *Anoxic nitric oxide cycling in plants: participating reactions and possible mechanisms // Physiologia Plantarum. 2010. V. 138. No 4. P. 393–404.*
11. Tejada-Jimenez M., Llamas A., Galván A., Fernández E. *Role of Nitrate Reductase in NO Production in Photosynthetic Eukaryotes // Plants. 2019. V. 8. No 3 (56). P. 1-13.*
12. Nikeleit V., Mellage A., Bianchini G., Sauter L., Buessecker S., Gotterbarm S., Schad M., Konhauser K., Zerkle A.L., Sánchez-Baracaldo P., Kappler A., Bryce C. *Inhibition of photoferrotrophy by nitric oxide in ferruginous environments // Earth ArXiv. 2021.*
13. Dungal P., Perlinge M., Weidinger A., Redl H., Kozlov A.V. *The cytoprotective effect of nitrite is based on the formation of dinitrosyl iron complexes // Free Radical Biology and Medicine. 2015. V. 89. P.300–310.*
14. 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.*
15. Ding H., Demple B. *Direct nitric oxide transduction via nitrosylation of iron sulfur*

centers in the SoxR transcription activation, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. V. 97. P. 5146-5150.

16. Ross D.S. A Quantitative Evaluation of the Iron-Sulfur World and Its Relevance to Life's Origins // *Astrobiology*. 2008. V.8. No 2. P. 267-272.

**Сведения об авторах**

**Константин Борисович Шумаев,**

д-р биол. наук., ст. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [tomorov@mail.ru](mailto:tomorov@mail.ru)

**Ольга Владимировна Космачевская,**

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [rizobium@yandex.ru](mailto:rizobium@yandex.ru)

**Эльвира Ильгизовна Насыбуллина,**

канд. биол. наук, науч. сотр.

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [lvirus198709@rambler.ru](mailto:lvirus198709@rambler.ru)

**Алексей Федорович Топунов,**

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Москва, Россия

<http://www.fbras.ru>

**E-mail:** [aftopunov@yandex.ru](mailto:aftopunov@yandex.ru)

**Information about authors**

**Konstantin Borisovich Shumaev,**

DBS,

Senior Research Scientist,

Bach Institute of Biochemistry,

Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences

Moscow, Russia

**E-mail:** [tomorov@mail.ru](mailto:tomorov@mail.ru)

**Olga Vladimirovna Kosmachevskaya,**

PhD, Senior Research Scientist,

Bach Institute of Biochemistry,

Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences

Moscow, Russia

**E-mail:** [rizobium@yandex.ru](mailto:rizobium@yandex.ru)

**Elvira Ilgizovna Nasybullina,**

PhD Research Scientist,

Bach Institute of Biochemistry,

Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences

Moscow, Russia

**E-mail:** [lvirus198709@rambler.ru](mailto:lvirus198709@rambler.ru)

**Alexey Fedorovich Topunov,**

DBS

Head of Laboratory,

Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences

Moscow, Russia

**E-mail:** [aftopunov@yandex.ru](mailto:aftopunov@yandex.ru)

УДК 57.041.615.3

ГРНТИ 34.03.99, 34.15.63

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.251-257

**Ю. В. Абаленихина, А. А. Сеидкулиева,**

**Е. Д. Рокунов, Д. С. Немтинов, А. В. Щулькин,**

**Е. Н. Якушева**

Федеральное государственное бюджетное образова-

тельное учреждение высшего образования

«Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения

Российской Федерации

**УЧАСТИЕ ЯДЕРНОГО ФАКТОРА ЭРИТРОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ-2 В РЕГУЛЯЦИИ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭНДОГЕННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА**

*В статье обсуждаются механизмы регуляции белка-транспортера Р-гликопротеина (Pgp) в клетках линии Сасо-2 в условиях моделирования эндогенного окислительного*

стресса, вызванного воздействием DL-бутионинсульфоксими́на (БСО, ингибитор синтеза глутатиона). Эксперименты показали, что воздействие БСО в концентрациях 10-100 мкМ приводит к снижению концентрации глутатиона, возрастанию количества Pgp и ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2). Ингибирование Nrf2 способствовало нормализации уровня Pgp, что доказывает участие транскрипционного фактора в регуляции белка-транспортера в условиях моделирования эндогенного окислительного стресса.

**Ключевые слова:** эндогенный окислительный стресс, глутатион, DL-бутионинсульфоксимин, ядерный фактор эритроидного происхождения 2, P-гликопротеин.

Y. V. Abalenikhina, A.A. Seidkuliyeva, E. D. Rokunov, D.S. Nemtinov, A. V. Shchulkin, E. N. Yakusheva  
Ryazan State Medical University

### **PARTICIPATION OF NUCLEAR FACTOR OF ERYTHROID ORIGIN-2 IN REGULATION P-GLYCOPROTEIN IN MODELING ENDOGENOUS OXIDATIVE STRESS**

The article discusses the mechanisms of regulation of the P-glycoprotein transporter protein (Pgp) in cells of the Caco2 line under conditions of modeling endogenous oxidative stress caused by exposure to DL-butyonine sulfoximine (BSO, a glutathione synthesis inhibitor). Experiments have shown that exposure to BSO at concentrations of 10-100 μM leads to a decrease in the concentration of glutathione, an increase in the amount of Pgp and nuclear factor of erythroid origin 2 (Nrf2). Inhibition of Nrf2 contributed to the normalization of Pgp levels, which proves the participation of the transcription factor in the regulation of the transporter protein under the conditions of modeling endogenous oxidative stress.

**Keywords:** endogenous oxidative stress, glutathione, DL-butyonine sulfoximine, nuclear factor of erythroid origin 2, P-glycoprotein.

#### **Введение**

P-гликопротеин (Pgp, ABCB1-белок) – АТФ-зависимый эффлюксный белок-транспортер, который является продуктом гена множественной лекарственной устойчивости (MDR1). Pgp локализован на цитоплазматических мембранах различных клеток - энтероциты кишечника, гепатоциты, эпителиальные клетки почечных канальцев, эндотелиальные клетки гистогематических барьеров [1, 2].

Pgp обладает широкой субстратной специфичностью и выполняет следующие физиологические функции:

- транспорт эндогенных веществ (стероидные, тиреоидные гормоны);
- защита забарьерных органов (головной мозг, тестикулы) и плода;
- участие в фармакокинетике (всасывании, распределении, выведении) лекарственных веществ [3].

Однако, изменение экспрессии Pgp может наблюдаться при неврологических (Болезнь Альцгеймера [4], эпилепсия [5]) и онкологических (рак желудка [6], остеосаркома [8]) заболеваниях. Большинство патологических состояний протекает на фоне окислительного стресса.

Окислительный стресс (ОС) – это дисбаланс между продукцией и утилизацией активных форм кислорода. Причина развития ОС может быть связана с воздействием прооксиданта (экзогенный ОС) или в результате инактивации антиоксидантных систем клетки (эндогенный ОС).

Главную роль в механизмах антиоксидантной защиты играет глутатион (GSH) – тиолсодержащий трипептид, который способен связывать свободные радикалы и изменять реакцию клеток на ее редокс-статус.

Регуляция Pgp в условиях эндогенного ОС является недостаточно изученным вопросом. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии ингибитора синтеза глутатиона – бутионинсульфоксими́на (БСО) на экспрессию Pgp [8, 9]. Ядерный фактор



эритроидного происхождения 2 (*Nrf2*) является основным механизмом защиты клетки в условиях окислительного стресса. В настоящее время описана *Nrf2*-опосредованная регуляция *Pgp* для клеток *HepG2* (клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека) при воздействии ВЖС *in vitro*, этот же механизм был подтвержден *in vivo* на мышах [10], а ингибирование передачи сигнала *Nrf2/ABCBI* рассматривают в качестве возможной терапевтической стратегии повышения эффективности химиотерапии при колоректальном раке [11].

Однако, механизм регуляции *Pgp* в условиях ингибирования синтеза глутатиона в настоящее время не описаны.

**Цель работы.** Оценить вклад *Nrf2* в регуляцию *Pgp* в условиях моделирования эндогенного ОС *in vitro*.

### Материалы и методы

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, являющиеся моделью тонкой кишки *in vitro*. Дефицит уровня глутатиона, моделировали добавлением в культуральную среду ингибитора его синтеза – *D,L*-бутионинсульфоксимины (БСО, «Sigma-Aldrich», Германия) [12] в конечных концентрациях 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубацией в течение 24 ч. Контрольные клетки инкубировали с чистой питательной средой (растворитель БСО). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах, после окончания экспозиции снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия) и готовили клеточные лизаты по протоколу [13]. Далее определяли уровень небелковых SH-групп по реакции с 5,5'-дитиобис(2-нитро)-бензоатом (*DTNB*, «Serva», Германия) [14]. Количество *Nrf2* и *Pgp* оценивали методом гетерогенного иммуноферментного анализа (*ElisaKits BlueGene*, Китай) в лизате клеток, приготовленных в результате трехкратного цикла заморозки-разморозки. Концентрацию белка в пробах анализировали методом Бредфорда. Для оценки роли *Nrf2* в регуляции *Pgp* клетки культивировали в питательной среде при добавлении БСО в тестируемых концентрациях совместно с ингибитором *Nrf2* N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (АЕМ1, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 5 мкМ [15]. Ингибитор добавляли в питательную среду за 30 мин до внесения БСО. После экспозиции 24 ч клетки снимали с поверхности 6-луночных планшетов, готовили клеточные лизаты и определяли количество *Pgp* методом вестерн-блот [16].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью дисперсионного анализа, значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### Полученные результаты

Клетки линии Caco-2 – это клетки аденокарциномы ободочной кишки человека. При культивировании в виде монослоя данные клетки обладают способностью спонтанно дифференцироваться в клетки, подобные тонкокишечным энтероцитам, гиперэкспрессирующим белки-транспортёры, в том числе и *Pgp*. Данная клеточная линия широко используется для исследования абсорбции лекарственных веществ и функционирования *Pgp in vitro*.

В ходе работы было получено, что воздействие БСО в концентрациях 10-500 мкМ приводило к развитию эндогенного ОС, что было связано со снижением внутриклеточного антиоксиданта – глутатиона, так как он является основным представителем небелковых SH-групп (рис. 1).

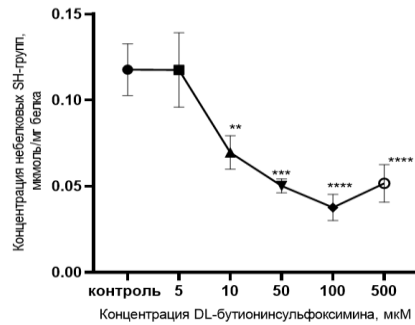


Рис. 1. Концентрация небелковых SH-групп (мкмоль/мг белка) в клетках линии *Caco-2* при моделировании эндогенного окислительного стресса воздействием DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 5–500 мкМ в течение 24 ч ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ ). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  по сравнению с контролем (тест Даннетта).

В условиях эндогенного ОС, моделированного воздействием БСО в течение 24 ч было получено, что количество *Nrf2* и *Pgp* статистически значимо возрастало по сравнению с контролем (рис. 2). Так, количество *Nrf2* возрастало на 157,8%, 146,7% и 164,4%, а *Pgp* – 71,6%, 51,6% и 25,4% при инкубации с БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно.

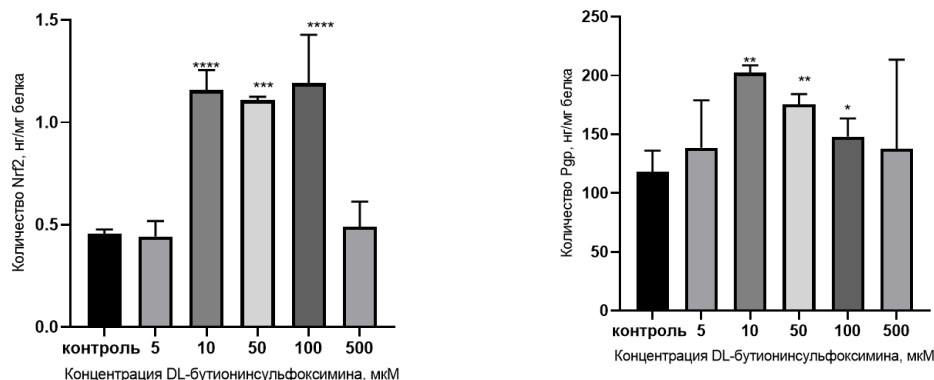
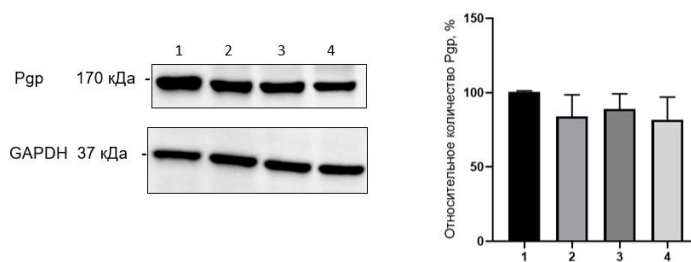


Рис. 2. Количество ядерного фактора эритроидного происхождения  $\alpha$  (*Nrf2*) и  $\gamma$ -гликопротеина (*Pgp*) в клетках линии *Caco-2* при моделировании эндогенного окислительного стресса воздействием DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 5–500 мкМ в течение 24 ч ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  по сравнению с контролем (тест Даннетта).

Для изучения механизма повышения количества *Pgp* в условиях эндогенного окислительного стресса был выполнен эксперимент с ингибиторами транскрипционного фактора *Nrf2* – *AEM1* (*ARE expression modulator 1*), блокирующий взаимодействие *Nrf2* с *ARE* и подавляющий экспрессию генов, контролируемых данным транскрипционным фактором.

Воздействие на клетки *AEM1* в сочетании с БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ и сроке инкубации 24 ч препятствовало повышению относительного количества *Pgp* (количество не отличалось от значений контроля) (рис. 3).



**Рис. 3.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии *Caco-2* при воздействии ингибитора ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (АЕМ1, 5 мкМ) в сочетании с DL-бутионинсульфоксимином.

Примечание: 1 – контроль; 2, 3, 4 - DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно.

### Выводы

В условиях развития эндогенного окислительного стресса, вызванного DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ при воздействии 24ч, ядерный фактор эритроидного происхождения 2 участвует в регуляции Р-гликопротеина.

### Заключение

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

1. DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 10-500 мкМ и сроке воздействия 24 ч способствует снижению внутриклеточного глутатиона и развитию эндогенного окислительного стресса в клетках линии *Caco-2*.

2. В условиях моделирования эндогенного окислительного стресса, вызванного воздействием DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ, количество ядерного фактора эритроидного происхождения 2 и Р-гликопротеина возрастает в клетках линии *Caco-2*.

3. Количество Р-гликопротеина в клетках линии *Caco-2* при моделировании эндогенного окислительного стресса регулируется содержанием ядерного фактора эритроидного происхождения 2.

*Работа поддержана грантом Президента РФ (МК-1856.2020.7).*

### Список литературы.

1. Yakusheva E.N., Titov D.S. Structure and fuction of multidrug resistance protein 1// *Biochemistry (Moscow)*. 2018. T. 83. № 8. С. 907-929.
2. Esser L., Zhou F., Pluchino K.M., Shiloach J., Ma J., Tang W., Gutierrez C., Zhang A., Shukla S., Madigan J.P., Zhou T., Kwong P.D., Ambudkar S.V., Gottesman M.M., Xia D. Structures of the Multidrug Transporter P-glycoprotein Reveal Asymmetric ATP Binding and the Mechanism of Polyspecificity // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. № 2. P. 446–461
3. Ieiri I., Takane H., Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications // *Clin. Pharmacokinet.* 2004. V. 43. № 9. P. 553–576.
4. Sita G., Hrelia P., Tarozzi A., Morroni F. P-glycoprotein (ABCB1) and Oxidative Stress: Focus on Alzheimer's Disease // *Oxid Med Cell Longev.* 2017. e7905486.
5. Wang G.X., Wang D.W., Liu Y., Ma Y.H. Intractable epilepsy and the P-glycoprotein hypothesis // *Int J Neurosci.* 2016. V.126. No. 5. P. 385-92.
6. Xu H.W., Xu L., Hao J.H., Qin C.Y., Liu H. Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein is associated with multidrug resistance in gastric cancer // *J Int Med Res.* 2010. V.38. No. 1. P. 34-42.
7. Gao Y., Liao Y., Shen J.K., Feng Y., Choy E., Cote G., Harmon D., Mankin H.J., Hornicek F.J., Duan Z. Evaluation of P-glycoprotein (Pgp) expression in human osteosarcoma by high-throughput tissue microarray // *J Orthop Res.* 2016. V.34. No. 9. P. 1606-12.
8. Raghu G., Pierre-Jerome M., Dordal M.S., Simonian P., Bauer K.D., Winter J.N. P-glycoprotein and alterations in the glutathione/glutathione-peroxidase cycle underlie

- doxorubicin resistance in HL-60-R, a subclone of the HL-60 human leukemia cell line // Int J Cancer. 1993. V.53. No. 5. P. 804-11.*
9. Абаленихина Ю.В., Ерохина П.Д., Мыльников П.Ю., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. Функционирование мембранного белка-транспортера Р-гликопротеина в условиях ингибирования синтеза глутатиона// Прикладная биохимия и микробиология. 2022. № 3. С. 232-242.
  10. Yang X., Hu G., Lv L., Liu T., Qi L., Huang G., You D., Zhao J. Regulation of P-glycoprotein by Bajijiasu in vitro and in vivo by activating the Nrf2-mediated signalling pathway // Pharm Biol. 2019. V.57. No. 1. P. 184-192.
  11. Sadeghi M.R., Jeddi F., Soozangar N., Somi M.H., Shirmohamadi M., Khaze V., Samadi N. Nrf2/P-glycoprotein axis is associated with clinicopathological characteristics in colorectal cancer // Biomed Pharmacother. 2018. No.104. P. 458-464.
  12. Moine L., Rivoira M., Díaz de Barboza G., Pérez A., Tolosa de Talamoni N. Glutathione depleting drugs, antioxidants and intestinal calcium absorption // World J Gastroenterol. 2018. V. 24. No.3 44. P. 4979-4988.
  13. Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Seidkuliyeva A.A., Shchul'kin A.V., Yakusheva E.N. Funktsionirovaniye pregnan X retseptora v usloviakh nitrozativnogo stressa// Biomed Khim. 2021. V. 67, No 5. С. 394-401.
  14. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Определение тиоловых групп в ткани мозга при помощи ТНЮ-GLO // Биомедицинская химия. 2004. Т. 50. № 4. С. 390-397.
  15. Bollong M.J., Yun H., Sherwood L., Woods A.K., Lairson L.L. A small molecule inhibits deregulated NRF2 transcriptional activity in cancer // ACS Chem. Biol. 2015. No10. 2193-2198.
  16. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Слепнев А.А., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. Влияние оксида азота на функционирование белка-транспортера Р-гликопротеина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 173. № 1. С. 2-6.

**Сведения об авторах**

**Юлия Владимировна Абаленихина,**

к.б.н., доцент, доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рязань, Россия

**E-mail:** abalenikhina88@mail.ru

**Адамьяна Аманмамедовна Сеидкулиева,**

ассистент кафедры фармацевтической химии

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рязань, Россия

**E-mail:** adamiana@inbox.ru

**Егор Дмитриевич Рокунов**

студент 5 курса лечебного факультета

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рязань, Россия

**E-mail:** rokunov1999@mail.ru

**Данил Сергеевич Немтинов,**

студент 4 курса лечебного факультета

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рязань, Россия

**E-mail:** elizaveta.2la@gmail.com

**Information about authors**

**Yulia Vladimirovna Abalenikhina, Candidate of Biological Sciences,**

Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry with the course of KLD FDPO

Ryazan State Medical University  
Ryazan, Russia

**E-mail:** abalenikhina88@mail.ru

**Adamiana Amanmamedovna Seidkuliyeva,**

Assistant of the Department of Pharmaceutical Chemistry  
Ryazan State Medical University  
Ryazan, Russia

**E-mail:** adamiana@inbox.ru

**Egor Dmitrievich Rokunov,**

5th year student  
of the Faculty of Medicine  
Ryazan State Medical University  
Ryazan, Russia

**E-mail:** rokunov1999@mail.ru

**Danil Sergeevich Nemtinov,**

4th year student  
of the Faculty of Medicine  
Ryazan State Medical University  
Ryazan, Russia

**E-mail:** elizaveta.2la@gmail.com

**Алексей Владимирович Шулькин,**

д.м.н., доцент, профессор кафедры фармакологии с курсом фарма-  
ции ФДПО

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Рязанский государственный  
медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Ми-  
нистерства здравоохранения Российской Федерации

Рязань, Россия

**E-mail:** [alekseystshulkin@rambler.ru](mailto:alekseystshulkin@rambler.ru)

**Елена Николаевна Якушева,**

д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии с курсом  
фармации ФДПО

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования «Рязанский государственный  
медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Ми-  
нистерства здравоохранения Российской Федерации

Рязань, Россия

**E-mail:** [e.yakusheva@rzgmu.ru](mailto:e.yakusheva@rzgmu.ru)

**Alexey Vladimirovich Shchulkin,**

MD, Associate Professor,  
Professor of the Department of Pharmacology  
Ryazan State Medical University  
Ryazan, Russia

**E-mail:** [alekseystshulkin@rambler.ru](mailto:alekseystshulkin@rambler.ru)

**Elena Nikolaevna Yakusheva, MD, Profes-**

sor,  
Head of the Department of Pharmacology  
Ryazan State Medical University  
Ryazan, Russia

**E-mail:** [e.yakusheva@rzgmu.ru](mailto:e.yakusheva@rzgmu.ru)

УДК 577.2.01:(544.312.001.24+57.052.2+577.32)

ГРНТИ 34.15.29, 31.15.25, 34.17.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.257-261

**Ю. Д. Нечипуренко, А. С. Бучельников,**

**И. А. Лавриненко**

Институт молекулярной биологии им.

В.А. Энгельгардта РАН

Севастопольский государственный университет

Воронежский государственный университет

## **КООПЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ЛИГАНДОВ С БИОПОЛИМЕРАМИ**

*Методы теории физической адсорбции позволяют анализировать кооперативные вза-  
имодействия между лигандами, адсорбированными на биополимере, в частности, ал-  
лостерические эффекты, характерные для связывания кислорода с гемоглобином. Мы  
показываем, как может быть модифицировано уравнение Хилла, описывающее такое  
связывание. Энтропия адсорбционной системы позволяет наглядно представить про-  
цессы кооперативного связывания. Кооперативные взаимодействия приводят к умень-  
шению энтропии системы и повышению информации, которая в ней содержится.*

**Ключевые слова:** гемоглобин, кооперативные взаимодействия, уравнение Хилла, эн-  
тропия, информация, аллостерические взаимодействия.

**Y. D. Nechipurenko, A. S. Buchelnikov, I. A. Lavrinenko**

V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Sevastopol

State University

Voronezh State University

## **COOPERATIVE EFFECTS IN BINDING OF LIGANDS TO BIOPOLYMERS**

*Models and methods of statistical thermodynamics and physical adsorption theory allow  
us to quantitate cooperative interactions between ligand molecules adsorbed on a macromol-  
ecule, in particular allosteric effects described in detail in oxygen binding to hemoglobin. We  
show how the Hill equation can be modified and how the Hill coefficient can be interpreted.  
On the other hand, the entropy of the adsorption system allows us to visualize cooperative  
binding processes. Cooperative interactions lead to a decrease in the entropy of the system  
and an increase in the information it contains.*

**Keywords:** hemoglobin, cooperative interactions, the Hill coefficient, the Hill equation,  
entropy, information, allosteric interactions.

### **Введение**

Многие процессы в живой клетке включают в себя равновесное связывание лигандов с макромолекулами. Задача количественного описания такого связывания решается при помощи подходов статистической термодинамики и теории физической адсорбции. Построение математических моделей для описания таких систем предполагает построение физической модели, в которой обычно рассматривается решеточная модель связывания лигандов на матрице, несущей ряд реакционных центров (сайтов). Кроме энергии взаимодействия лигандов с матрицей, в рассмотрение обычно вводятся энергии кооперативных взаимодействий между ближайшими соседними адсорбированными лигандами. Кооперативное связывание кислорода с гемоглобином — самая известная система, для которой более ста лет назад были получены уравнения, описывающие связывание [1, 2]. Уравнение Хилла и сейчас имеет самое широкое применение в молекулярной биофизике. Однако до сих пор физический смысл этого уравнения не представляется ясным, а коэффициент Хилла не связан напрямую с механизмами, лежащими в основании кооперативного присоединения кислорода к гемоглобину. В данной работе мы показываем, что представление коэффициента Хилла в виде функции, которая зависит от числа реакционных центров макромолекулы или концентрации свободного лиганда в растворе, может не только пролить свет на механизмы, лежащие в основании связывания, но и позволить с большой степенью точности описать имеющиеся в литературе экспериментальные данные. Также мы демонстрируем, что расчеты энтропии адсорбционной системы могут служить продуктивным подходом к анализу кооперативного связывания лигандов с макромолекулами.

### **Цель работы**

Нашей целью в рамках данной работы была формулировка новых подходов как к описанию связывания лигандов с макромолекулами, так и к пониманию биофизических механизмов, лежащих в основании такого связывания.

### **Материалы и методы**

В качестве объекта исследования была использована модель Хилла и набор экспериментальных данных, полученных Р. Уинслоу *и др.* [3] и Дж. Северингхаусом [4]. Оптимизация параметров моделей проведена методом наименьших квадратов. Оценка степени соответствия модели экспериментальным данным осуществлена через коэффициент детерминации. Необходимые вычисления выполнены в MS Excel.

Для расчета энтропии были применены стандартные методы статистической механики, к коим, в первую очередь, относится формализм статистических сумм, подробно описанный в книге Д. Поланда и Г. Шераги [5].

### **Полученные результаты**

В предыдущей работе, опубликованной в сборнике трудов конференции [6], мы рассмотрели роль ацидоза в каскаде процессов, приводящих к тяжелому течению COVID-19. Эта работа имела продолжение [7]. Ключевым этапом в каскаде реакций, которые замыкают порочный круг положительной обратной связи, является, по нашему мнению, кооперативное связывание кислорода с гемоглобином. В серии работ, опубликованной за последние полгода, мы детально рассмотрели все модели, описывающие такое связывание — и предложили свою модель, которая хорошо описывает экспериментальные данные [8, 9].

Ранее [10, 11] была получена колоколообразная зависимость коэффициента Хилла от логарифма парциального давления кислорода. Вместе с тем функция, которая могла описать такую зависимость, не приводилась. Мы предлагаем использовать уравнение Хилла [9], где коэффициент  $h$  находится следующим образом:

$$h_{i(-1)} = \frac{h_{\max(-1)}}{\exp[\ln(p_i / p_{\max}) / s]^2} + 1, \quad (1)$$

где  $h_i$  — коэффициент Хилла при определенном парциальном давлении  $O_2$  ( $p_i$ ), который является суммой  $h_{i(-1)} + 1$ ;  $h_{\max}$  — максимальное значение коэффициента Хилла, определяемое как  $h_{\max(-1)} + 1$ ;  $p_{\max}$  — парциальное давление  $O_2$  при котором определяется  $h_{\max}$ ;  $s$  — параметр масштаба (коэффициент) по оси абсцисс.

Так как в уравнении Хилла одноименный коэффициент, равный единице, указывает на отсутствие кооперативности, то в знаменатель приведенного уравнения вносится дополнительное слагаемое, равное единице. Это позволяет выполнить смещение этой функции по оси ординат на значение  $h = 1$ .

Тогда степень насыщения лигандом по уравнению Хилла будет определяться следующим выражением:

$$y = \frac{p_i^{h_i}}{p_{50}^{h_i} + p_i^{h_i}}, \quad (2)$$

где  $y$  — степень насыщения гемоглобина кислородом,  $p_{50}$  — парциальное давление кислорода, при котором наступает половинное насыщение гемоглобина лигандом.

Аппроксимация экспериментальных данных Р. Уинслоу и др. [3], а также Дж. Северингхауса [4] (см. рис.) приведенными уравнениями (1) и (2) имеет сопоставимый (0.999944) или превышающий (0.999943) коэффициент детерминации относительно уравнения Эдера (0.999953 и 0.999907, соответственно), включая при этом, параметры с ясной эмпирической трактовкой.

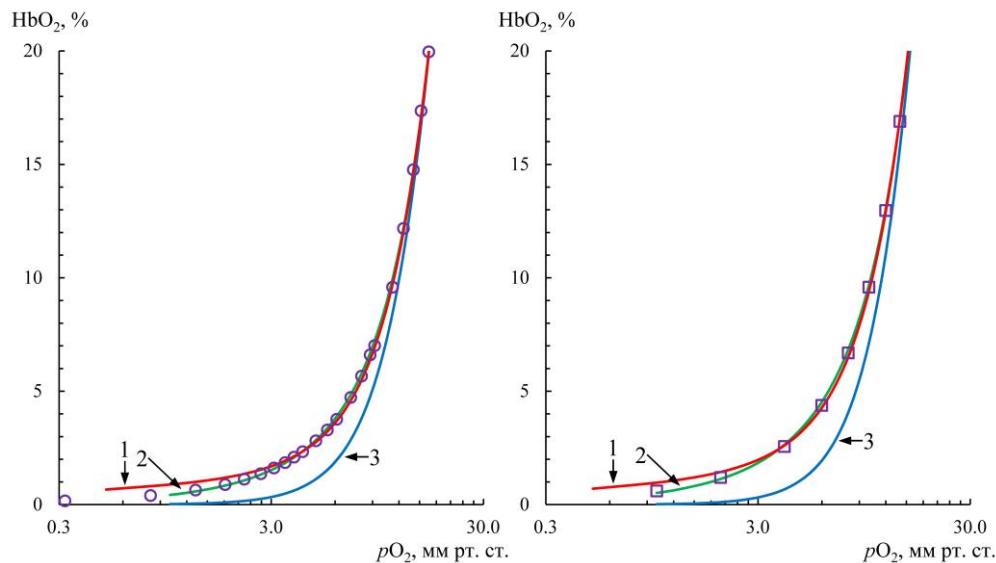


Рис. Аппроксимация экспериментальных точек кривой диссоциации оксигемоглобина: слева по Уинслоу и др. [3], справа по Северингхаусу [4]; 1 — для расчета кривых используется обновленное уравнение Хилла, 2 — уравнение Эдера и 3 — классическое уравнение Хилла

Примечателен тот факт, что вычисленные максимумы параметра кооперативности для рассмотренных наборов экспериментальных данных лежат в области больших парциальных давлений кислорода относительно значения  $p_{50}$ , а степень насыщения гемоглобина кислородом при  $h_{\max}$  для этих наборов данных сопоставима. Вероятно, структурная симметричность макромолекулы гемоглобина — тетрамера, состоящего из пары  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц — не соответствует ее функциональной симметричности. В противном случае максимальное значение коэффициента Хилла приходилось бы на величину  $p_{50}$ .

В последующих работах мы обратились к феномену кооперативного связывания

лигандов с макромолекулой и показали на простейшем примере макромолекулы с двумя центрами связывания, что расчеты статистической энтропии позволяют наглядно представить происходящие в системе процессы. Мы смогли описать количественно зависимость энтропии адсорбционной системы от параметра (энергии) кооперативности [12].

Рассмотрение процессов адсорбции в смеси лигандов и макромолекул удобно проводить с помощью формализма статистических сумм. Статистическая сумма системы, как известно, содержит информацию обо всех состояниях, доступных для системы и позволяет отыскать любые термодинамические параметры, в том числе и статистическую, или конфигурационную, энтропию. Применительно к нашей задаче о связывании лигандов с двухсайтовой макромолекулой статистическая сумма  $Z$  дается в виде:

$$Z = 1 + 2Kc + \omega(Kc)^2, \quad (3)$$

где  $K$  — равновесная константа связывания лиганда с одним центром связывания,  $c$  — молярная концентрация лиганда,  $\omega$  — параметр кооперативности.

Методы статистической механики позволяют найти конфигурационную энтропию  $S$  исследуемой системы. Всего в нашей системе возможны четыре состояния и соответствующие им четыре статистических веса (указаны в скобках): полностью свободная макромолекула (1), полностью занятая лигандами макромолекула ( $\omega(Kc)^2$ ) и два варианта размещения одного лиганда на макромолекуле ( $Kc$  для каждого варианта). Тогда можно получить, что

$$S = -k \left[ \frac{Kc}{Z} (2(1 + \omega Kc) \ln Kc + \omega Kc \ln \omega) - \ln Z \right]. \quad (4)$$

Выражение (4) позволяет анализировать статистическую энтропию как функцию двух переменных  $S = S(Kc, \omega)$ . Повышение кооперативности приводит к понижению энтропии — следовательно, к повышению шенноновской информации  $I$ , которая заключена в системе и формально равна статистической энтропии системы, взятой с обратным знаком:  $I = -S$ . Этот вывод совпадает с результатами недавно опубликованной работы американских биофизиков, которые показали, что аллостерические взаимодействия могут играть важную роль в хранении клеточной информации (как пишут авторы работы, кооперативные взаимодействия позволяют хранить «неограниченные объемы информации» [13]). В связи с этим приобретают особую актуальность развиваемые в ряде работ представления об аллостерических эффектах при связывании лигандов с ДНК (см., например, [12-15]).

### **Выводы**

Анализ кооперативного связывания лигандов с макромолекулами при помощи математических моделей, основанных на представлениях теории адсорбции, позволяет пролить свет на механизмы процессов, происходящих в живой клетке. Кооперативные взаимодействия между адсорбированными лигандами приводят к уменьшению энтропии системы.

### **Заключение**

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

- мы показали, что представление коэффициента Хилла  $h$  в виде функции хорошо описать экспериментальные данные;
- мы продемонстрировали, что расчеты статистической энтропии позволяют получить наглядную информацию о происходящих в системе процессах.



**Список литературы**

1. Hill A.V. *The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves* // *J. Physiol.* 1910. V. 40 (i). P. 4-7.
2. Colquhoun D. *The quantitative analysis of drug-receptor interactions: a short history* // *Trends Pharmacol. Sci.* 2006. V. 27 (3). P. 149-157.
3. Winslow R.M., Swenberg M.L., Berger R.L., Shrager R.I., Luzzana M., Samaja M., Rossi-Bernardi L. *Oxygen equilibrium curve of normal human blood and its evaluation by Adair's equation* // *J. Biol. Chem.* 1977. V. 252 (7). P. 2331-2337.
4. Severinghaus J.W. *Simple, accurate equations for human blood O<sub>2</sub> dissociation computations* // *J. Appl. Physiol.* 1979. V. 46 (3). P. 599-602.
5. Poland D., Scheraga H.A. *Theory of helix-coil transitions in biopolymers: Statistical mechanical theory of order-disorder transitions in biological macromolecules* (Academic Press, New York, 1970).
6. Нечипуренко Ю.Д., Семенов Д.А., Лавриненко И.А., Лагуткин Д.А., Генералов Е.А., Зайцева А.Ю., Матвеева О.В., Егоров Е.Е. *Патогенез COVID-19: роль ацидоза* // В сборнике: *Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции.* Москва, 2021. С. 247-256.
7. Nechipurenko Yu.D., Semyonov D.A., Lavrinenko I.A., Lagutkin D.A., Generalov E.A., Zaitceva A.Yu., Matveeva O.V., Yegorov Ye.E. *The role of acidosis in the pathogenesis of severe forms of COVID-19* // *Biology.* 2021. V. 10 (9) 852.
8. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Бучельников А.С., Нечипуренко Ю.Д., Кооперативное связывание кислорода гемоглобином как одна из обобщающих моделей в молекулярной биофизике // *Биофизика.* 2022. Т. 67 (3). С. 421-433.
9. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Нечипуренко Ю.Д. *Новая математическая модель, описывающая оксигенацию гемоглобина* // *Биофизика.* 2022. Т. 67 (3). С. 444-450.
10. Кантор Ч., Шиммель П. *Биофизическая химия* (Мир, М., 1984).
11. Wyman J., Gill S.J. *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules* (University Science Books, Mill Valley CA, 1990).
12. Нечипуренко Ю.Д., Бучельников А.С. *Связывание лигандов с нуклеиновыми кислотами в растворе и на микрочипах* // *Биофизика.* 2022. Т. 67 (3). С. 456-466.
13. Biddle J.W., Martinez-Corral R., Wong F., Gunawardena J. *Allosteric conformational ensembles have unlimited capacity for integrating information* // *eLife.* 2021. V. 10. e65498.
14. Kim S., Broströmer E., Xing D., Jin J. Chong S., Ge H., Wang S., Gu C., Yang L., Gao Y.Q., Su X.-D., Sun Y., Xie X.S. *Probing allostery through DNA* // *Science.* 2013. V. 339 (6121). P. 816-819.
15. Crothers D.M. *Fine tuning gene regulation* // *Science.* 2013. V. 339 (6121). P. 766-767.

**Сведения об авторах**

**Юрий Дмитриевич Нечипуренко,**  
 д.ф.-м.н., вед. науч. сотр.  
 Институт молекулярной биологии  
 им. В.А. Энгельгардта РАН  
 Москва, Россия  
 Севастопольский государственный университет  
 Севастополь, Россия  
**E-mail:** nech99@mail.ru

**Анатолий Сергеевич Бучельников,**  
 к.ф.-м.н., вед. науч. сотр.  
 Севастопольский государственный университет  
 Севастополь, Россия  
**E-mail:** tolybas@rambler.ru

**Игорь Андреевич Лавриненко,**  
 к.б.н., доц.  
 Воронежский государственный университет  
 Воронеж, Россия  
**E-mail:** lavrinenko\_ia@bio.vsu.ru

**Information about authors**

**Yury Dmitrievich Nechipurenko,**  
 D.F.-M.S., leading scientist,  
 V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology,  
 Moscow, Russia  
 Sevastopol State University  
 Sevastopol, Russia  
**E-mail:** nech99@mail.ru

**Anatoly Sergeevich Buchelnikov,**  
 PhD, leading scientist,  
 Sevastopol State University  
 Sevastopol, Russia  
**E-mail:** tolybas@rambler.ru

**Igor Andreevich Lavrinenko,**  
 PhD, associate professor,  
 Voronezh State University  
 Voronezh, Russia  
**E-mail:** lavrinenko\_ia@bio.vsu.ru

## СОПРЯЖЕННАЯ С ГЛОБИНАМИ ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ХОНДРОЦИТОВ

Показана возможность фотобиомодуляции поверхности хондроцитов кролика под действием лазерного излучения с параметрами, соответствующими спектральным и кинетическим характеристикам гуанилатциклазы, за счет локального перегрева, временно ассоциированного с мембранными кавеолами глобинового хромофора.

**Ключевые слова:** поверхность хондроцита, кавеолы, гуанилатциклаза, лазер, глобиновый хромофор, локальный перегрев.

Y. M. Alexandrovskaya, O. I. Baum,  
A. K. Dmitriev, O. A. Tiflova  
FRC "Crystallography and Photonics" RAS

## GLOBIN COUPLED PHOTOBIOMODULATION OF CHONDROCYTE SURFACE

*The possibility of photobiomodulation of the surface of rabbit chondrocytes under the action of laser radiation with the parameters appropriate for spectral and kinetic characteristics of guanylate cyclase via local overheating of the globin chromophore temporary associated with the caveolae of the membrane has been revealed.*

**Keywords:** chondrocyte surface, caveolae, guanylate cyclase, laser, globin chromophore, local overheating.

### Введение

Спектральные характеристики глобинов позволяют им служить эффективными акцепторами лазерного излучения видимого и ближнего инфракрасного диапазона в процессе лазерной фотобиомодуляции [1]. Предполагается, что поглощения света хромофорами способно приводить к их локальному перегреву – триггеру конформационных сдвигов необходимых для старта фотобиомодуляции [2]. Экспериментально показано, что при облучении гемоглобина лазерным излучением с соответствующими спектральными параметрами наблюдается существенный разогрев раствора [3]. Известно, что глобины эффективно взаимодействуют с биологическими мембранами [2, 4]. Термомодификация клеточных мембран, ассоциированных с перегретыми глобинами, открывает возможность лазерного управления механическими свойствами клеточной поверхности, способными модулировать синтетические и пролиферативные свойства клеток и тканей [5]. Показано, что участием активируемой NO гуанилатциклазы может быть обусловлено увеличение пролиферации хондроцитов [6]. Ранее нами была выявлена роль глобинов в лазерной фотобиомодуляции синтеза хондроцитами внеклеточного матрикса [1]. Свойство хондроцитов приспосабливаться к высоким механическим нагрузкам, которым подвергается хрящевая ткань [7], делает их удобной моделью для оценки вклада световой, тепловой и механической компоненты в лазерную модификацию поверхности клеточных мембран, способную модулировать межклеточную передачу информации на уровне процессинга микровезикул.

### Цель работы

Целью настоящей работы является исследование возможности лазерной модуляции динамических структур, определяющих микрорельеф поверхности клеток хондроцитов.

### Материалы и методы

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 (2мМ) и антибиотиков пенициллин/стрептомицина (50 мкг/мл) в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). 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.

Мониторинг пролиферации клеточной культуры хряща кролика в режиме реального времени проводился с использованием системы *xCELLigence* (*Roche Applied Sciences*). Основная часть системы – набор микроэлектронных клеточных датчиков, которые встроены в основание планшетов *E-plate* 16. Измерение электрического импеданса электродов позволяет отслеживать изменения, происходящие в клетках. Изменения импеданса происходят при прикреплении клеток к дну планшета *E-plate*, при изменении количества клеток или их размера.

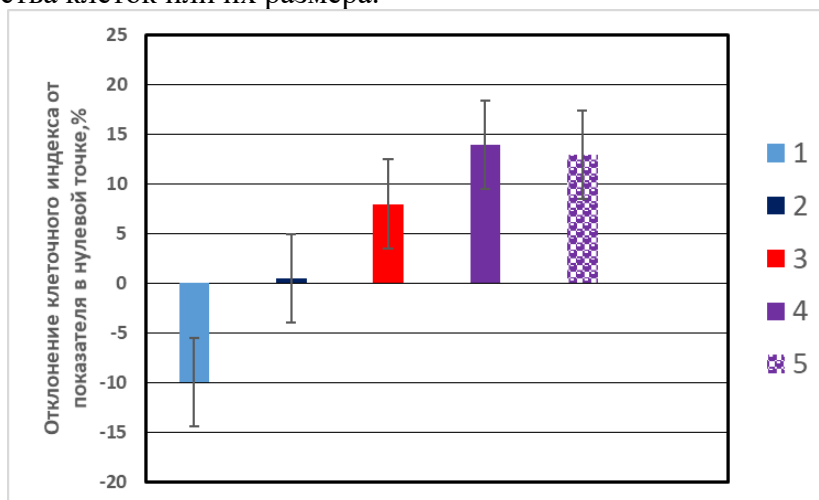


Рис. Зависимость эффективности фотобиомодуляции поверхности хондроцитов от источника лазерного излучения. На диаграмме представлены отклонения показателя клеточного индекса от нулевой точки для контрольных, необлученных образцов (1) и образцов облученных импульсным с длиной волны 890нм и частотой повторения импульсов 50Гц(2) или непрерывным красным с длиной волны 670нм (3), а также ближним инфракрасным с длиной волны 1560нм непрерывным (4) или импульсным с частотой повторения импульсов 1Гц (5) низкоинтенсивным лазерным излучением

Лазерное воздействие на клеточные культуры осуществлялось с помощью непрерывного с длиной волны 670нм или импульсного с частотой повторения импульсов 50 Гц с длиной волны 890нм полупроводниковых лазеров (Полус, РФ). Излучение эрбиевого волоконного лазера с длиной волны 1560нм применялось в непрерывном или импульсном режиме с частотой повторения импульсов 1Гц (*IPG Photonics, USA*). Облучение клеточных образцов проводилось по методике, подробно описанной ранее [1]. Плотность мощности низкоинтенсивного лазерного излучения составляла 0,3Вт/см<sup>2</sup>, время экспозиции 60с.

За день до эксперимента клеточная культура 0-го пассажа рассаживалась в два планшета *E-plate* 16 для измерения на *xCELLigence* в концентрации  $2 \cdot 10^4$  кл/лунка. На следующий день клетки подвергались лазерному воздействию различного режима. Непосредственно перед обработкой в планшетах сливали ростовую среду и добавляли в каждую лунку по 20 мкл ростовой среды, чтобы уровень жидкости в лунке составлял 1 мм. Обработка каждого планшета составляла ~ 30 минут. Негативный контроль – ростовая среда без клеток. Положительный контроль – интактные клетки.

После окончания воздействия к клеткам добавлялось по 80 мкл ростовой среды и планшеты ставились обратно на прибор *xCELLigence* для измерения пролиферации клеток в течение 4 суток. В течение первых суток интервал между замерах клеточного индекса составлял 2 минут, затем интервал был сменен на 15 минут. Каждый день проводилась смена ростовой среды. Нормировка осуществлялась на значение клеточного

индекса для каждой группы образцов в момент до облучения (нулевая точка). Представленные результаты отражают усредненные данные по крайней мере двух экспериментов.

### **Полученные результаты**

В наших экспериментах мы изучали влияние облучения культуры клеток хондроцитов низкоинтенсивным красным с длиной волны 670нм, а также ближним инфракрасным с длиной волны 1560нм непрерывным или импульсным с частотой повторения импульсов 1Гц, или импульсным с длиной волны 890нм и частотой повторения импульсов 50Гц лазерным излучением. Мы сравнивали измеряемый в автоматическом режиме клеточный индекс - показатель, отражающий величину площади контакта поверхности клеток хондроцитов с твердой инертной подложкой в нулевой точке – 17часов 30мин после высева, а также через 3 или 4 часа после облучения, предваряемого удалением среды, и пострadiационным добавлением свежей среды. Контрольные (необлученные) образцы инкубировали соответствующее время после смены среды. Клеточный индекс в нулевой точке до облучения и манипуляций со средой составлял в наших экспериментах  $2,3 \pm 0,1$

Как видно из данных, представленных на рисунке, через 3 часа после смены среды в контрольных образцах показатель снижается на 10%. В образцах, облученных импульсным излучением с длиной волны 890нм и частотой повторения импульсов 50Гц, величина, отражающая площадь контакта не снижается, а остается на уровне нулевой точки. Облучение непрерывным красным светом приводило к увеличению показателя на 8%. После воздействия непрерывного или импульсного инфракрасного излучения с длиной волны 1560нм увеличение площади контакта достигало 15%. В ходе дальнейшей инкубации показатель контрольных образцов возрастает, а облученных снижается. К 4 часам после облучения в контрольных и облученных образцах он сравнивается на уровне нулевой точки. При дальнейшей инкубации, как нами было показано ранее [8], наблюдается умеренная стимуляция роста облученных культур по сравнению с контролем. Таким образом, наблюдаемое нами увеличение суммарной площади, занимаемое облученными клетками, носит обратимый характер. По всей видимости, оно обусловлено не только превышением показателя числа клеток, оставшихся прикрепленными к подложке в облученных образцах по сравнению с необлученными. Вероятно, свой вклад в конечный эффект вносит и увеличение площади поверхности отдельных клеток в ответ на лазерную модуляцию клеточных мембран.

Лазерное излучение всех изученных в работе источников лежит в полосах поглощения окисленных форм глобинов, причем излучение с длинами волн 670 и 1560нм поглощаются глобинами в низкоспиновом состоянии, характерном для свободной формы глобинов [1, 2]. При образовании комплекса глобинов с липидами наблюдается переход в высокоспиновую форму, сопровождающийся сдвигом в спектре поглощения в синюю область спектра, в том числе и в диапазон вблизи 890нм. Результаты наших экспериментов показали, что такое излучение менее эффективно модулирует поверхность хондроцитов, что может указывать на фоторецепторную роль свободной формы глобинов хондроцитов. Учитывая наблюдаемую нами эффективность импульсного излучения, можно предположить, что поглощение света облегчает обратную ассоциацию хромофора с мембраной. Эффективная частота повторения импульсов 50Гц хорошо согласуется с константой скорости глобиновой гуанилатциклазы млекопитающих, которая под действием эндогенных или экзогенных активирующих факторов меняется в диапазоне  $25-400\text{с}^{-1}$  [9]. Этап медленной фазы взаимодействия глобиновой гуанилатциклазы с лигандами характеризуется константой скорости  $1\text{с}^{-1}$ , что согласуется с эффективной частотой повторения импульсов лазерного излучения с длиной волны 1560нм (Рис.). Таким образом, кинетические и спектральные характеристики гуанилатциклазы позволяют ей служить акцептором лазерного излучения. Показано, что активная форма глобиновой гуанилатциклазы может локализоваться в инвагинациях цитоплазматической мембраны - кавеолах [10]. Известно, что механическое воздействие в

определенном интервале величины и времени воздействия способно модулировать поверхность хондроцитов, нивелируя складчатые кавеоллярные структуры, площадь поверхности которых может составлять до 40 % общей поверхности клетки [11]. Проведенная нами количественная оценка размера клеток, точнее площади поверхности контакта хондроцита с подложкой, после воздействия лазерного излучения показала возможность лазерного управления микрорельефом хондроцитов. Лазерная модуляция поверхности хондроцитов носит кратковременный характер. Однако, она может вносить свой вклад в лазерную терапию остеоартрита, снижая вероятность образования из поверхностных структур клеток патологического очага микровезикул, индуцирующих воспаление и разрушение внеклеточного матрикса в окружающих здоровых участках хрящевой ткани [12].

#### **Выводы.**

Уровень лазерной фотобиомодуляции микрорельефа поверхности хондроцитов зависит от параметров низкоинтенсивного лазерного излучения в красной и ближней инфракрасной областях спектра.

1. Оптимальные параметры непрерывного и импульсного излучения соответствуют спектральным и кинетическим характеристикам ассоциированной с кавеолами глобиновой гуанилатциклазы.

2. Первичным этапом фотобиомодуляции поверхности клеточной мембраны может служить лазерная индукция локального перегрева глобинового хромофора.

#### **Заключение**

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

Предложен лазерный метод оценки динамики ответственной за процессинг микровезикул кавеоллярной структуры поверхности хондроцитов на основе селективного поглощения лазерного излучения эндогенными глобинами.

#### **Благодарности:**

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части «Исследование различных лазерных режимов на разных длинах волн с целью запуска пролиферации» и международного гранта РФФИ (с Российской стороны проект № 20-52-00041 Бел-а и с Белорусской стороны проект Ф20Р-071) в части «определение влияния временного режима воздействия на модуляцию поверхности хондроцитов».*

#### **Список литературы**

1. Alexandrovskaya Yu. M., Baum O.I., Shekhter A. B., Petersen E. V., Tiflova O. A., Dmitriev A. K., Ulyanov V. A., Svistushkin V. M., Selezneva L. V., Sobol E. N. Mechanisms of laser activation of chondrocytes in osteoarthritis healing // *Laser Physics Letters*. 2018. V. 15. №8. P. 085601-1 - 085601-8.
2. Tiflova O. A. 2020. *Laser Induction of Signal Networks in Adaptation and Regeneration: Investigation of the Contribution of Endogenous Photoreceptors and Thermoreceptors // Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 2020. V. 14(2). P. 316-317.
3. Брусничкин А.В. Недосекин Д.А. Рындина Е.С. Проскурнин М.А. Глеб Е.Ю. Владимиров Ю.А. Жаров В.П. Определение различных форм гемоглобина методом термолизинговой спектрометрии // *Вестник Московского Университета. Серия 2. Химия*. 2009. Т. 10. С. 55-66.
4. 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. С.

107-123.

5. Takeuchi, Y. Miyata, S. Dielectrophoretic Micro-Organization of Chondrocytes to Regenerate Mechanically Anisotropic Cartilaginous Tissue // *Micromachines*. 2021, V. 12 1098. <https://doi.org/10.3390/mi12091098>
6. Peake N, Su N, Ramachandran M, Achan P, Salter DM, Bader DL, Moyes AJ, Hobbs AJ, Chowdhury TT. Natriuretic peptide receptors regulate cytoprotective effects in a human ex vivo 3D/bioreactor model // *Arthritis Research Therapy*. 2013. V. 15(4). R76. doi: 10.1186/ar4253.
7. Liu Q, Hu X, Zhang X, Duan X., Yang P., Zhao F., Ao Y. Effects of mechanical stress on chondrocyte phenotype and chondrocyte extracellular matrix expression // *Scientific Reports*. 2016. V.6. 37268. doi:10.1038/srep37268
8. Александровская Ю.М. Баум О. И. Лазерная стимуляция клеток хрящевой ткани: термомеханическое и низкоинтенсивное воздействие // XXX Международная конференция «Лазеры в науке, технике и медицине», Москва, 2-4 октября 2019 г. Сборник научных трудов. 2019. Т. 30, под ред. В. А. Петрова. С. 156-160.
9. Kharitonov V. G. Sharma V.S. Magde D. Koesling D. Kinetics and equilibria of soluble guanylate cyclase ligation by CO: effect of YC-1 // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 10699-10706.
10. Tsai EJ, Liu Y, Koitabashi N, Bedja D, Danner T, Jasmin JF, Lisanti MP, Friebe A, Takimoto E, Kass DA. Pressure-overload-induced subcellular relocalization/oxidation of soluble guanylyl cyclase in the heart modulates enzyme stimulation // *Circulation Research*. 2012. V. 110(2). P. 295-303.
11. Moo EK, Amrein M, Epstein M, Duvall M, Abu Osman NA, Pinguan-Murphy B, Herzog W. The properties of chondrocyte membrane reservoirs and their role in impact-induced cell death // *Biophysical Journal*. 2013. V. 105(7). P. 1590-600.
12. Miyaki S. and Lotz M.K. Extracellular vesicles in cartilage homeostasis and osteoarthritis // *Current Opinion Rheumatology*. 2018. V. 30(1). P. 129-135.

**Сведения об авторах**

**Юлия Михайловна Александровская,**

к.н., старший научный сотрудник  
ИФТ ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН  
Москва, Россия

**e-mail:** [yu.alexandrovskaya@gmail.com](mailto:yu.alexandrovskaya@gmail.com)

**Ольга Игоревна Баум,**

доктор наук,  
зав.лабораторией  
ИФТ ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН  
Москва, Россия

**e-mail:** [baumolga@gmail.com](mailto:baumolga@gmail.com)

**Александр Константинович Дмитриев,**

науч. сотр.  
ИФТ ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН  
Москва, Россия

**e-mail:** [dmitriev\\_a62@mail.ru](mailto:dmitriev_a62@mail.ru)

**Ольга Антоновна Тифлова,**

кбн, с.н.с.  
ИФТ ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН  
Москва, Россия

**e-mail:** [olantp@gmail.com](mailto:olantp@gmail.com)

**Information about authors**

**Yulia Michalovna Alexandrovskaya,**

candidate of sciences, senior researcher,  
FRC "Crystallography and Photonics" RAS  
Moscow, Russia

**e-mail:** [yu.alexandrovskaya@gmail.com](mailto:yu.alexandrovskaya@gmail.com)

**Olga Igorevna Baum,**

doctor of sciences  
Head of Biophotonics Laboratory,  
FRC "Crystallography and Photonics" RAS  
Moscow, Russia

**e-mail:** [baumolga@gmail.com](mailto:baumolga@gmail.com)

**Alexandr Konstantinovich Dmitriev, re-**

searcher,  
FRC "Crystallography and Photonics" RAS  
Moscow, Russia

**e-mail:** [dmitriev\\_a62@mail.ru](mailto:dmitriev_a62@mail.ru)

**Olga Antonovna Tiflova,**

candidate of sciences, senior researcher,  
FRC "Crystallography and Photonics" RAS  
Moscow, Russia

**e-mail:** [olantp@gmail.com](mailto:olantp@gmail.com)

**Na,K-ГОМЕОСТАЗ В ЭПИДЕРМИСЕ КАК ФЕНОМЕН  
САМООРГАНИЗОВАННОЙ КРИТИЧНОСТИ**

*С помощью атомно-эмиссионной спектроскопии измеряли содержание натрия (Na) и калия (K) в деривате эпидермиса (волосы) у здоровых лиц (9991 чел.). По данным спектроскопии были сформированы 4 группы в зависимости от величины Na/K-отношения: 1 группа – Na/K < 1 (n=1834); 2-я – Na/K от 1 до 5 (n=6884); 3-я – Na/K от 5 до 10 (n=893) и 4-я – Na/K > 10 (n=380). Проведен корреляционный анализ (Pearson) тесноты K-Na связи в общей выборке (n=9991) и в каждой из групп с различными значениями Na/K. Обнаружено, что коэффициент корреляции  $r$  в общей выборке ( $r_{K-Na} = 0,61$ ;  $p < 0,05$ ) был заметно ниже, чем в любой из сформированных групп ( $r_{K-Na} = 0,85-0,97$ ;  $p < 0,05$ ). Установлено также, что снижение  $r_{K-Na}$  вызвано присутствием в общей выборке данных спектроскопии с Na/K < 1 (1 группа).*

**Ключевые слова:** металло-лигандный гомеостаз (МЛГ), самоорганизованная критичность, эпидермис, корреляционный анализ.

Valery I. Petukhov, Egor V. Dmitriev

International Baltic Academy  
Institute of Computational Mathematics of the RAS

**Na,K-HOMEOSTASIS IN THE EPIDERMIS AS A PHENOMENON OF SELF-ORGANIZED CRITICALITY**

*Using atomic emission spectrometry, the content of sodium (Na) and potassium (K) in the epidermal derivative (hair) was measured in healthy individuals (9991 people). According to the spectrometry data, 4 groups were formed depending on the Na/K ratio: group 1 - Na/K < 1 (n=1834); 2nd - Na/K from 1 to 5 (n=6884); 3rd – Na/K from 5 to 10 (n=893) and 4th – Na/K > 10 (n=380). A correlation analysis (Pearson) of the tightness of the K-Na connection was carried out in the total sample (n=9991) and in each of the groups with different Na/K values. It was found that the correlation coefficient  $r$  in the total sample ( $r_{K-Na} = 0.61$ ;  $p < 0.05$ ) was noticeably lower than in any of the formed groups ( $r_{K-Na} = 0.85-0.97$ ;  $p < 0.05$ ). It was also established that the decrease in  $r_{K-Na}$  was caused by the presence of spectrometry data with Na/K < 1 (group 1) in the total sample.*

**Keywords:** metal-ligand homeostasis (MLH), self-organized criticality, epidermis, correlation analysis.

**Введение**

Ранее нами были получены доказательства принадлежности гомеостаза электрогенных металлов (K, Na, Ca) в деривате эпидермиса (волосы) к числу феноменов самоорганизованной критичности (СК)[1, 2]. Об этом свидетельствовали: а) степенная зависимость между содержанием K, Na и Ca в эпидермисе и числом индивидов в определенных интервалах концентрационных значений; б) фрактальный характер распределения данных спектроскопии этих металлов в эпидермисе; в) синхронный (критический) характер работы  $Na^+/K^+$ -АТФазы – основного транспортёра ионов  $Na^+$  и  $K^+$  через клеточную мембрану.

Вывод о возможности синхронного (критического) функционирования  $Na^+/K^+$ -АТФазы был сделан нами после того, как была выявлена (по данным спектроскопии) достоверная и стойкая линейная связь (Pearson) между концентрационными значениями Na и K в волосах [3].

Однако коэффициент  $r_{K-Na}$ , который колебался от 0,6 до 0,7 в разных выборках, показался нам слишком «скромным» для синхронной («как единый механизм») работы

мембранных помп. Этот показатель мог бы, по-видимому, быть существенно выше, если речь идёт о критических процессах. Поэтому мы решили выяснить, что же способствует (прямо или косвенно) вероятному «занижению» уровня  $r_{K-Na}$ .

Известно, что одним из важных параметров гомеостаза натрия и калия в организме человека является соотношение концентраций  $[Na^+]$  и  $[K^+]$  в клетке и во внеклеточной среде. В норме при объёме воды внутри клеток 28 л (а в целом организме – 42 л) внутриклеточное содержание калия составляет 110 ммоль/л, тогда как вне клетки – всего 4 ммоль/л. Распределение натрия (при тех же условиях) носит противоположный характер: вне клетки – 135 ммоль/л, а внутри её – всего 10 ммоль/л Na [4]. Исходя из этих цифр суммарное (внутри и вне клетки) отношение  $[Na^+]/[K^+]$  в целом организме равно ~1,3. Показательно, что величина отношения средних значений  $[Na]$  и  $[K]$  (bootstrap-метод) в таком субстрате, как волосы у 947 здоровых лиц, по нашим данным, было практически идентичным – 1,5 [1].

В то же время при спектрометрии эпидермиса (волосы) мы наблюдали выраженный разброс индивидуальных концентрационных значений металлов: натрия от 0,645 мкг/г до 9240 мкг/г; а калия от 0,045 до 6505,1 мкг/г [2], что допускает существование разброса и среди индивидуальных значений  $[Na]/[K]$ -отношения.

Вместе с тем нельзя исключить связь  $[Na]/[K]$ -отношения с критическим (синхронным) режимом работы мембранных  $Na^+/K^+$ -АТФаз. Чтобы подтвердить или отвергнуть такую возможность, был сделан анализ корреляционных связей между  $[Na]$  и  $[K]$  в зависимости от величины  $[Na]/[K]$ . Результаты этого анализа представлены в настоящей работе.

### Цель работы

Выяснить возможную зависимость тесноты Na-K связи (Pearson) от величины  $[Na]/[K]$ -отношения.

### Материалы и методы

Определение содержания натрия (Na) и калия (K) в волосах были сделано в лаборатории Центра биотической медицины (Москва), используя с этой целью масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) на спектрометре NexION 300D (Perkin Elmer Inc., Shelton, CT, USA). Результаты измерений были любезно переданы авторам данной работы для дальнейшего анализа. Под наблюдением находились практически здоровые жители Москвы в возрасте от 20 до 49 лет (n=9991). Среди них 4999 (50,04%) мужчин и 4992 (49,96%) женщин. Получение образца волос для спектрометрического исследования происходило с обязательного добровольного согласия исследуемого. Технические подробности спектрометрии волос можно найти в наших предыдущих публикациях [1, 2, 3].

Был проведен корреляционный анализ (Pearson) полученных данных с нахождением коэффициента корреляции  $r_{K-Na}$  (парные корреляции между концентрационными значениями  $[K]$  и  $[Na]$  в субстрате). Проверку гипотезы о нормальном распределении проводили с помощью теста Jarque-Bera [5] и теста Kolmogorov-Smirnov [6]. В результате этой проверки удалось с большой вероятностью опровергнуть гипотезу о нормальном распределении этих металлов. Поэтому применялся альтернативный подход (bootstrap method), не требующий нормального распределения априорного ансамбля [7]. Пакет компьютерных программ Matlab использовался для статистической обработки данных.

### Полученные результаты

Распределение индивидов в зависимости от величины  $[Na]/[K]$ -отношения было следующим:  $[Na]/[K] < 1$  выявлено у 1834 чел. (18,4%);  $[Na]/[K]$  от 1 до 5 у 6884 чел. (68,9%);  $[Na]/[K]$  от 5 до 10 у 893 чел. (8,9%);  $[Na]/[K] > 10$  у 380 чел. (3,8%). Был найден коэффициент корреляции  $r$  (Pearson) между  $[Na]$  и  $[K]$  в каждой из этих групп. Полученные результаты представлены в табл. 1.



Таблица 1. Коэффициент корреляции  $r_{K-Na}$  при разных значениях Na/K

Показатели	Подгруппы с разными коэффициентами Na/K				Общая группа
	1	2	3	4	
	Na/K < 1	Na/K (1-5)	Na/K (5-10)	Na/K > 10	
$n$ (%)	1834 (18,4)	6884 (68,9)	893 (8,9)	380 (3,8)	9991 (100)
$r_{K-Na}$	0,86	0,87	0,98	0,90	0,61

Как следует из таблицы 1, значения коэффициента  $r$  во всех четырёх подгруппах (независимо от величины [Na]/[K]-отношения) были выше, чем в общей группе.

Было интересно узнать, какой из представленных фрагментов общей выборки в большей степени (чем остальные) способствует “занижению”  $r$  в генеральной совокупности. Наибольшие “подозрения” на этот счёт вызывала 1 подгруппа с [Na]/[K]-коэффициентом <1, что принципиально отличало её от всех остальных. Поэтому мы решили выяснить, как влияет на величину коэффициента  $r$  наличие 1-ой подгруппы в общей выборке, а также сочетание 1-ой подгруппы с каждой из подгрупп и с их комбинациями (см. табл. 2)

Таблица 2. Коэффициент корреляции  $r_{K-Na}$  в комбинированных группах

Параметры	Комбинации подгрупп с разными коэффициентами Na/K									
	1+2	1+3	1+2+3	1+2+4	1+3+4	1+4	2+3+4	2+3	2+4	3+4
$n$ (%)	8718 (87,3)	2727 (27,3)	9611 (96,2)	9098 (91,1)	3107 (31,1)	2214 (22,2)	8157 (81,6)	7777 (77,8)	7264 (72,7)	1273 (12,7)
$r_{K-Na}$ ( $p < 0,05$ )	0,69	0,52	0,66	0,64	0,40	0,47	0,79	0,84	0,81	0,98

Показательно, что добавление 1-ой подгруппы (с Na/K <1) к каждой из трёх остальных (по отдельности и в различных сочетаниях, см. табл. 2) приводило к заметному (почти вдвое) снижению величины  $r_{K-Na}$ . Эта закономерность выглядит не случайной. Вполне вероятно, что именно присутствием в общей выборке индивидов с Na/K <1 (1 подгруппа) объясняется неожиданно “скромная” (всего 0,61) величина  $r_{K-Na}$  для генеральной совокупности.

Синхронный (критический) режим работы  $Na^+/K^+$ -АТФаз, как мы отмечали ранее, закономерно сочетается с высоким уровнем  $r_{K-Na}$ . Интересно, что величина этого показателя в самой 1-ой подгруппе ( $r_{K-Na} = 0,86$ ;  $p < 0,05$ ) убедительно свидетельствовала о синхронной работе  $Na^+/K^+$ -помп у индивидов с “инвертированным” Na/K-коэффициентом (<1). Это делает необходимым дальнейшее изучение возможных причин такого эффекта. В этой связи представлял интерес уровень Na и K в биосубстрате (волосы) в зависимости от величины Na/K-отношения.

С помощью *bootstrap*-метода [7], не требующего нормального распределения априорного ансамбля, были найдены средние и интервальные значения этих металлов по данным спектрометрии волос. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Интервальная оценка среднего содержания Na и K в эпидермисе при разных значениях Na/K

Параметр	Интервальная оценка средней в разных по Na/K подгруппах (мкг/г)			
	1	2	3	4
	Na/K < 1	Na/K (1-5)	Na/K (5-10)	Na/K > 10
<i>n</i>	1834	6884	893	380
[Na]	208,9< <b>223,4</b> <238,2	249,4< <b>260,6</b> <272,4	307,4< <b>347</b> <390,5	454,5< <b>539,4</b> <635,4
[K]	359,5< <b>384,8</b> <410,4	122< <b>127,5</b> <133,5	46,5< <b>52,4</b> <58,9	27,2< <b>32,7</b> <39,3
Na/K	0,64< <b>0,65</b> <0,66	2,29< <b>2,32</b> <2,35	6,7< <b>6,8</b> <6,9	20< <b>22,6</b> <25,8

**Примечание:** достоверность межгруппового различия средних значений [Na] и [K] ( $p < 0,05$ )

Полученные результаты (табл. 3) свидетельствуют о заметной вариабельности Na/K-отношения (в среднем) от 0,65 до 22,6. Средние значения [Na] и [K] также имели достоверные различия между подгруппами. Минимальный средний уровень у натрия (223,4 мкг/г) был в 1-ой подгруппе, максимальный (539,4 мкг/г) – в 4-ой; тогда как у калия средний минимум (32,7 мкг/г) в 4-ой, а максимум (384,8 мкг/г) – в 1-ой подгруппе.

Не очень понятно, почему присутствие в общей выборке 1-ой группы ( $[Na]/[K] < 1$ ) вызывает заметное снижение тесноты связи между [Na] и [K], хотя в самой группе  $r_{K-Na}$  оказался высоким (0,86; см. табл. 1). Одно из возможных объяснений этого “несоответствия” может быть следующим.

Как уже говорилось,  $[Na]/[K]$ -отношение для всего организма, составляет ~1,3 с преимущественной локализацией натрия во внеклеточном пространстве, а калия – внутри клетки [4]. Обеспечивает такое распределение главная мембранная помпа -  $Na^+/K^+$ -АТРаза, работающая против электрохимического градиента этих металлов, под действием которого ионы  $Na^+$  стремятся попасть в клетку, а ионы  $K^+$  - покинуть её. Важной особенностью работы  $Na^+/K^+$ -АТРаза является её способность (за единицу времени) выводить из клетки больше ионов  $Na^+$ , чем ионов  $K^+$ , которые эта помпа успевает “закачать” в клетку. Кстати, именно этим объясняется существование и относительное постоянство мембранного потенциала.

Найденное нами ранее (по средним значениям) соотношение [Na] и [K] в таком биосубстрате, как волосы, было 1,5 [1], т.е. почти не отличалось от такового для организма в целом (1,3). И казалось, именно такое (с преобладанием Na) распределение указанных металлов в эпидермисе (будучи нормативным) должно обнаруживаться у всех без исключения здоровых лиц. Однако полученные данные это не подтверждают. У 18,4% здоровых индивидов (1 подгруппа, табл. 1)  $[Na]/[K]$  было  $< 1$  (в среднем 0,65). И именно присутствием этой подгруппы в генеральной совокупности объясняется заметное снижение  $r_{K-Na}$  (до 0,61), по сравнению с тем же параметром в отдельных фракциях и его средним значением ( $r_{K-Na} = 0,9$ ). Это обстоятельство не позволяет исключить возможность реверсионных изменений в работе  $Na^+/K^+$ -АТРаза эпидермиса: замена при  $[Na]/[K] < 1$  (1 группа) наружного электрохимического натриевого «подпора», присущего большинству индивидов, на калиевый. Интересно, что подобная реверсия (в связи с изменением мембранного потенциала и содержания в клетке натрия и кальция) происходит работе натрий-кальциевого обменника (NCX) [8].

### Выводы

1. Полученные результаты позволяют допустить у индивидов с  $[Na]/[K] < 1$  изменение направления электрохимического градиента ионов  $Na^+$  и  $K^+$  или, другими словами, реверсию насосной функции  $Na^+/K^+$ -АТРаза (“откачивание” из клетки ионов  $K^+$  и “закачивание” ионов  $Na^+$ ). При этом известная пропорция ионообмена для данной помпы (3 иона  $Na^+$  vs 2 иона  $K^+$ ) может сохраняться.

2. Причины технического характера, которые бы объясняли снижение уровня натрия в биосубстрате (условия хранения образца и/или его обработка), конечно, нельзя полностью исключить. Однако они представляются менее вероятными из-за высокого

(0,86) уровне  $r_{K-Na}$  у индивидов с  $[Na]/[K] < 1$  (табл. 1).

3. Результаты исследований убеждают нас в том, что спектрометрия волос на содержание металлов (Na и K) не отражает изменения в МЛГ на уровне всего организма и не позволяет судить о достаточной *обеспеченности* и/или об опасном дефиците/переизбытке этих металлов. Разброс индивидуальных значений  $[Na]$  и  $[K]$  в волосах, о котором мы уже упоминали, впечатляет:  $[Na]$  – от 0,645 мкг/г до 9240 мкг/г;  $[K]$  – от 0,045 до 6505,1 мкг/г. Напомним, что все измерения проводились у *практически здоровых* лиц с отсутствием у них какой-либо патологической симптоматики.

#### **Заключение**

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

Присутствие в общей выборке индивидов с  $[Na]/[K] < 1$  уменьшает в  $\sim 1,5$  раза тесноту Na-K связи (Pearson) между концентрационными значениями этих металлов в волосах, что необходимо учитывать для объективной оценки уровня синхронизации в работе мембранных Na,K-помп.

Нельзя не затронуть ещё один аспект Na,K-гомеостаза по материалам исследования. Речь идёт о диагностической ценности спектрометрии этих металлов в волосах и возможности экстраполяции результатов измерения на организм в целом. Во избежание неоправданных обобщений при спектрометрии волос, изменения в Na,K-гомеостазе следует относить только к данному субстрату (волосы).

#### **Благодарность**

*Авторы статьи выражают признательность сотрудникам Центра биотической медицины (г. Москва) А.В. Скальному и А.Р. Грабеклису за предоставление данных спектрометрического анализа волос.*

#### **Список литературы**

1. Petukhov V.I., Dmitriev E.V., Baumane L.Kh., Skalny A.V., and Lobanova Yu.N. *Electrogenic metals in epidermis: relationship with cell bioenergetics // Insights in Biomed.* 2016. No. 1(2). P. 9-14.
2. Petukhov V.I. *What are the limits, if any, of normal content of electrogenic metals (K, Na, Ca) in epidermis? // Insights Biomed.* 2017. No. 2(2). P. 13-17.
3. Petukhov V.I., Dmitriev E.V., Kalvinsh I., Baumane L.Kh., Reste E.D., et al. *Metal-ligand homeostasis in epidermic cells of Chernobyl accident liquidators // Vitamins & Trace Elements.* 2011. No. 1(2). P. 1-8.
4. Маршалл В.Дж. // *Клиническая биохимия.* 2000. М. Спб.: «БИНОМ» – «Невский диалект». 368 с.
5. Bera A.K., and Jarque C.M. *Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals // Economics Letters.* 1980. No. 6 (3). P. 255–259.
6. Lilliefors H. *On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown // Journal of the American Statistical Association.* 1967. No. 62 (318). P. 399-402.
7. Davison A.C, Hinkley V.D. // *Bootstrap methods and their application.* 1997. Cambridge University. UK.
8. Nicholls J.G., Martin A.R., Wallace B.G., Fuchs P.A. // *From Neuron to Brain.* 2001. Sinauer Associates. Inc., Publ., Sunderland, Massachusetts, 672 p.

#### **Сведения об авторах**

**Валерий Иванович Петухов,**

*д-р мед. наук, профессор*

*Балтийская международная академия LV-1003*

*г. Рига, Латвия, E-mail: vip-val@yandex.ru*

**Егор Владимирович Дмитриев,**

*канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник*

*Институт вычислительной математики Российской академии наук, Москва, Россия*

*E-mail: yegor@inm.ras.ru*

#### **Information about authors**

**Valery I. Petukhov,**

*Ph.D., professor,*

*International Baltic Academy*

*Riga, Latvia, E-mail: vip-val@yandex.ru*

**Egor V. Dmitriev,**

*Ph.D., senior researcher,*

*Institute of Computational Mathematics of the RAS Moscow, Russia*

*E-mail: yegor@inm.ras.ru*

УДК 544.1 + 546.72-06 + 546.72 + 548.3  
ГРНТИ 31.15.15, 31.27.27, 31.17.15, 31.15.17,  
76.29.29  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.272-276

**Н. А. Санина**  
ФГБУН Институт проблем химической физики  
Российской академии наук (ИПХФ РАН)

## **ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА В ХИМИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

*В статье представлены теоретические и экспериментальные данные исследований низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа - доноров оксида азота (NO), обладающих избирательной токсичностью по отношению к опухолям головного мозга.*

**Ключевые слова:** монооксид азота, динитрозильные комплексы железа, рентгеноструктурный анализ, ТДДФТ, ЭПР-спектроскопия, амперометрия, электрораспылительная масс-спектрометрия, МТТ-анализ, проточная цитометрия.

**Nataliya A. Sanina**  
Institute for Problems of Chemical Physics of the  
Russian Academy of Sciences

## **NITRIC OXIDE DONORS IN CHEMOTHERAPY OF BRAIN TUMORS**

*The paper presents theoretic and experimental data of studies of low-molecular-weight iron dinitrosyl complexes as nitric oxide (NO) donors with selective toxicity to brain tumors.*

**Key words:** nitrogen monoxide, dinitrosyl iron complexes, X-ray structural analysis, TDDFT, EPR spectroscopy, amperometry, electrospray mass spectrometry, MTT assay, Flow cytometry

### **Введение**

По данным Международного агентства по исследованию рака [1] при участии Всемирной Организации Здравоохранения, объединяющего данные из 86 раковых регистров 5 континентов, заболеваемость первичными опухолями головного мозга, включая менингиомы, составляет 6-19 случаев на 100 тысяч мужского и 4-18 случаев на 100 тысяч женского населения. В 2020 году в мире, согласно данным [2], было зарегистрировано 330000 случаев заболевания раком центральной нервной системы (ЦНС) и 227000 случаев смерти. Стандартизированные по возрасту показатели заболеваемости раком ЦНС в мире увеличились на 17,3% в период 2010-2020 гг. При этом наблюдались значительные различия в заболеваемости по регионам: общая заболеваемость злокачественными опухолями головного мозга на 100 тысяч человеко-лет в США составила 5,74. Самая низкая заболеваемость в Юго-Восточной Азии (2,55), Индии (2,85) и Восточной Азии (3,07). Самая высокая заболеваемость наблюдалась в Северной Европе (6,59) и Канаде (6,53). Среднегодовой уровень смертности в США, связанный с первичными злокачественными опухолями головного мозга и опухолей ЦНС в период 2010 - 2020 гг. составил 5,57 на 100 тыс. человек. Пятилетняя относительная выживаемость в США после постановки диагноза первичной злокачественной опухоли головного мозга и опухолей ЦНС составляет 33,8% для мужчин и 36,4% для женщин (данные за 2000–2020 годы). Приблизительно 9000 пациентов диагностируются с первичной опухолью головного мозга каждый год в Великобритании: и 16000 пациентов страдают от метастазирования головного мозга из других первичных мест, что составляет в общей сложности около 25 000 пациентов в год. В Великобритании более 102 000 человек живут с опухолью головного мозга и только 14% пациентов с первичным раком мозга еще живы через 10 лет после постановки диагноза [3].

Значительная разница в заболеваемости в азиатских и европейских популяциях указывает на возможное влияние предков или факторов окружающей среды на злокачественные опухоли головного мозга.

Официальные статистические данные в РФ по заболеваемости первичными опухолями ЦНС, согласно данным государственной медицинской статистики, представленной Российским Центром информационных технологий и эпидемиологических

исследований в области онкологии Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена «Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность)» согласно [4], составили в 2020 году, в среднем, 5,75 случая на 100 тысяч населения, по сравнению с 5,11 случаями в 2010г.). Прирост составил 19,67%. Абсолютное число новых диагнозов злокачественных новообразований мозга и др. отделов ЦНС в 2020 году составило 8416 человек, в том числе 527 детей в возрасте 0-17 лет. Смертность от злокачественных новообразований мозга и др. отделов ЦНС в 2020 году составило 7916 человек, из них детей возраста 0-17 лет - 260 случаев. Средний возраст умерших взрослых - 59,6 лет, их них у мужчин - 57,1 у женщин -62,0 (для сравнения: в 2010г. – 56,1 лет, их них у мужчин -54,2, у женщин - 57,0 лет).

Первичные злокачественные опухоли головного мозга и другие опухоли ЦНС встречаются редко (например, на их долю приходится 1,4% новых диагнозов рака в Соединенных Штатах и 2,7% случаев смерти от рака). Прогноз излечения и выживаемости при первичных опухолях головного мозга (в онкологии принято оценивать пятилетнюю выживаемость) напрямую зависят от возраста пациента, его общего состояния, а также типа раковых клеток и других факторов. Статистика выживаемости в течение пяти лет варьируется от 66% для молодого возраста (от новорожденности до 19 лет) и до 5% для пожилых (75 лет и старше). При эпендимомах и олигодендроглиомах 5-летний прогноз выживаемости благоприятный: 85% и 81% пациентов в возрасте 20-44 лет, 69% и 45% пациентов в возрасте 55-64 лет. При мультиформной глиобластоме: в течение пяти лет выживает 13% пациентов в возрасте 20-44 лет и 1% пациентов в возрасте 55-64 лет. Кроме первичных опухолей головного мозга существуют вторичные (метастазы). Наиболее часто метастазируют в головной мозг образования легкого, молочной железы, почки, носоглотки и толстой кишки, опухоли без выявленного первичного очага и меланомы. Приведенная выше статистика в РФ касается только первичных опухолей мозга. В последние годы отмечается рост частоты диагностируемых опухолей головного мозга, в том числе вторичных (метастазов). Точная статистика заболеваемости вторичными опухолями головного мозга неизвестна, на сегодняшний день ее оценивают примерно в 30 случаев на 100 тыс. населения в год.

Различные формы рака головного мозга являются относительно редкими по сравнению с другими типами рака (рака груди, простаты или кишечника), однако все из них являются крайне агрессивными и опасными для человека. Приобретение такого рака в большинстве случаев ведет к быстрой гибели пациента из-за сложностей в применении химиотерапии или невозможности хирургического вмешательства. Рак мозга чаще всего поражает детей, а не взрослых, и только один из нескольких подвидов этих опухолей, глиобластома, является причиной 15% смертей от рака среди младенцев. До сих пор нет средств, которые могли бы предотвратить развитие этих опухолей и при этом не вызвать массовую гибель здоровых клеток мозга.

Несмотря на то, что существует около 120 различных типов опухолей головного мозга, наиболее распространенными являются глиомы, менингиома и метастазы из внечерепных участков, таких как грудь, легкие, почки и кожа. Рак головного мозга (глиомы, глиальные новообразования, развиваются из нейроэпителиальных (глиальных) клеток, которые входят в состав ткани головного мозга) наиболее распространен. Глиальные клетки можно разделить на 4 основных типа: клетки эпендимы, микроглии, олигодендроциты и астроциты. Эпендимомы (II степени злокачественности) составляют около 8 % всех первично возникающих новообразований рака мозга: чаще всего этой формой заболевают дети и подростки, второй возрастной пик – в 30 – 40 лет. Олигодендроглиомой болеют взрослые люди 40 – 60 лет, иногда она обнаруживается в детстве. Это рак низкого потенциала злокачественности, имеет лучший прогноз течения. Среди глиом в 60 % наблюдений встречаются астроцитомы, которые бывают четырех основных типов (ограниченная астроцитома, диффузная астроцитома, анапластическая астроцитома и мультиформная глиобластома).

Мультиформная глиобластома (*Glioblastoma multiforme (GBM)*) является наиболее

распространенной первичной злокачественной опухолью головного мозга. Это чрезвычайно агрессивная форма рака, происходящая из нейральных стволовых клеток, астроцитов или олигодендроцитов. Глиобластомы имеют заболеваемость 3,19 случаев на 100 000 человек и имеют 5-летнюю выживаемость 6,7%.

Несмотря на доступные в настоящее время методы лечения, средняя выживаемость от агрессивных форм рака головного мозга сохраняется - приблизительно 1,5 года после постановки диагноза. Крайне важно разработать новые и более эффективные методы лечения больных раком мозга. Только 6,2% из тех, у кого диагностирована опухоль мозга включены в клинические испытания по сравнению (в среднем 17,7%) со всеми основными видами рака. 35,6 млн. фунтов стерлингов было выделено только в период 2017-2018 гг. крупнейшим целевым спонсором исследований опухолей головного мозга в мире в рамках британской программы «*A Cure Can't Wait*».

Обычные методы лечения мультиформной глиобластомы - это хирургическое удаление опухолевой массы с последующей лучевой терапией. Лучевая терапия продолжает играть главную роль в лечении злокачественных глиом, но эти опухоли часто являются радиорезистентными. Комбинация химиотерапии с вышеописанными методами дает улучшения в показателях выживаемости некоторых видов опухолей мозга [5,6].

Химиотерапия обычно используется адьювантно после операции или лучевой терапии, а также при неоперабельных и рецидивных опухолях, и увеличивает длительность периода без прогрессирования у больных с глиомами [7]. В качестве цитостатиков используются такие препараты как темозоломид (Темодал), прокарбазин (Натулан), нитрозопроизводные - ломустин (*CCNU*), кармустин (*BCNU*), нимустин (*ACNU*, Нидран), фотемустин (Мюстофоран), дикарбазин (ДТИК), а также иринотекан, этопозид, тенипозид, винкристин, цисплатин, карбоплатин и паклитаксел. Эффективность химиотерапии, по данным литературы, колеблется от 20% до 60 %. При этом, лечение обычно проводят на фоне активной дегидратации с использованием кортикостероидов (дексаметазона).

Прогноз у больных определяется стадией заболевания, возрастом и состоянием больного, а также степенью выраженности неврологических нарушений, в последние годы показана зависимость выживаемости больных со злокачественными глиомами от молекулярно-генетических факторов: статуса метилгуанинметилтрансферазы (*MGMT*) и экспрессии эпидермального фактора роста (*EGFR*) в опухоли. Наиболее благоприятный прогноз имеют больные со злокачественными глиомами с Об-метилованием *MGMT* и отсутствием экспрессии *EGFR*. Медиана выживаемости у больных с глиобластомами (глиомы IV степени злокачественности) без лечения составляет 3-6 мес., при хирургическом лечении – 6-9 месяцев; при сочетании хирургического лечения с лучевой терапией – 9-12 месяцев; а при комплексном лечении (операция с последующей лучевой терапией и химиотерапией темозоломидом) – 15-18 месяцев.

Таким образом, у современных стратегий лечения есть много ограничений из-за нескольких механизмов резистентности, варьирующихся от низких концентраций химиотерапевтических препаратов, пересекающих гематоэнцефалический барьер, до повышенного риска устойчивости к темозоломиду. Новые варианты лечения, а также понимание молекулярно-генетических механизмов развития *GBM* при воздействии новых химиотерапевтических агентов, необходимы для улучшения клинического исхода пациентов с *GBM*. В последние годы для преодоления этих ограничений активно разрабатываются новые методы лечения и системы доставки [8].

Одним из таких новых подходов может стать использование соединений - доноров оксида азота. Оксид азота (NO), как известно, представляет собой короткоживущую вездесущую сигнальную молекулу, которая влияет на многочисленные критические функции в организме [9]. Действие NO зависит от множества аспектов, включая вид ткани и количество его локального образования, окислительно-восстановительную среду, в которой NO образуется, присутствие сигнальных молекул, регулируемых NO, микроокружение опухоли и пр. Существует устойчивое мнение, основанное на многочисленных экспериментальных доказательствах, что соединения - доноры NO

представляют перспективные средства для химиотерапии рака, поскольку они могут ингибировать прогрессирование опухоли либо непосредственно, либо посредством модуляции активности других противоопухолевых соединений [10].

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются «рабочей формой» NO в физиологических условиях [11], и в этой связи в последние годы возникло целое направление - бионеорганическая инженерия фрагмента  $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$  для разработки новых миметиков ДНКЖ как химико-биологического инструмента для контролируемой доставки NO [12] и перевода функций, связанных с NO, в биомедицинские приложения [13,14]. Миметики ДНКЖ исследовались для антивозрастной, противовоспалительной, противовирусной, антигипертензивной терапии и, модуляции заживления ран, эрекции полового члена и ангиогенеза при диабете, лечения легких когнитивных нарушений и нейродегенеративных заболеваний. Применение их в NO-химиотерапии злокачественных опухолей представляет особый интерес [15,16].

**Цель работы** состояла в разработке методов синтеза и исследовании свойств новых малотоксичных миметиков ДНКЖ в твердой фазе и в растворах, включая теоретическое и экспериментальное исследование их противоопухолевой (в том числе, противоглиомной) активности.

### **Материалы и методы**

Солевые формы ДНКЖ, как менее токсичные и более биодоступные комплексы этого семейства, были синтезированы впервые в ИПХФ РАН с использованием тиопроизводных азотистых оснований и алифатических тиомочевин. ДНКЖ исследованы методами РСА, ИК ЯГР, ЭПР спектроскопии, амперометрии и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением в твердой фазе и в растворах. Исследование их цитотоксического действия выполнялось на опухолевых клетках человека различного генеза с использованием методов МТТ-тестирования, проточной цитометрии и экспериментальных животных в Центре скрининга и доклинических испытаний ИПХФ РАН.

### **Полученные результаты**

Исследовано строение и физико-химические характеристики новых катионных и анионных форм ДНКЖ. Установлено, что комплексы диссоциируют в водных растворах с образованием NO и нитрозильных интермедиатов, ответственных за пролонгированную генерацию NO. Изучены *in vitro* клеточная гибель (на клетках глиобластомы и клетках неглиобластомного ряда) и начаты исследования биохимических механизмов клеточного ответа на действие синтезированных ДНКЖ. Изучение биологической активности ДНКЖ с тиомочевинной показало, что цитотоксичность комплексов не коррелирует с их NO-донорными свойствами, и в их цитотоксическом действии следует рассматривать NO-содержащие интермедиаты, образующиеся при их гидролизе.

Установлено, что комплекс с N'-этилтиомочевинной проявляет наибольшую селективность цитотоксического и индуцирующего гибель клеток действия в отношении клеточных линий, полученных из опухолей головного мозга, A-172, U87 MG и U251 MG. В работе исследована также острая токсичность и определены *in vivo* индексы кумуляции ряда перспективных ДНКЖ, включая выявленное по результатам исследования соединение-лидер, комплекс с N'-этилтиомочевинной.

### **Выводы**

Наши данные показывают, что солевые формы исследованных ДНКЖ могут быть многообещающими соединениями для терапии глиом (в частности, глиобластомы), но точный механизм их избирательной антиглиомной активности еще предстоит выяснить.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 20-03-00183) и государственного задания (№ АААА-А19-119071890015-6).*

**Список литературы**

1. <https://www.iarc.fr>
2. <http://www.cbtrus.org/factsheet/factsheet.html>
3. <https://www.thebraintumourcharity.org/about-us/our-publications/research-impact-report>
4. <http://www.oncology.ru/service/statistics>
5. DeAngelis LM. Brain tumours. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 114–123
6. Glioma Meta-analysis Trialists Group. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*, 2002; 359: 1011–1018
7. *Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний под ред. Н.И. Переводчиковой, Практическая медицина, 2011, 267.*
8. W. Debinski, *Gliomas, Publisher: Exon Publications, Brisbane, Australia, 2021, 154–196.*
9. L. J. Ignarro and B. A. Freeman, *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, 3rd ed.; Publisher: Academic Press, Elsevier, London, United Kingdom, 2017.*
10. H.-W. Huang, Y.-H. Lin, M.-H. Lin, Y.-R. Huang, C.-H. Chou, H.-C. Hong, M.-R. Wan, Y.-T. Tseng, P.-C. Liao, M.-C. Chung, Y.-J. Ma, S.-C. Wu, Y.-J. Chuang, H.-D. Wang, Y.-M. Wang, H.-D. Huang, T.T. Lu and W.-F. Liaw, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2018, 23, 775–784,
11. A.F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes As a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms; Cambridge Scholars Publishing: Newcastle, UK, 2019, p. 279.*
12. Y.-C. Chen, Y.-H. Chen, H. Chiu, Y.-H. Ko, R.-T. Wang, W.-P. Wang, Y.-J. Chuang, C.-C. Huang and T.-T. Lu, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 10101.
13. T.-T. Lu, Y.-M. Wang, C.-H. Hung, S.-J. Chiou and W.-F. Liaw, *Inorg. Chem.*, 2018, 57, 12425–12443.
14. H.-Y. Hsiao, C.-W. Chung, J.H. Santos, O.B. Villaflora and T.-T. Lu, *Dalton Trans.*, 2019, 48, 9431–9453.
15. S.-C. Wu, C.-Y. Lu, Y.-L. Chen, F.-C. Lo, T.-Y. Wang, Y.-J. Chen, S.-S. Yuan, W.-F. Liaw and Y.-M. Wang, *Inorg. Chem.*, 2016, 55, 9383–9392.
16. Y.-C. Sung, P.-R. Jin, L.-A. Chu, F.-F. Hsu, M.-R. Wang, C.-C. Chang, S.-J. Chiou, J.T. Qiu, D.-Y. Gao, C.-C. Lin, Y. S. Chen, Y.C. Hsu, J. Wang, F.N. Wang, P.L. Yu, A.S. Chiang, A.Y.T. Wu, J. J. S. Ko, C.P.K. Lai, T. T. Lu and Y. Chen, *Nat. Nanotechnol.*, 2019, 14, 1160–1169.

**Сведения об авторах**

**Наталья Алексеевна Санина,**

д.х.н., профессор, главный научный сотрудник  
ФГБУН Институт проблем химической физики  
Российской академии наук (ИПХФ РАН)  
Черноголовка, Московская область, Россия  
**E-mail:** sanina@icp.ac.ru

**Information about authors**

**Nataliya A. Sanina,**

professor,  
Institute for Problems of Chemical Physics of the  
Russian Academy of Sciences  
Chernogolovka, Russia  
**E-mail:** sanina@icp.ac.ru

УДК 576.32.36:544.277+611.0188  
ГРНТИ 34.19, 31.15.21,76.03.35  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.276-301

**В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина**  
Институт высшей нервной деятельности и  
нейрофизиологии РАН  
Национальный медицинский исследовательский центр  
здоровья детей МЗ РФ

**НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА И ДРУГИЕ ПАТОЛОГИИ НА ФОНЕ НАРУШЕНИЯ ЦИКЛОВ ОКСИДА АЗОТА И СУПЕРОКСИДА**

*В статье обсуждаются механизмы развития типового патологического процесса, оксидативного и нитрозативного стресса, которые лежат в основе многих*



*неврологических расстройств и других известных заболеваний. Циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала в физиологических условиях не допускают развития патологических изменений в жизненно важных системах организма. Однако при их повреждении нарушаются основные регуляторные механизмы, и, наступает «дисрегуляторная патология» (Крыжановский Г.Н.), обусловленная образованием чрезвычайно активных соединений – диоксида азота (NO<sub>2</sub>), ОН-радикалов и пероксинитритов, которые после протонирования вновь распадаются с образованием радикалов NO<sub>2</sub> и ОН-радикалов. Высказывается гипотеза, что именно эти механизмы, нарушающие циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала, лежат в основе развития типowego патологического процесса.*

**Ключевые слова:** нитрозативный и оксидативный стрессы, типовой патологический процесс, циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала.

**V. P. Reutov, E. G. Sorokina**

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology Russian Academy of Sciences  
«National Medical Research Center for Children's Health»,  
Russian Ministry of Health

## **NEUROLOGICAL DISORDERS AND OTHER KNOWN PATHOLOGIES DUE TO NITRIC OXIDE AND SUPEROXIDE CYCLING DISTURBANCES**

*The article discusses the mechanisms of development of a typical pathological process, oxidative and nitrosative stress, which underlie many neurological disorders and other known diseases. Cycles of nitric oxide and superoxide anion-radical under physiological conditions do not allow the development of pathological changes in the vital systems of the body. However, when they are damaged, the main regulatory mechanisms are violated, and “dysregulatory pathology” sets in (G.N. Kryzhanovsky), due to the formation of extremely active compounds - nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>), OH-radicals and peroxynitrites, which, after protonation, decompose again with the formation of radicals NO<sub>2</sub> and OH radicals. It is hypothesized that it is these mechanisms that disrupt the cycles of nitric oxide and the superoxide anion radical that underlie the development of a typical pathological process.*

**Key words:** nitrosative and oxidative stress, typical pathological process, cycles of nitric oxide and superoxide anion radical.

### **Введение**

Согласно Гиппократу основные императивы врача: «предупреди, спаси, излечи». Однако чтобы эффективно лечить, необходимо знать: что такое болезнь с биологической точки зрения, и, как больного человека можно сделать здоровым. Практически все врачи мира действуют в жестких рамках конвенциональной медицины, где нет «свободы воли», нет экспериментов, отклонений от заранее выработанных правил, одобренных и утвержденных министерством здравоохранения страны/стран. Конвенциональная медицина – это официальная традиционная медицина, разрабатывающая стандарты лечения заболеваний. Что такое конвенция? Это то, чем регулярно занимаются медицинские чиновники. Конвенция – это набор согласованных, оговоренных или общепринятых стандартов, социальных норм или критериев, часто принимающих форму закона или обычая. В социальном контексте конвенция может иметь или сохранять характер «неписаного закона». Такие стандарты конвенциональной медицины часто определяются министерством здравоохранения каждой конкретной страны и согласовываются с другими министерствами с целью достижения разумного компромисса. Например, если содержание нитратов в овощах и фруктах стало выходить за рамки прошлогодних значений, то адаптируют, как предельно допустимые концентрации нитратов в продуктах питания, так и содержание метгемоглобина в крови к так называемым «нормальным» значениям. Понятие нормы постоянно пересматривается. Этот процесс продолжается до тех пор, пока не становится очевидным – такое нормирование дальше продолжаться

уже не может. Так появляются «красные линии» в практической медицине и здравоохранении.

Официальная медицина видит свою основную задачу в том, чтобы продлить жизнь человека в новых условиях и научить его *жить максимально долго и комфортно*. Нередко проблема решается с помощью *аптек, фармацевтических предприятий и кампаний*. В связи с этим вопрос о том, что собой представляет *болезнь с биологической точки зрения*, – один из наиболее актуальных вопросов современной биологии и медицины. Решение этого вопроса дает возможность ученым и врачам определиться не только со *стратегическими задачами того, что делает медико-биологическая наука в XXI веке*. Это еще и возможный *выход человека/людей за пределы комфортной жизни больного человека с готовым набором лекарственных препаратов, рекомендованных врачами, медицинскими чиновниками и фармакологическими кампаниями*. Привычные рассуждения о том, что человека нужно лечить, *используя профилактическую медицину*, неизменно остается на уровне благих пожеланий, которыми для всех нас выслана дорога **к врачам → в аптеку → потом снова к врачам** (перед тем, как окончательно попасть на кладбище). С другой стороны – самый простой анализ используемых современной медициной статистических показателей приводит к выводу, что *уровень здоровья людей, как в России, так и во многих других странах мира, как популяции*, практически не отслеживается. Все чаще и чаще стали говорить о целесообразности постепенного сокращения численности населения Земли от 8 млрд. человек до «ЗОЛОТОГО МИЛЛИАРДА».

**Одна из целей работы** – сформулировать некоторые медико-биологические принципы, которые будут содействовать служению интересам населения и его здоровью, и, тем самым, будут реализовывать планы правительства и президента РФ.

#### **Предельно допустимые концентрации (ПДК) нитратов в продуктах питания и «нормальные» значения уровня метгемоглобина в крови**

ПДК (предельно допустимые концентрации) нитратов в течение второй половины XX века нередко устанавливались от достигнутого в настоящий момент уровня загрязнения. В дальнейшем эти ПДК пересматривались чаще всего в сторону адаптации организма к постоянно растущему загрязнению нитратами (ионами  $\text{NO}_3^-$ ) с целью его оправдания. В течение только второй половины XX – начале XXI века уровень допустимого содержания метгемоглобина (метHb) – окисленного Hb – пересматривался трижды. 70-е годы XX века – нормальными значениями метгемоглобина в крови считались от 2% до 5% от общего содержания Hb. Значения метгемоглобина выше 5% от общего содержания пигмента крови считались «бессимптомной метгемоглобинемией». В 80-е годы XX века стали допускать уровень метHb в крови в весенне-осенний период (когда потребляется больше овощей и фруктов) от 5 до 10% от общего содержания Hb. О бессимптомной метгемоглобинемии чаще всего уже не говорили. В XXI веке уже считают, что если содержание метгемоглобина в крови находится в пределах до 15% от общего содержания Hb, то клинические проявления отсутствуют, хотя кожа приобретает сероватый оттенок – от бледного, землисто-серого до безжизненного. Так достигаются «красные линии», за пределами которых идет резкое сокращение средней продолжительности жизни. Человечество во многих областях своей деятельности уже достигло своих «красных линий». За первые 20 лет либерально-демократических преобразований в России произошло удвоение числа смертности от опухолевых/онкологических заболеваний и утроение смертности от сердечно-сосудистых заболеваний (Рис. 1).



Рис.1. Заболеваемость, на 1000 чел. Онкологические и сердечно-сосудистые заболевания, включая все заболевания системы кровообращения за первые 20 лет либерально-демократических преобразований.

В этот период численность населения в России нередко снижалась на 300 – 500 тыс. человек в год. В некоторые годы снижение численности населения достигало от 600 до 900 тыс. человек в год. Правительство делает все возможное, чтобы этого не допустить. Однако с реализацией этих целей, проблем и задач, *если судить по реальной (а не ожидаемой при рождении) средней продолжительности жизни, и, по росту численности населения в современной России, у нас дела обстоят намного скромнее, чем это хотелось бы, и, чем это, с нашей точки зрения, должно быть.* Естественно возникает вопрос: почему это происходит? *Почему не работают финансовые средства, затрачиваемые правительством, на решение острых демографических проблем?*

Бурное развитие новой стадии капитализма в России привело к тому, что динамика технических показателей, обеспечивающих грамотное капиталовложение в ту или иную отрасль медицинской промышленности, оказалась связанной, прежде всего, с получением максимально возможной прибыли фармакологическими кампаниями, а не с численностью населения страны, повышением качества жизни населения и средней продолжительности жизни. Благодаря этому обстоятельству появилась результирующая тенденция, одерживающая верх над планами правительства, страны и общества, что позволило говорить, что в будущем миром будут править не правительства отдельных стран, а международные корпорации. Хорошо это или плохо? Для населения отдельных стран – это крайне плохо, для корпораций, несомненно, хорошо. Для реализации интересов правительства формируются различные общественные движения, которые вместе с министерствами здравоохранения включаются в реализацию актуальных медико-биологических проблем. Однако этого, к сожалению, недостаточно, потому что любые движения рано или поздно начинают обслуживать собственные финансовые интересы: *миром правят доллар, США и финансовая система этой страны*, которые направлены на то, чтобы сократить численность населения России, по крайней мере, в 10 раз. Во всяком случае, об этом открыто заявляли лидеры Великобритании – премьер-министр Маргарет Тэтчер (1925–2013) и США – Мадлен Олбрайт (1937–2022).

### **Поиски элементов построения теории медицины.**

В биологии и медицине на протяжении всего XX века шли активные поиски *элементов построения теории медицины*. Патологические процессы в организме рассматривали, исходя, прежде всего, из анализа возникающих морфологических изменений, в тесном сочетании с данными клиники, физиологии и биохимии [1]. В XXI веке были добавлены генетические и молекулярно-биологические методы исследования вместе с данными, получаемыми с помощью этих методов. Однако еще в первой половине XX века один из организаторов патологической и анатомической службы в СССР, ученый, поставивший патофизиологию и патологическую морфологию на уровень науки, академик АМН СССР, вице-президент АМН СССР И.В. Давыдовский (1887–1968) писал: «Стихийное нагромождение фактов и деталей, богатейшая исследовательская техника,

обеспечивающая их накопление, уведат исследовательскую мысль от общих вопросов физиологии, патологии и медицины, делая многих исследователей рабами фактов, порождая тем самым упадок общих концепций широкого плана» [2]. Г. Селье (1907–1982) объяснял переход от нормы к патологии, как переход от стресса к дистрессу [3]. Селье рассматривал стресс, как *совокупность стереотипных общих реакций организма* на действие раздражителей самой различной природы, как *ответные реакции, имеющие, прежде всего, защитное значение*. По мнению Г. Селье, «общий адаптационный синдром» – это совокупность *неспецифических реакций всего организма*, носящих приспособительный и защитный характер, возникающих в ответ на чрезвычайно сильные повреждающие воздействия. Научным взглядам, устремлениям и перспективным программам И.В. Давыдовского были вполне созвучны мысли, идеи и представления Г. Селье, который писал: «Больше всего я хочу подчеркнуть значение теории. *Это особенно важно сделать, поскольку в наше время испытывают просто ужас перед абстрактным мышлением в медицине*».

**Вторая цель работы** – преодолеть тот «ужас, который испытывали медики и врачи» XX века перед конкретным молекулярно-биологическим, биохимическим и физиологическим мышлением, с одной стороны, и абстрактно-теоретическим мышлением, с другой стороны.

В этой конкретной работе на основании анализа данных литературы и результатов собственных исследований будет высказана гипотеза о существенной роли *интактных циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала в защите мозга, нейронов и других клеток организма от повреждающего воздействия радикалов NO<sub>2</sub>*. На примере анализа *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала* будет установлена связь между нашими представлениями и теориями классиков науки. В первую очередь к таким классикам мы относим Р. Вирхова (1821–1902), Анри/Henry Пуанкаре (1854–1912) и Г.Н. Крыжановского (1922–2013) [4–6], которые в разные годы способствовали созданию учения о том, что нарушение регуляции лежит в основе развития патологических процессов. Всякая патология – это «*дизрегуляторная патология*», возникающая вследствие нарушения (дизрегуляции) деятельности клеток, тканей, органов, систем и всего организма [7]. Именно Г.Н. Крыжановским был открыт, сформулирован и обобщен новый механизм нервных расстройств при повреждениях центральной нервной системы (ЦНС) – образование новых патологических интеграций из первично повреждённых и вторично измененных структур ЦНС [7, 8].

**От теории патологии клетки Р. Вирхова, нервно-дистрофического процесса А.Д. Сперанского к типовому патологическому процессу.**

На протяжении нескольких веков ученые и врачи пытались выявить *специфические изменения клеток, субклеточных структур и мембран при каждом патологическом процессе и заболевании*. Однако оказалось, что при многих патологических процессах наблюдаются, прежде всего, *универсальные неспецифические изменения* клеток, плазматических мембран и мембран субклеточных структур [9, 10]. Это позволило говорить о существовании *типовых неспецифических нарушений* разных клеточных и субклеточных структур. В настоящее время изученные механизмы нарушений в организме позволили ученым сделать вывод: *при развитии многих патологических процессов (особенно в начальной их стадии) наблюдаются повреждения, которые являются следствием избыточного проявления нормальных процессов и реакций*. Поэтому именно в начальной стадии многие *патологические процессы* отличается от нормальных физиологических процессов лишь тем, что они *развиваются не в том месте, не в то время или протекают с другой интенсивностью*. Это хорошо согласуется с представлениями о том, что во многих случаях *патология начинается с недостаточности или нарушения регуляторных механизмов*. Если учитывать тот факт, что любая регуляция обеспечивается действием *циклических связей*, когда сигнал с выхода регуляторной системы поступает на ее вход, становится очевидной важная роль *циклических регуляторных*

*механизмов* для жизнедеятельности практически всех клеток живого организма, в том числе нейронов и глиальных клеток. Несомненно, важнейшую роль в живых организмах играют циклические регуляторные механизмы, участвующие в поддержании содержания *активных форм азота и кислорода* на относительно безопасном уровне.

**Теория нервно-дистрофического процесса как предтеча (*англ. forerunner*) теории типового патологического процесса.**

В течение всего XX века многие медики считали, что важную роль в развитии неинфекционных болезней играют нервы и выделяемые ими медиаторы, воздействующие на ткани [11–15]. Объяснению влияния нервов и медиаторов на механизмы развития патологических процессов посвящена теория нервно-дистрофического процесса (НДП) [11–13]. Эта теория создана при активном участии академиков И.П. Павлова (1849–1936), Л.А. Орбели (1882–1958), А.Д. Сперанского (1887–1961) [11–16], продолжена Я.И. Ажипой (1992–1992) и его коллегами [12–15]. Основным трудом академика А.Д. Сперанского назывался «Элементы построения теории медицины» [11]. Этот труд восемь (8) раз номинировался на соискание Нобелевской премии по физиологии и медицине. И.П. Павлов, Л.А. Орбели и А.Д. Сперанский предполагали, что в основе развития НДП лежит «избыточное и/или недостаточное воздействие нервно-проводниковых и гуморальных влияний на ткани». В отличие от Вирхова, который считал, что в основе болезни лежит патология клеток, А.Д. Сперанский выдвинул тезис – нервная система защищает от появления функциональных нарушений и развития повреждений, а потом организует и упорядочивает течение патологического процесса [11]. Однако это положение не было наполнено конкретным содержанием для многих патологических процессов. Многие идеи академика А.Д. Сперанского до сих пор не утратили своей актуальности, а его ученики и последователи продолжают направление его исследований. Одним из наиболее ярких и талантливых учеников академика АН СССР и АМН СССР А.Д. Сперанского был академик РАМН Г.Н. Крыжановский [7, 8].

Явление нервно-дистрофического процесса были выявлены в местах бифуркации сосудов, которые предшествовали образованию атеросклеротических бляшек [17–23]. Анализ данных литературы и результатов собственных исследований позволил нам предложить новую концепцию образования атеросклеротических бляшек. Эта концепция включала достижения медицины в этой области за последние 50 лет, теорию нервно-дистрофического процесса А.Д. Сперанского и наши исследования [24, 25]. Суть этих дополнений заключалась в том, что в местах бифуркации сосудов активно работает эндотелиальная NO-синтаза [26, 27], которая продуцирует повышенное содержание NO. Именно благодаря NO в местах бифуркации сосудов, когда один крупный сосуд разветвляется на несколько более мелких по диаметру сосудов, появляется возможность образования повышенных концентраций NO<sub>2</sub> и пероксинитритов (ONOO<sup>-</sup>), анионы которых после протонирования (ONOOH) способны вновь распадаться. При этом образуются высокореакционные и высокотоксичные молекулы •NO<sub>2</sub> и •OH-радикалы. (Для обозначения этих свойств введены точки при атомах азота – •N и кислорода – •O). Эти чрезвычайно активные химические соединения повреждают адренергические и норадренергические нервные волокна, участвующие в сосудосуживающем действии. Таким образом, благодаря действию NO происходит расширение сосудов, а благодаря воздействию норадреналина и адреналина осуществляется сосудосуживающее действие. Норадреналин и адреналин относятся к биологическим фенолам или к фенолам биологического происхождения (рис. 2). Общим их свойством является наличие ароматического кольца с системой делокализованных электронов и две OH-группы, расположенные в непосредственной близости с ароматическим кольцом. Именно от этих OH-групп может относительно легко отрываться атом водорода H при реализации норадреналином антиоксидантной функции. При отрыве атома водорода, возможно, его присоединение к радикалу, например, NO<sub>2</sub>. В результате протекания этой реакции радикал NO<sub>2</sub> переходит в менее активное (нерадикальное) соединение HNO<sub>2</sub> – азотистую

кислоту – неустойчивое химическое соединение.

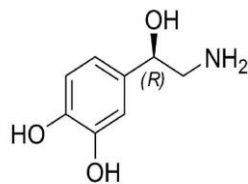


Рис. 2. Норадреналин

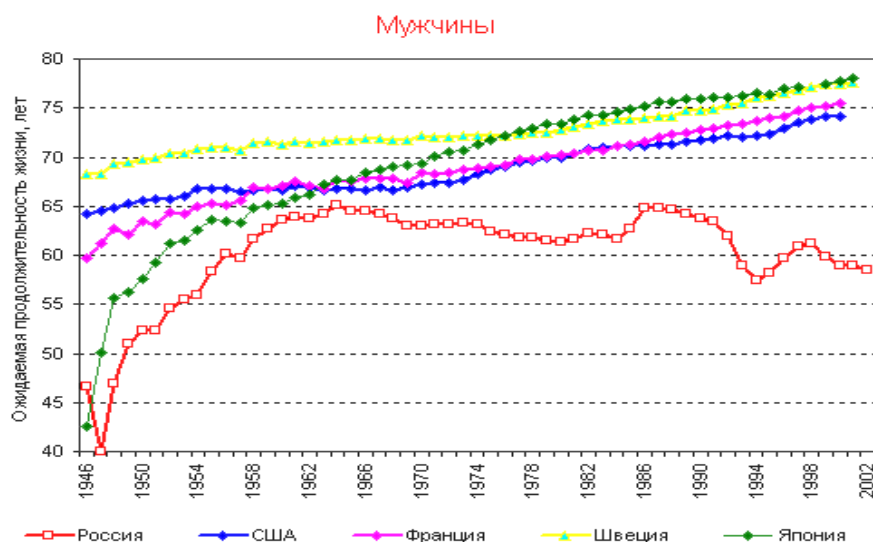
Если развивается *нервнодистрофический процесс с повреждением адренергических нервных волокон* [17–23], то количество норадреналина, высвобождаемого этими волокнами, также снижается. Это приводит к тому, что в местах повреждения адренергических нервных волокон разрушаются эндотелиальные клетки, а в местах повреждения начинают формироваться атеросклеротические бляшки [25]. Источником холестерина, входящего в состав *липопротеиновых комплексов*, постепенно переходящих в *атеросклеротические бляшки*, нередко становится холестерол, входящий в состав мембран клеток и субклеточных структур из рядом расположенных участков сосудов. В настоящее время *типовой патологический процесс* рассматривают, как процесс, встречающийся в виде постоянных сочетаний или комбинаций патологических изменений [10, 34–36]. При этом анализируют ситуации независимо от биологического вида животного и причины, вызвавшей этот процесс. В своем составе  *типовые патологические процессы* включают ишемический и геморрагический инсульты, инфаркты, воспаления и опухоли различной локализации, лихорадки различного происхождения, еще около десяти тысяч нозологических форм патологий и заболеваний с одними и теми же проявлениями изменений и отклонений от физиологической нормы. В последние 2 года COVID-19 и/или другие формы инфекционной эпидемии/пандемии также стали анализировать на предмет наличия  *типового патологического процесса*. Почему такое количество – около десяти тысяч нозологических форм патологий и заболеваний? Потому что столько в настоящее время известно патологических процессов и заболеваний, в каждом из которых  *типовой патологический процесс* служит своеобразным *общим знаменателем* всех этих заболеваний. К 2022 году количество статей, посвященных различным аспектам  *типового патологического процесса*, достигло 65 000. Некоторые из этих работ приведены в списке литературы [28–51].

Все указанные выше патологические процессы протекают на фоне *гипоксии/ишемии, воспалительных, иммунных и аутоиммунных* процессов и заболеваний. Таким образом,  *типовые патологические процессы* – это эволюционно сформированные процессы, имеющие сходные проявления и механизмы развития, вызываемые разнообразными причинами и существенно не зависящие как от локализации повреждения, так и вида организма. В каждом заболевании выявляют  *типовой патологический процесс*, воздействуя на который можно лечить само заболевание [10].

### **Как можно воздействовать на типовой патологический процесс?**

В середине 70-х годов XX века, еще не подозревая о наличии  *типового патологического процесса*, как *общего знаменателя многих других патологических процессов*, мы обратили внимание на то, что, *воздействуя на содержание нитратов и нитритов в организме человека*, можно существенно влиять на течение многих заболеваний, ограничивающих среднюю продолжительность жизни [16–22, 52–59]. В те годы одной из самых актуальных проблем была обозначившаяся с конца 50-х – начала 60-х годов XX века проблема снижения средней продолжительности жизни (**Рис. 3**) [52, 54–59]. Эта проблема существовала на фоне роста сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний на протяжении почти 20 лет. Нужно было угадать основную причину этого явления. Мы предположили, что одной из причин обозначившейся проблемы может быть чрезмерное внесение в почву азотных удобрений. В мае 1957 года руководителем СССР

и Генеральным секретарем КПСС Н.С. Хрущевым (1894–1971) была поставлена задача: догнать и перегнать Америку по производству масла, молока и мяса на душу населения. Решить эту задачу можно было, создав кормовую базу для птиц, мелкого и крупного рогатого скота. В качестве основного инструмента решения этой задачи были выбраны азотные удобрения в связи с тем, что азот, входящий в состав нитратов, необходим для растений в качестве строительного материала в механизмах *ассимиляторной денитрификации*, а нитратные и нитритные ионы используются в качестве акцепторов электронов в энергетических механизмах *диссимиляторной денитрификации*. В ходе практического решения этой задачи агрономы и работники сельского хозяйства решили, что «почву азотными удобрениями не испортишь» (Табл. 1). Однако то, «что хорошо для каши и масла» оказалось неудачным «для почвы и азотных удобрений».



**Рис. 3. Продолжительность жизни в СССР/России, США, Франции, Швеции и Японии (1946 - 2002 гг.).** По оси абсцисс – календарный год, по оси ординат – продолжительность жизни, годы.

Источники: Human Mortality Database.

К сожалению, в те годы мало кто догадывался о последствиях активного использования азотных удобрений в сельском хозяйстве, несмотря на то, что с 1945 года стали известны случаи нитратно-нитритных интоксикаций. В те годы знали лишь о нитритной метгемоглобинемии, которая была опасна для детей до 3-х лет со сниженной активностью метгемоглобинредуктазы в эритроцитах крови [61]. Не зная истинных причин, проблему катастрофического снижения средней продолжительности жизни пытались решить увеличением количества врачей, поликлиник и больниц. В 70-х годах XX века в СССР насчитывалось более полумиллиона (578 тыс.) врачей, что составляло около 25% всех врачей мира – около 2 млн. врачей. Однако, несмотря на то, что в мире каждый четвертый врач был советским врачом (врачом из СССР), проблема не решалась. С каждым годом она еще более усугублялась.

**Таблица 1. РОСТ МАТЕРИАЛЬНОГО БЛАГОСОСТОЯНИЯ НАРОДОВ СССР**  
Потребление продуктов питания (на душу населения в год; килограммов) [62].

	1913	1950	1960	1966
Мясо и сало (включая птицу и субпродукты в натуре)	29	26	40	43
Рыба и рыбопродукты	6,7	7,0	9,9	12,9
Молоко и молочные продукты в пересчете на молоко	154	172	240	259
Яйца – штук	48	60	118	130
Хлебные продукты (хлеб в пересчете на муку, мука, крупа, бобовые, макаронные изделия)	200	172	164	154
Картофель	114	241	143	136
Овощи и бахчевые	40	51	70	72
Сахар	8,1	11,6	28,0	35,3



Основные показатели экономического роста в СССР проводили, сравнивая с показателями благополучного 1913 года, когда Российская Империя в результате столыпинских реформ (с 1906 года) достигла максимальных показателей. В 1966 году по сравнению с 1913 годом потребление мяса и мясопродуктов в разных регионах страны увеличилось в 1.5–3.5 раза. Рыбы и продуктов из рыбы – в среднем в 2 раза, молока и молочных продуктов – в 1.5–2.0 раза, яиц – в 2.5–3.0 раза, сахара – более чем в 4 раза [62]. Таким образом, в середине 70-х годов XX века стало очевидно, что крайне необходимо найти решение проблемы катастрофического снижения средней продолжительности жизни в СССР. Поскольку эту проблему, как указывалось выше, *не удалось решить путем прямого увеличения численности врачей, больниц и поликлиник*, необходимы были *нестандартные, «креативные», «эвристические» приемы или подходы*, которые увеличивают вероятность поиска верных ответов и удачных решений. В ходе поиска нестандартных подходов мы обратили внимание на то, что средняя продолжительность жизни населения снижалась неравномерно. Особенно страдали люди, имеющие вредные привычки (курение), которые содержат компоненты с диоксидом азота (NO<sub>2</sub>). Люди, работающие или проживающие в местах с повышенным содержанием NO<sub>2</sub> или высоким нитратно-нитритным фоном, также имели меньшую среднюю продолжительность жизни. Пожилые люди и пациенты с хроническими заболеваниями, большая часть которых протекала на фоне *гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, иммунных и аутоиммунных заболеваний*, характеризующихся повышенным содержанием *активных форм кислорода и азота*, одновременное присутствие которых в организме увеличивает вероятность образования высокореакционных свободно радикальных молекул NO<sub>2</sub> и OH-радикалов, также завершали свою жизнь преждевременно. Большую продолжительность жизни имели люди, проживающие в горах, а также в регионах традиционно употребляющих продукты питания с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот и антиоксидантов (оливковое масло, рыба, томаты, виноград). Среди городского населения выделялись священнослужители, творческие люди, успешные ученые, музыканты, регулярно исполняющие классические музыкальные произведения.

**Таблица 2. КОЛИЧЕСТВО ВРАЧЕЙ В СССР И ДРУГИХ СТРАНАХ [62].**

	Годы	Численность врачей всех специальностей	
		тысяч	на 10 000 человек населения
СССР	1966	577,7	24,6
РСФСР		328,3	25,8
Украинская ССР		114,0	24,8
Белорусская ССР		19,8	22,6
Узбекская ССР		19,5	17,9
Казахская ССР		23,4	18,9
Грузинская ССР		16,4	35,5
Азербайджанская ССР		11,6	24,1
Литовская ССР		7,0	23,1
Молдавская ССР		6,3	18,5
Латвийская ССР		7,5	32,6
Киргизская ССР		5,3	19,4
Таджикская ССР		4,1	15,4
Армянская ССР		6,3	28,1
Туркменская ССР		4,2	21,4
Эстонская ССР	4,0	30,7	
Англия	1963	(79,1)	(14,7)
Индия	1961	83,3	1,9
Иран	1964	8,4	3,7
Италия	1961	81,2	16,3
Пакистан	1960	8,7	0,9
США	1964	360,3	18,6



	Годы	Численность врачей всех специальностей	
		тысяч	на 10 000 человек населения
Турция	1963	10,1	3,3
Федеративная Республика Германии	1965	110,4	19,3
Франция	1964	75,2	15,4
Япония	1964	139,6	14,3

**Рабочая гипотеза для решения демографической проблемы.**

Мы предположили, что одной (но не единственной!) из существенных причин катастрофического снижения средней продолжительности жизни может быть *химический* или *свободно радикальный резонанс* между *активными формами азота* и *кислорода* в организме человека. Физический резонанс (*фр. resonance*, от *лат. resono* «откликаюсь») по определению – это такой ответ колебательной системы на повторяющееся периодическое внешнее воздействие (например, разрушение моста под воздействием марширующих солдат). Эти события (резонансные), как правило, проявляются и характеризуются резким увеличением амплитуды колебаний. Это всегда происходит при совпадении частоты внешнего воздействия с определёнными значениями, характерными для данной системы. Поскольку понятие *химического* или *свободно радикального резонанса* отсутствовало в литературе, мы ввели это понятие в состав научных терминов, поскольку концентрации *активных форм азота* и *кислорода*, всегда испытывают периодические колебания. Это означает, что эти активные свободно радикальные соединения могут быть частью колебательной системы, они могут входить в состав *циклов активных форм азота* и *кислорода*, где есть системы с отрицательной обратной связью, а сама система может характеризоваться как система управления. Схемы *циклов оксида азота* и *супероксидного анион-радикала* претерпели ряд эволюционных изменений в наших работах [24, 25, 63]. Они завершились теми, которые представлены на **рис. 5б, 6**.

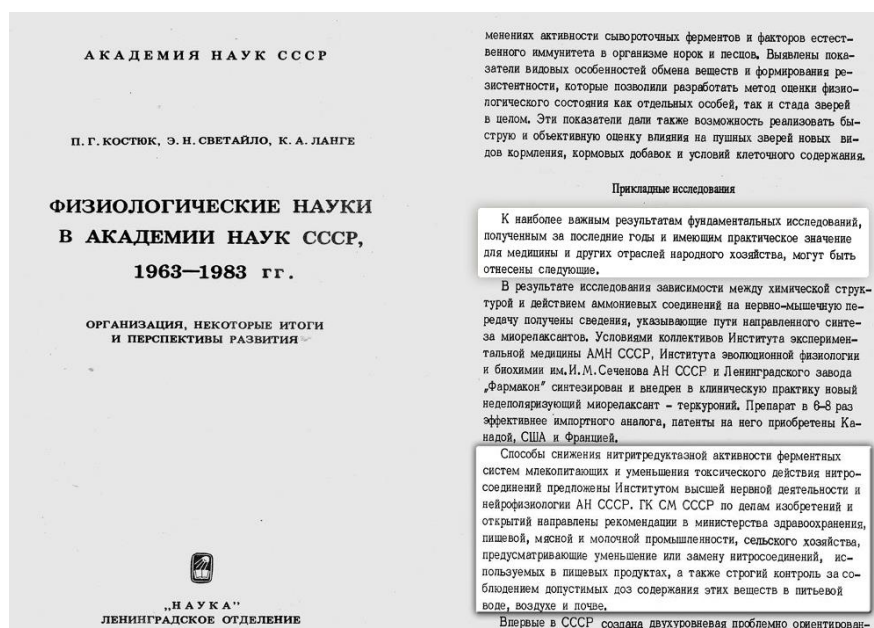
Этот химический резонанс, с нашей точки зрения, мог быть вызван повышенными концентрациями NO (происхождение: как эндогенное образование, так и экзогенное – от нитратов азотных удобрений) и  $\bullet\text{O}_2^-$  (происхождение, прежде всего, от гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, активации иммунных и аутоиммунных заболеваний). В тех случаях, когда идет прямое взаимодействие NO и  $\bullet\text{O}_2^-$ , минуя *циклы оксида азота* и *супероксидного анион-радикала*, в условиях дефицита антиоксидантов, активно образуются весьма агрессивные молекулы диоксида азота ( $\text{NO}_2$ ), OH-радикалов и пероксинитритов. По сути дела, это *бинарное химическое/биохимическое оружие*, которое организм человека и животных в нормальных физиологических условиях использует против чужеродных повреждающих факторов, в том числе вирусов и бактерий. Под бинарным оружием обычно понимают разновидность химического оружия, применение которого возможно только после реакции относительно безвредных (менее опасных при хранении и транспортировке) компонентов. В живом организме разделить бинарное оружие, состоящее из NO и  $\bullet\text{O}_2^-$ , удалось благодаря наличию *циклов оксида азота* и *супероксидного анион-радикала*. Анализу и обоснованию различных аспектов этих циклов посвящена эта статья, как и многие другие наши статьи, написанные в течение более 40 лет [4–6, 10, 63, 93, 94]. Таким образом, в условиях, возникших в СССР после действия программы химизации сельского хозяйства, бинарное оружие, состоящее из отдельных относительно безвредных компонентов (NO и  $\bullet\text{O}_2^-$ ), при нарушении *циклов оксида азота* и *супероксидного анион-радикала*, стало источником пероксинитритов,  $\text{NO}_2$  и OH-радикалов, и, оказалось обращенным против нормальных клеток человека.

**Практическое решение повышения средней продолжительности жизни и численности населения.**

Применение на практике указанных выше идей состоялось в период с 1980 по 1990 годы. Оно позволило не только остановить 18-летнее снижение средней продолжительности жизни, но и повысить этот показатель на 3–5 лет (**рис. 3**) [52]. Это стало

возможным благодаря поддержке вице-президента АН СССР академика Ю.А. Овчинникова (1934–1988) и ряда других министерств, включая Министерство здравоохранения СССР, Министерство сельского хозяйства СССР, Министерства мясной и молочной промышленности СССР (**Рис. 4**). Все эти мероприятия вылились в то, что Достижение Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР (ИВНД и НФ АН СССР) было признано наиболее значительным достижением Отделения физиологии АН СССР (1963–1983), имеющим практическое значение. Оно вошло в Отчет академика-секретаря Отделения физиологии АН СССР за 20-летний период [53] (**Рис. 4**).

Авторы этого достижения Я.И. Ажипа (1924–1992), Л.П. Каюшин (1925–1994), Е.И. Никишкин (1934–2016) и один из авторов этой статьи (Р.В.П.) были отмечены 4 медалями ВДНХ СССР (1983). Конечный результат действия этой программы состоял в том, что за 10-летний период (1980–1990) численность населения СССР возросла на 24,1 млн. человек. Несмотря на *Перестройку*, распад огромной страны – СССР, пустые прилавки, низкие цены на газ и нефть, потерю доходов от продажи алкоголя вследствие антиалкогольной компании М.С. Горбачева, и, употребления опасного (суррогатного) алкоголя, наконец, в отсутствие программы Е.В. Малышевой «Жить здорово» и специализированных диет ее имени, тем не менее, прирост населения СССР за 10 лет оказался равным 24,1 млн. человек. В эти годы численность населения СССР достигла максимальных значений за все 69 лет существования СССР, несмотря на катастрофическое снижение численности населения, и, средней продолжительности жизни в период 1962–1980 годы. По данным переписи 1989 года, население СССР насчитывало **285,7 млн.** человек. По текущей оценке, к началу 1991 года оно возросло до **289,2 млн.** человек. Численность населения США в эти годы составила **254,5 млн.** человек. Все изменилось после распада СССР. К сожалению, не в лучшую сторону.



**Рис. 4. Отчет Отделения физиологии АН СССР (1963–1983) академика АН СССР Костюка П.Г., Светайло Э.Н., Ланге К.А.**



Рис. 5 а. Удостоверение, выданное в декабре 1983 года, за достигнутые успехи в развитии народного хозяйства СССР.



Рис. 5.б. Стенд Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (ИВНД и НФ РАН) на выставке в Президиуме РАН в 1996 году.

Авторы этого достижения Я.И. Ажипа (1924–1992), Л.П. Каюшин (1925–1994), Е.И. Никишкин (1934–2016) и один из авторов этой статьи (Р.В.П.) были отмечены 4 медалями ВДНХ СССР (1983) (рис. 5 а). Конечный результат действия этой программы состоял в том, что за 10-летний период (1980–1990) численность населения СССР возросла на 24,1 млн. человек. Несмотря на *Перестройку*, распад огромной страны – СССР, пустые прилавки, низкие цены на газ и нефть, потерю доходов от продажи алкоголя вследствие антиалкогольной компании М.С. Горбачева, и, употребления опасного (суррогатного) алкоголя, тем не менее, прирост населения СССР за 10 лет оказался равным 24,1 млн. человек. В эти годы численность населения СССР достигла максимальных значений за все 69 лет существования СССР, несмотря на катастрофическое снижение численности населения, и, средней продолжительности жизни в период 1962–1980 годы. По данным переписи 1989 года, население СССР насчитывало **285,7 млн.** человек. По текущей оценке, к началу 1991 года оно возросло до **289,2 млн.** человек. Численность населения США в эти годы составила **254,5 млн.** человек. Все изменилось после распада СССР. К сожалению, не в лучшую сторону.

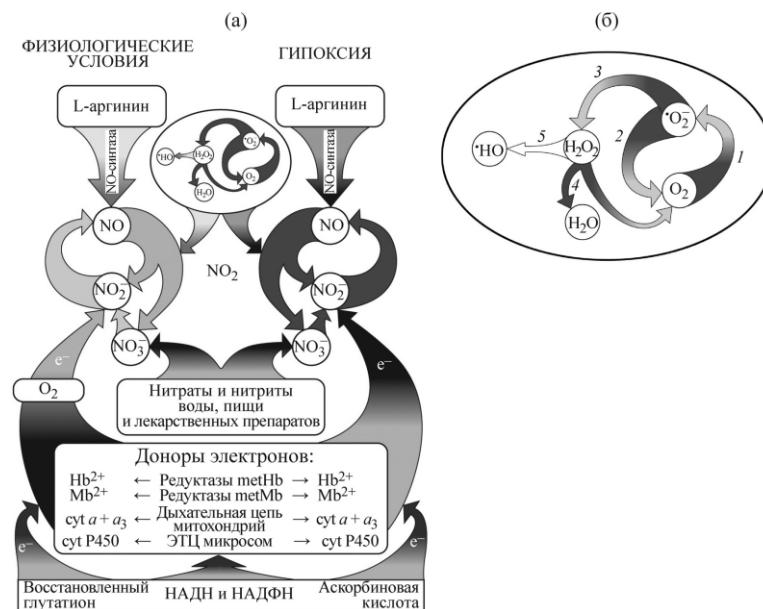


Рис. 6. Циклы оксида азота (а) и супероксидного анион-радикала (б)

В цикле оксида азота можно выделить NO-синтазную компоненту (L-аргинин → NO), осуществляющую синтез NO в присутствии кислорода, и нитритредуктазную компоненту, активность которой резко возрастает в отсутствие кислорода (гипоксия/ишемия). Ионы NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, образующиеся из L-аргинина, могут вновь при участии нитритредуктазных систем, включающих в себя гемоглобин (Hb), миоглобин (Mb) и цитохромы (cyt a+a<sub>3</sub>, cyt P-450), замыкать в цикл цепочку (L-аргинин → NO → NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Кислород, связываясь с гемом, ингибирует нитритредуктазную активность этих белков. При гипоксии и функциональной нагрузке, когда гемсодержащие белки переходят в дезоксиформу, ионы NO<sub>2</sub><sup>-</sup> начинают активно восстанавливаться, акцептируя электроны с этих гемсодержащих белков. В цикле супероксидного анион-радикала происходят: 1 – восстановление O<sub>2</sub> и образование супероксидного анион-радикала; 2 и 3 – реакции дисмутации супероксида, катализируемые супероксиддисмутазой; 4 – разложение пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) на воду (H<sub>2</sub>O) и молекулярный кислород (O<sub>2</sub>), осуществляемое ферментом каталазой; пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) также разлагается с образованием двух молекул •ОН-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 (NO<sub>2</sub>) и пероксинитритов, вновь распадающихся на NO<sub>2</sub> и •ОН-радикалы, которые повреждают основные компоненты живых организмов.

**Концепции циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала: предложения по снижению смертности населения от Covid-19 в сотни раз [64].**

На протяжении всего периода существования проблемы Covid-19 и его штаммов нами была проанализирована малая часть основных данных литературы. Общее число статей быстро превысило 90–100 тыс. в системе Pubmed. Мы обратили особое внимание на те работы, в которых было показано, что лекарства от малярии ивер(о)мектин и от алкоголизма – дисульфирам, способны в сотни и более раз снижать смертность от Covid-19.

**Почему ивер(о)мектин защищает живые организмы от COVID-19?** Пожалуй, за последние 23 года после награждения Нобелевской премией ученых из США за открытия, связанные с физиологическим действием оксида азота (NO) – это первое достижение, которое может иметь такой же резонанс [64–68]. «Число случаев заболевания COVID-19 в Дели, где 20-го апреля 2021 начали использовать ивер(о)мектин, снизилось с 28395 до 2260 – 22-го мая, т.е. снижение числа случаев заболевания COVID-19 на 92%.



Аналогичным образом, число случаев заболеваний в Уттар-Прадеше снизилось с 37944 – 24-го апреля до 5964 – 22-го мая. Снижение числа случаев заболевания COVID-19 было на 84%. Дели и Уттар-Прадеш следовали рекомендациям Всеиндийского института медицинских наук (AIIMS), опубликованным 20-го апреля 2021-го года, которые предписывали дозировку 0.2 мг ивермектина на кг массы тела в течение трех дней. Это составляет 15 мг в день для человека с массой 150 фунтов – 60 кг, или, 18 мг в день для человека с массой 200 фунтов – 80 кг. В остальных трех индийских штатах, в которых его использовали, также наблюдалось снижение количества случаев заболевания и смертности от COVID-19. В Гоа – с 4195 до 1647, в Уттаракханде – с 9624 до 2903, а в Карнатаке – с 50112 до 31183. Гоа принял политику превентивной массовой профилактики ивермектином для всего взрослого населения старше 18 лет в дозе 12 мг в день в течение пяти дней».

Между тем, 14-го мая 2021 г. штат Тамилнад признал, что объявил **ивермектин** вне закона в пользу политкорректного **ремдесивира**. «В результате количество случаев в Тамилнаде увеличилось за тот же период с 20-го апреля по 22-е мая с 10986 до 35873, *более чем в три раза*». На протяжении всего мая 2021 года поступали следующие сведения: «Хотя большие фармацевтические компании и ведущие СМИ старались изо всех сил, они не могут объяснить этот естественный эксперимент». Проблема в том, что «в Тамилнаде уже несколько недель действует режим строгой изоляции, но количество случаев там только растет». Таким образом, режим строгой изоляции не сработал. Их следующий аргумент заключался в том, что «произошел сдвиг из густонаселенных городских районов, таких как Дели и Мумбаи», в отдаленные районы, такие как Тамилнад. «Большая проблема заключается в том, что соседний штат Карнатака – это тоже сельская местность, а количество случаев в нем уменьшается благодаря ивермектину». Таких сведений поступало из открытых индийских/английских публикаций множество. Образно говоря, это были сводки с «полей сражений» за жизнь людей с COVID-19 или его штаммами. Иверомектин уже спас десятки тысяч людей от COVID-19 в Индии, в тех немногих местах, где его используют. Он привел к резкому сокращению заболеваемости в Мексике, Словакии и Зимбабве. Все было бы хорошо, если бы не события, развернувшиеся вокруг Главного научного сотрудника ВОЗ – талантливого ученого-женщины и врача (**Рис. 7**).

**Ивер(о)мектин: жизнь и судьба Главного научного сотрудника ВОЗ [70].** Доктор медицины, индийский педиатр и ученый **Сумия/Сумья Свамианатан** (1959) (**Рис. 7**) в октябре 2017 года была назначена заместителем Генерального директора во Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по наиболее актуальным Программам (DDP). Она известный и признанный во всем мире ученый в сфере борьбы с туберкулезом и ВИЧ, обладает 30-летним опытом лечебной и научной работы. Начиная со школы, она на протяжении всей жизни блестяще выполняла все, что ей поручали. Там, где она сама была инициатором развития актуальных программ в сфере здравоохранения Индии, все выполнялось с блеском и эффективностью. На протяжении всей своей карьеры Сумия/Сумья Свамианатан трудилась над тем, чтобы результаты научных исследований трансформировались на практике в эффективные программы. С марта 2019 года Свамианатан стала занимать должность главного ученого во Всемирной организации здравоохранения.



**Рис. 7.** Сумья Свамианатан Ядав (Soumya Swaminathan Yadav, род. 1959) – индийский врач-педиатр и научный сотрудник. Ныне Главный Научный Сотрудник ВОЗ. Она впервые высказала предположение, что коллективный иммунитет определенно не появится в этом году. Даже если коллективный иммунитет разовьется в нескольких странах, «он не защитит людей по всему миру». Однако в связи с тем, что семейство коронавирусов быстро изменяется/мутирует вряд ли вообще удастся достигнуть коллективного иммунитета.

### **Сведения из официальных источников [65–70].**

«В записке адвоката-женщины Дипали Оджа, поданной от имени Индийской ассоциация адвокатов (ИВА), Главный научный сотрудник ВОЗ доктор Свамианатан обвинялась в причастности к масштабной кампании дезинформации. На основании этих обвинений доктор Свамианатан, была вызвана в суд за должностные преступления в дискредитации ИВЕРМЕНТИНА с целью лоббирования интересов кампаний и фармацевтической промышленности по производству вакцин...» «Правительство штата Индии Тамил Наду опубликовало новые протоколы лечения пациентов с *COVID-19*, в которых не учитывалось использование ИВЕРМЕНТИНА, хотя он был включен в предыдущую версию схемы лечения пациентов». В новых протоколах были описаны три категории пациентов с *COVID-19* в зависимости от уровня необходимой им помощи: *на дому, первичная помощь* и *добольничная помощь*. «Эти рекомендации исключали больничную помощь для некоторых пациентов, у которых тесты для определения категории – сатурация кислорода ( $SpO_2$ ) и частота дыхания – не выходили за пределы критических значений». «В качестве прецедента в записке также упоминались больничные дела прокурора США Ральфа Лориго в Нью-Йорке, где требовалось постановление суда для получения ИВЕРМЕКТИНА умирающим пациентам с *COVID-19*. Во многих случаях, *когда такие пациенты были в коме, после назначения ИВЕРМЕКТИНА судом, пациенты выздоравливали*».

Стоит обратить внимание на то, что вплоть до последнего времени не было ни одного официально утвержденного препарата, разработанного специально для лечения *COVID-19*. Хотя лекарства от малярии, несмотря на побочные эффекты (повреждения гепатоцитов – клеток печени), использовали неофициально также для лечения пациентов с *COVID-19* в разных странах мира, включая Индию, Китай, США и Россию.

Самое ужасное в этой истории «если Главный научный сотрудник ВОЗ доктор Сумья/Сумья Свамианатан будет признана виновной в ходе судебного разбирательства в Индии, то она может быть приговорена к смертной казни или пожизненному заключению». Адвокат Дипали Оджа, ведущий/ведущая поверенный/поверенная Индийской ассоциации юристов, пригрозила привлечь доктора Свамианатана к ответственности за «каждую смерть», вызванную ее действиями или бездействием». Таким образом, д-р Свамианатан «обвиняется в проступках, поскольку она – Главный научный сотрудник ВОЗ – использовала свое положение, по мнению адвоката Дипали Оджа, для лоббирования особых интересов фармакологических кампаний по производству вакцин против *COVID-19*»... ***В подобных случаях нередко приговоры приводят в исполнение, а потом выясняется, что приговоренный не повинен.*** Стоит также обратить особое

внимание на то, что механизмы эффективного действия ивер(о)мектина в то время не были известны. В настоящее время многое по-прежнему остается неизвестным. Основываясь на нашем опыте работы постараемся проанализировать возможные механизмы эффективного действия ивер(о)мектина и дисульфирама [65–70].

### **Возможные механизмы эффективного действия ивер(о)мектина и дисульфирама.**

Анализировать эти механизмы было бы невозможно, если не было предварительного нашего опыта с проблемой токсического воздействия нитратно-нитритного фона [71–89]. Естественно возник вопрос: не влияют ли это соединения на содержание активных форм азота и кислорода, а также на сохранность *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала*? Химические формулы этих веществ оказались таковы, что ивер(о)мектин является полициклическим соединением, в котором присутствуют С, О и ОН-группы: всего в этом соединении 28 атомов кислорода (О), 146 атомов водорода (Н) и 95 атомов углерода (С). Это соединение, являясь полициклическим с ОН-группами, действует подобно фенолам биологического происхождения, ингибирует все свободнорадикальные процессы, а дисульфирам (он же диэтилдитиокарбамат) является ловушкой NO. Последнее соединение (NO) и ивер(о)мектин – так же, как и NO, были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине (соответственно в 1998 и 2015 годах). Однако эти соединения обладают защитным действием лишь в узком интервале концентраций. Поэтому очень строгая дозировка и краткий период лечения являются определяющими при лечении пациентов этими веществами. В настоящее время ивер(о)мектина и дисульфирам не получили статуса соединений, разрешенных при COVID-19. Есть у этих соединений, как ярые сторонники, так и противники. Тем не менее, следовать за одной или другой группой сторонников или противников использования этих веществ нельзя [64–70]. Необходимы серьезные исследования, которые со временем могут дать окончательный ответ на вопрос об эффективности, надежности и целесообразности использования этих веществ [40–49].

### **Выводы**

1. Самый главный вывод обобщающей концепции развития патологических процессов состоит в том, что *резонансное (мощное одновременное повышение содержания активных форм кислорода и азота) во многих случаях является причиной тяжелых случаев течения патологических процессов и заболеваний*. Это может произойти при нарушении *циклической регуляции содержания активных форм азота и кислорода (одновременном оксидативном и нитрозативном стрессе)*. Именно в этих случаях происходит образование «бинарного оружия» для клеток – диоксида азота (NO<sub>2</sub>), ОН-радикалов, пероксинитритов, участвующих в свободно радикальных цепных реакциях, приводящих к гибели клеток, тканей и организма в целом. В то же время снижение хотя бы одного компонента *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала, а именно активных форм азота и/или активных форм кислорода* резко снижало вероятность гибели человека при негативном воздействии нитратно-нитритного фона существования человека или «цитокиновом шторме» при COVID-19.

2. *Циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала* защищают клетки тканей организма, а нарушения этих циклов является одной из существенных причин неврологических расстройств и других известных патологий.

3. Для того чтобы убедиться в справедливости сделанных выводов достаточно провести мысленный эксперимент и представить, *что произойдет, если наложить запрет на циклические процессы на любом уровне организации живой и неживой природы*. Ранее сформулированное единство *принципов цикличности и голографии* на всех структурно-функциональных уровнях живой и неживой природы дает основание полагать, что указанные выше принципы вместе с *атомарным принципом строения вещества* могут составить ядро современного естествознания и привести к созданию новой парадигмы в биологии и медицине XXI века.

### Заключение

Авторы считают, что анализ данных литературы и результатов собственных исследований позволяет высказать следующее заключение. Чтобы выжить в условиях *относительно высокого нитратно-нитритного фона, старения организма с неизбежными хроническими заболеваниями или любых пандемий (в том числе COVID-19)*, необходимо не допускать в организме одновременного развития *оксидативного и нитрозаптивного стресса*. Это необходимо для того, чтобы не было условий для образования «бинарного оружия» для клеток – непосредственного взаимодействия  $\text{NO}$  и  $\bullet\text{O}_2^-$ , минуя антиоксидантные системы и системы связывания  $\text{NO}$  и  $\bullet\text{O}_2^-$ . Защитную роль от биохимического «бинарного оружия» в живых организмах выполняют интактные циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала. Повреждение этих циклов под воздействием высоких концентраций  $\text{NO}$  и/или  $\bullet\text{O}_2^-$  может привести к тому, что защитная роль циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала может быть снижена либо полностью нивелирована/разрушена. И тогда начинаются неврологические расстройства и другие многочисленные известные патологии на фоне нарушения циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала, приводящие к ускоренному старению организма, хроническим заболеваниям, а также к преждевременному сокращению жизни человека.

Указанные выше циклы связаны с процессами дыхания, акцепторами электронов ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ,  $\text{O}_2$ ), энергетическими механизмами. Они составляют фундаментальные основы жизни и здоровья человека, и, влияют на среднюю продолжительность жизни населения. Это подтверждают многочисленные данные о том, что линейный рост количества врачей, поликлиник и больниц в СССР, вплоть до 1980 года не смогли остановить катастрофическое снижение средней продолжительности жизни в стране, несмотря на то, что каждый 4-й врач в мире был из СССР. В то же время снижение хотя бы одного компонента циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала, а именно активных форм азота и/или активных форм кислорода резко снижало негативное воздействие нитратно-нитритного фона существования человека. Действительно, у молодых и здоровых людей с относительно низким уровнем активных форм кислорода (из-за отсутствия хронических заболеваний) действие нитратно-нитритного фона проявлялось в значительно меньшей степени, чем у людей с хроническими заболеваниями, протекающими на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, иммунных и аутоиммунных заболеваний. Однако понижение нитратно-нитритного уровня вследствие снижения количества вносимых азотных удобрений в почву, привело к снижению социально-значимых заболеваний, росту средней продолжительности жизни даже у пожилых людей с теми хроническими заболеваниями, которые приводят к увеличению содержания активных форм кислорода, и, протекают на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, активации иммунных и аутоиммунных заболеваний. Реализация указанных выше идей привела к росту средней продолжительности жизни в СССР и обеспечила самый высокий десятилетний прирост населения СССР (24.1 млн. чел.) за все 69 лет существования страны. Если учесть, что этот рост численности населения проходил в эпоху Перестройки, на фоне развала СССР, пустых прилавков и низких цен на нефть, то становится очевидным, что это явление не является случайным, тем более, что до 1980 года на протяжении 18 лет снижалась средняя продолжительность жизни. Именно поэтому в Отчете академика-секретаря Отделения Физиологии АН СССР академика АН СССР П.Г. Костюка [53], предложенные меры по остановке 18-летнего снижения продолжительности жизни были отнесены к наиболее важным результатам, имеющим практическое значение за 20 лет работы Отделения Физиологии АН СССР (Рис. 4). Однако потом оказалось, что эти данные, полученные в ИВНД и НФ АН СССР/РАН, стали наиболее важным результатом, имеющим практическое значение за 69 лет работы Отделения Физиологии АН СССР, если судить по увеличению численности населения с 1980 по 1990 годы.

Развиваемые нами концепции продолжают теорию патологии клетки Р. Вирхова



(1821–1902), который, как нами ранее указывалось, написал следующие строки. «*Не жизнь в ненормальных условиях, не нарушение как таковое вызывает болезнь, напротив, болезнь начинается с недостаточности регуляторного аппарата*». Кроме того, эти концепции продолжают идеи и дело, которому служил Л.А. Орбели (1882–1958). Он считал, что «*мы (физиологи и патофизиологи – авт. статьи) мало считаемся с тем, что все процессы осуществляются циклически, и, каждый процесс имеет свою цикличность*». Эти слова им были написаны и высказаны незадолго до его кончины в 1958 году. Таким образом, все наши предложения, концепции и достижения были сформулированы, предложены и получены благодаря преемственной связи с идеями и достижениями отечественных и зарубежных ученых, ставших уже классиками науки XIX – XX в.

Пандемия *COVID-19* выявила высокую смертность у людей в возрасте 65+ с хроническими заболеваниями, протекающими на повышенном уровне *активных форм азота и кислорода в организме*, т.е. на фоне «*цитокинового шторма*», *оксидативного и нитрозативного стресса*. Именно в этих условиях появляется возможность *нарушения циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала*. Таким образом, сама пандемия *COVID-19* стала эффективным способом проверки высказанных нами идей, сформулированных концепций и предложений по снижению смертности в сотни раз от *COVID-19*, его штаммов, а также уменьшению неврологических повреждений и ментальных расстройств у различных пациентов [90]. Можно было ожидать, что снижение содержания *активных форм кислорода, активных форм азота* или *уменьшение их общего количества*, приведет к снижению смертности от этого опасного заболевания. Действительно, были выявлены препараты, снижающие смертность пациентов с *COVID-19* в сотни раз. Такими препаратами оказались *ивер(о)мектин* и *дисульфирам*. Несмотря на то, что механизм положительного действия этих веществ в литературе не был описан (или представлен), тем не менее, именно эти вещества оказались теми химическими соединениями, которые могут участвовать в регуляции содержания свободных радикалов. В настоящее время электроно-донорные и электроно-акцепторные свойства отдельных лекарственных средств против *COVID-19* активно исследуются. Какое из исследуемых веществ окажется более перспективным в настоящее время никто не может предсказать. Окончательный вывод можно сделать лишь со временем.

Отвечая на вопрос, *что такое болезнь с биологической точки зрения, и, как больного человека можно сделать здоровым*, мы говорим, что необходимо не допускать, чтобы в живых организмах одновременно повышались концентрации *активных форм азота и кислорода*. Ежедневная умеренная двигательная активность (5–10 км) улучшают кровообращение и снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний, приводящих к хронической гипоксии/ишемии. Ограничения в объемах потребляемой пищи снижают интенсивность свободно радикальных компонентов, связанных с метаболизмом. Достаточное количество антиоксидантов в живых организмах обеспечивают защиту клеток и организма в целом от повреждений  $\text{NO}_2$ ,  $\text{OH}$ -радикалами и пероксинитритами. Закаливания и холодовые воздействия снижают интенсивность свободно радикальных процессов. Естественно, что необходимо исключить курение ( $\text{NO}_2$  и не только!), снизить время пребывания в автомобильных пробках ( $\text{NO}_2$  и не только!), и, уменьшить нахождение в тех регионах, где относительно высокое содержание  $\text{NO}_2$  в воздухе. Не допускать и предотвращать воспалительные процессы в любой части тела. По возможности снижать вероятность развития иммунных и активации аутоиммунных процессов. Краткие гипоксические воздействия, связанные с задержкой дыхания, пребывание в горах, сопровождаемое физической нагрузкой, действуют почти так же, как и гипоксическое preconditionирование. Они повышают уровень регуляторных пептидов, обеспечивающих защитное действие в мозге и сердце, и, снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний и онкологических заболеваний. Если кратко назвать основную триаду, то это *голод, холод и антиоксиданты в умеренных количествах*.

Результаты более 40-летних исследований позволили расширить, обобщить и выйти на новое понимание нитритредуктазных механизмов гемсодержащих белков

[91], циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала [4–6, 93, 94], которые являются следствиями глобальных принципов цикличности и голографии [4–6, 93–95]. Впервые было сформулировано единство принципов цикличности и голографии на всех структурно-функциональных уровнях живой и неживой природы [5, 6, 93–95]. Эти принципы вместе с атомарным принципом строения вещества могут составить ядро современного естествознания [93–95]. Нарушение этих принципов при различных заболеваниях, включая неврологические, психические и травмы головного мозга [96–104], сопровождаются образованием тромбов, атеросклеротических бляшек [17–25], и, приводят к нарушениям памяти и психическим расстройствам, как во время COVID-19 [79, 90, 101–104], а также к ишемическим и геморрагическим инсультам [10, 17–25, 100 – 104].

**Работа выполнена при поддержке РАН и частично грантами РФФИ 17-15-01487 и РФФИ 17-00-00106**

### Список литературы

1. Давыдовский И.В. Вопросы локализации и органопатологии в свете лечения Сеченова – Павлова – Введенского. М.: Медгиз. 1954. 134 с.
2. Давыдовский И.В. Общая патология человека. М.: Медицина. 1969. 612 с.
3. Селье Г. Стресс без дистресса. М.: Прогресс. 1982. 124 с.
4. Reutov V.P., Sorokina E.G., Sukmansky O.I. Cycles of Nitric Oxide (NO), Superoxide Radical Anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) and Hydrogen Sulfur/Sulfur Dioxide ( $\text{H}_2\text{S}/\text{SO}_2$ ) in Mammals // *Current Research in Biopolymers*. 2020. 2. 112. DOI: 10.29011/CRBP-112.000012
5. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Сукманский О.И. Циклы газотрансмиттеров в организме млекопитающих. В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии Материалы Международной конференции. NT + M&Eс'2020. (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2020). Весенняя сессия. Под редакцией проф. Е.Л. Глориозова. 2020. С. 99–108. DOI: 10.47501/978-5-6044060-0-7.22 ; ISBN 978-5-6044060-0-7
6. Сукманский О.И., Реутов В.П. Газотрансмиттеры: физиологическая роль и участия в патогенезе заболеваний. Успехи физиологических наук. 2016. Т. 47. № 3. С. 30-58.
7. Крыжановский Г.Н. Детерминантные структуры в патологии нервной системы: М.: Медицина. 1980. 358 с.
8. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы: Руководство. М.: Медицина, 1997. 351 с. ISBN 5-225-02804-7.
9. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. Москва: Наука. 1972. 252 с.
10. Реутов В.П., Самосудова Н.В., Сорокина Е.Г. Модель глутаматной нейротоксичности и механизмы развития типового патологического процесса. Биофизика. 2019. Т.64. №2. С.316 – 336.
11. Сперанский А.Д. Элементы построения теории медицины (Редакторы М.Г. Дурмишьян, Д.Ф. Плещитый). М. Медгиз.1955. 583 с.
12. Ажипа Я.И. Нервы желез внутренней секреции и медиаторы в регуляции эндокринных функций. М.: Наука. 1981. 503 с.
13. Ажипа Я.И. Нервы желез внутренней секреции и медиаторы в регуляции эндокринных функций: Наука. 1976. 439 с.
14. Ажипа Я.И. Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса в биологии и медицине. М.: Наука.1983. 527 с.
15. Azhipa Ia.I., Filiashina G.A., Emel'ianenko I.N. Disturbances of the sensitivity of kidney tubules to aldosterone during neurodystrophy at different tissue levels. *Izv. Akad. Nauk SSSR Biol*. 1982. № 6. P. 819–826. PMID: 7175007.
16. Реутов В.П. Актуальные медико-биологические проблемы и малоизвестные

- страницы истории нейрофизиологии. «Eurasian Scientific Association» 2021. № 12 (82). 166 – 182.
17. Швалев В.Н., Реутов В.П., Рогоза А.Н. Нервная трофика и механизмы ее нарушения при сердечно-сосудистых заболеваниях: возможная роль оксида и диоксида азота. *Евразийское Научное Объединение*. 2016. Т.1. №3(15). С. 77–82.
  18. Швалев В.Н., Рогоза А.Н., Сергиенко В.Б., Реутов В.П., Аншелес А.А., Тарский Н.А., Юдаев А.А., Малыхина Т.В. Морфофункциональная диагностика возрастных нейродистрофических изменений организма, предшествующих внезапной сердечной смерти. *Морфологические ведомости*. 2016. Т. 24. № 4. С. 8–21.
  19. Швалев В.Н., Реутов В.П., Рогоза А.Н. и др. Развитие современных представлений о нейрогенной природе кардиологических заболеваний. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014. №1(55). С. 10–14.
  20. Швалев В.Н., Реутов В.П., Рогоза А.Н. и др. Анализ возрастных изменений нервной трофики сердечно-сосудистой системы в норме и в условиях патологии // *Морфологические ведомости*. 2012. №3. С.6-11.
  21. Швалев В.Н., Рогоза А.Н., Реутов В.П. и др. Развитие традиций казанской медицинской школы – изучение морфологических основ нервной трофики. *Казанский медицинский журнал*. 2014. Т. . 95. №2. С. 175–180.
  22. Швалев В.Н., Реутов В.П., Сергиенко В.Б., Рогоза А.Н., Масенко В.П., Аншелес А.А. Механизмы развития кардиологических заболеваний при возрастных нарушениях состояния нервной системы // *Казанский медицинский журнал*. 2016. Т.97. №4. С.598-606.
  23. Швалев В.Н., Рогоза А.Н., Тарский Н.А. и др. Внезапная сердечная смерть и морфофункциональная диагностика предшествующих возрастных нейродистрофических изменений организма. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2017. №1. С. 42–51.
  24. Реутов В.П., Охотин В.Е., Шуклин А.В., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С., Гурин В.Н. Оксид азота (NO) и цикл NO в миокарде: молекулярные, биохимические и физиологические аспекты. *Успехи физиологических наук*. 2007. Т. 38. № 4. С. 39–58.
  25. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Швалев В.Н., Космачевская О.В., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Свинов М.М., Косицын Н.С. Возможная роль диоксида азота, образующегося в местах бифуркации сосудов, в процессах их повреждения при геморрагических инсультах и образовании атеросклеротических бляшек. *Успехи физиологических наук*. 2012. Т. 43. № 4. С. 73–93.
  26. Черток В.М., Коцюба А.Е. Эндотелиальный (интимальный) механизм регуляции мозговой гемодинамики: трансформация взглядов. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2012. № 2(48). С. 17-26.
  27. Коцюба А.Е., Черток В.М. Пространственная организация серотонинергических и нитроксидергических нейронов в некоторых ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра человека. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010. № 4 (42). С. 43–46.
  28. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019 Jul 16;51(1):27-41. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025. PMID: 31315034; PMCID: PMC6831096.
  29. Dickson DW. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2018 Jan;46 Suppl 1(Suppl 1):S30-S33. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28780180; PMCID: PMC571820
  30. Dickson DW. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Aug 1;2(8):a009258. doi: 10.1101/cshperspect.a009258. PMID: 22908195; PMCID: PMC3405828.
  31. Robinson JL, Lee EB, Xie SX, Rennert L, Suh E, Bredenberg C, Caswell C, Van Deerlin VM, Yan N, Yousef A, Hurtig HI, Siderowf A, Grossman M, McMillan CT, Miller B, Duda JE, Irwin DJ, Wolk D, Elman L, McCluskey L, Chen-Plotkin A, Weintraub D, Arnold SE, Brettschneider J, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative disease concomitant

- proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated. Brain. 2018 Jul 1;141(7):2181-2193. doi: 10.1093/brain/awy146. PMID: 29878075; PMCID: PMC6022546.*
32. Rodriguez-Vieitez E, Nielsen HM. Associations Between APOE Variants, Tau and  $\alpha$ -Synuclein. *Adv Exp Med Biol. 2019;1184:177-186. doi: 10.1007/978-981-32-9358-8\_15. PMID: 32096038.*
33. Bouvier DS, Fixemer S, Heurtaux T, Jeannelle F, Frauenknecht KBM, Mittelbronn M. The Multifaceted Neurotoxicity of Astrocytes in Ageing and Age-Related Neurodegenerative Diseases: A Translational Perspective. *Front Physiol. 2022 Mar 17;13:814889. doi: 10.3389/fphys.2022.814889. PMID: 35370777; PMCID: PMC8969602.*
34. Martínez A. Electron Donor-Acceptor Capacity of Selected Pharmaceuticals against COVID-19. *Antioxidants (Basel). 2021 Jun 18;10(6):979. doi: 10.3390/antiox10060979. PMID: 34207391; PMCID: PMC8234383.*
35. Mei M, Tan X. Current Strategies of Antiviral Drug Discovery for COVID-19. *Front Mol Biosci. 2021 May 13;8:671263. doi: 10.3389/fmolb.2021.671263. PMID: 34055887; PMCID: PMC8155633.*
36. Liang Y, Dong B, Pang N, Hu J. Abamectin induces cytotoxicity via the ROS, JNK, and ATM/ATR pathways. *Environ Sci Pollut Res Int. 2020 Apr;27(12):13726-13734. doi: 10.1007/s11356-019-06869-2. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32034588.*
37. Zhou S, Wu H, Ning W, Wu X, Xu X, Ma Y, Li X, Hu J, Wang C, Wang J. Ivermectin has New Application in Inhibiting Colorectal Cancer Cell Growth. *Front Pharmacol. 2021 Aug 13;12:717529. doi: 10.3389/fphar.2021.717529. PMID: 34483925; PMCID: PMC8415024.*
38. Deng F, Xu Q, Long J, Xie H. Suppressing ROS-TFE3-dependent autophagy enhances ivermectin-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Cell Biochem. 2018 Sep 6. doi: 10.1002/jcb.27490. Epub ahead of print. PMID: 30187952.*
39. Catalani E, Giovarelli M, Zecchini S, Perrotta C, Cervia D. Oxidative Stress and Autophagy as Key Targets in Melanoma Cell Fate. *Cancers (Basel). 2021 Nov 18;13(22):5791. doi: 10.3390/cancers13225791. PMID: 34830947; PMCID: PMC8616245.*
40. Tsanni A. African scientists race to test COVID drugs - but face major hurdles. *Nature. 2021 Nov;599(7883):25-27. doi: 10.1038/d41586-021-02995-5. PMID: 34732862.*
41. Borio LL, Bright RA, Emanuel EJ. A National Strategy for COVID-19 Medical Countermeasures: Vaccines and Therapeutics. *JAMA. 2022 Jan 18;327(3):215-216. doi: 10.1001/jama.2021.24165. PMID: 34989782*
42. Kirtipal N., Bharadwaj S., Kang S.G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect Genet Evol. 2020. V.85. P. 104502. DOI: 10.1016/j.meegid. 2020.104502. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32798769; PMCID: PMC7425554.*
43. Shah V.K., Firmal P., Alam A., Ganguly D., Chattopadhyay S. Overview of Immune Response During SARSCoV-2 Infection: Lessons From the Past. *Front Immunol. 2020 11:1949. doi: 10.3389/fimmu.2020.01949. PMID:32849654; PMCID: PMC7426442.*
44. Chen B, Tian EK, He B, Tian L, Han R, Wang S, Xiang Q, Zhang S, El Arnaout T, Cheng W. Overview of lethal human coronaviruses. *Signal Transduct Target Ther. 2020. 5(1):89. doi: 10.1038/s41392-020-0190-2. PMID:32533062; PMCID: PMC7289715.*
45. Rathore JS, Ghosh C. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), a newly emerged pathogen: an overview. *Pathog Dis.2020. 78(6):ftaa042. doi: 10.1093/femspd/ftaa042. PMID: 32840560; PMCID: PMC7499575.*
46. Masood N, Malik SS, Raja MN, Mubarik S, Yu C. Unraveling the Epidemiology, Geographical Distribution, and Genomic Evolution of Potentially Lethal Coronaviruses (SARS, MERS, and SARS CoV-2). *Front Cell Infect Microbiol. 2020. 10:499. doi: 10.3389/fcimb.2020.00499. PMID: 32974224; PMCID: PMC7481402.*
47. Lvov DK, Alkhovsky SV. Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus

- Sarbecovirus*), and *MERS-CoV* (subgenus *Merbecovirus*). *Vopr Virusol.* 2020. 65(2). P. 62–70. doi: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70. PMID: 32515561.
48. Asrani P, Hasan GM, Sohal SS, Hassan MI. *Molecular Basis of Pathogenesis of Coronaviruses: A Comparative Genomics Approach to Planetary Health to Prevent Zoonotic Outbreaks in the 21st Century.* *OMICS.*2020. 24(11). P. 634–644. doi: 10.1089/omi.2020.0131. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32940573.
49. Leitner T, Kumar S. *Where Did SARS-CoV-2 Come From?* *Mol Biol Evol.* 2020. 37 (9). P. 2463–2464. doi: 10.1093/molbev/msaa162. PMID: 32893295; PMCID: PMC7454771.
50. Tiwari R, Dhama K, Sharun K, Iqbal Yattoo M, Malik YS, Singh R, Michalak I, Sah R, Bonilla-Aldana DK, Rodriguez-Morales AJ. *COVID-19: animals, veterinary and zoonotic links.* *Vet Q.* 2020. 40(1): P.169–182. doi: 10.1080/01652176.2020.1766725. PMID: 32393111; PMCID: PMC7755411.
51. Lundberg J.O., Gladwin M.T., Shiva S., Ahluwalia A., Webb A.J., Benjamin N., Bryan N.S., Butler A., Cabrales P., Fago A., Feelisch M., Ford P.C., Freeman B.A., Frenneaux M., Friedman J., Kelm M., Rassaf T., Kevil C.G., Kim-Shapiro D.B., Kozlov A.V. et al. *Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics.* *Nature chemical biology.* 2009. Vol. 5. № 12. P. 865-869.
52. Реутов В.П. *Средняя продолжительность жизни в России и программа «сохранения населения и сбережения народа».* *Евразийское научное объединение.* 2017. 1 (23). С.56–69.
53. Костюк П.Г., Светайло Э.Н., Ланге К.А. *Физиологические науки в Академии наук СССР, 1963–1983 гг. Организация, некоторые итоги и перспективы развития.* Л.: Наука. Ленинградское Отделение. 1983. 45 с.
54. Il'nitskiĭ A.P., Reutov V.P., Ryzhova N.I., Kolpakova A.S., Deriagina V.P., Nekrasova E.A., Savluchinskaja L.A., Travkin A.G. *Modifying effect of nitrites on pulmonary blastogenesis and viral leukogenesis in mice: role of nitric oxide and dioxide.* *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 2000. №7. P.11–16. PMID: 10961141.
55. Кондакова И.В., Загребельная Г.В., Реутов В.П. *Влияние пероксидных радикалов и оксида азота на пролиферативную активность опухолевых клеток.* *Известия Национальной Академии Наук Беларуси. Серия биологических наук.* 2003. №1. С.78–82.
56. Il'nitskiy A.P., Ryzhova N.I., Kolpakova A.S. et al. *Urethan-induced pulmonary adenoma and Rausher's leukemia modified by sodium nitrite in mice: a possible role for nitric oxide and nitric dioxide // Experimental oncology.* 1997. V.19. №2. P.101-109.
57. Реутов В.П., Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Голубева И.С. *Активность нейтрофилов крови и перитонеальных макрофагов в процессе развития опухолей у мышей: возможная роль активных форм кислорода и оксида азота // Евразийское Научное Объединение.* 2016. Т.1. №1(13). С.64–69.
58. Дерягина В.П., Реутов В.П. *Модулирование образования активных форм азота ингредиентами растительных продуктов при ингибировании канцерогенеза // Успехи молекулярной онкологии.* 2019. Т.6. №1. С.18–36. DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-18-36.
59. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V. et al. *Functional activity of effector cells of innate immunity in tumor-bearing mice.* *Modern Science.* 2016. №11. P. 69–76.
60. Реутов В.П., Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Савлучинская Л.А., Голубева И.С. *Растительные полифенолы – модуляторы образования оксида азота при канцерогенезе.* В сборнике: *НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ, БИОЛОГИИ, ФАРМАКОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ. Материалы Международной конференции NT + M&Eс`2019. Весенняя сессия.* 2019. С. 179-187.
61. Кушаковский М.С. *Клинические формы повреждения гемоглобина.* Ленинград: Медицина. Ленингр. отд-ние, 1968. 325 с.
62. *Страна Советов за 50 лет (Сборник статистических материалов) «Статистика, Москва, 1967».*

63. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2000. № 4. С. 35-41.
64. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. Медико-биологические аспекты проблемы COVID-19 и его штаммов: как можно снизить смертность в сотни раз, а также уменьшить неврологические повреждения и ментальные расстройства у пациентов с COVID-19? *Евразийское научное объединение*. №12 (82) С. 117–133. DOI: 10.5281/zenodo.5833160.
65. <https://www.mk.ru/science/2020/04/09/lekarstvo-ubivayushhee-koronavirus-za-48-chasov-okazalos-veterinarnym.html>
66. <https://nauka.tass.ru/nauka/13757429>
67. <https://covid19critical-care.com/ru/%D0%B8%D0%B2%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%BD-%D0%BF%D1%80%D0%B8-covid-19/>
68. [https://en.wikipedia.org/wiki/Ivermectin\\_during\\_the\\_COVID-19\\_pandemic](https://en.wikipedia.org/wiki/Ivermectin_during_the_COVID-19_pandemic)
69. <https://www.ndtv.com/india-news/coronavirus-ivermectin-efficacy-safety-most-important-top-who-scientist-warns-against-ivermectin-use-2439290/amp/1>
70. <https://ru.technoracy.news/%D0%98%D0%BD%D0%B4%D0%B8%D0%B9%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F-%D0%B0%D1%81%D1%81%D0%BE%D1%86%D0%B8%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F-%D0%B0%D0%B4%D0%B2%D0%BE%D0%BA%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B2-%D0%BF%D0%BE%D0%B4%D0%B0%D0%BB%D0%B0-%D0%B2-%D1%81%D1%83%D0%B4-%D0%BD%D0%B0-%D0%B3%D0%BB%D0%B0%D0%B2%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE-%D1%83%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE-%D0%B7%D0%B0-%D0%BA%D1%80%D0%B8%D1%82%D0%B8%D0%BA%D1%83-%D0%B8%D0%B2%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%B0/>
71. Косицын Н.С., Реутов В.П., Свинов М.М., Ионкина Е.Г., Сорокина Е.Г. Механизм морфо-функциональных изменений клеток тканей млекопитающих при гипоксии. *Молекулярная биология*. 1998. Т. 32. № 2. С. 369.
72. Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Сенилова Я.Е., Ходоров Б.И., Пинелис В.Г. Изменение содержания АТФ в зернистых клетках мозжечка при гиперстимуляции глутаматных рецепторов: возможное участие NO и нитритных ионов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2007. Т. 143. № 4. С. 419–422.
73. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Изменение ультраструктуры синаптических пузырьков глутаматергических синапсов под воздействием NO-генерирующего соединения NaNO<sub>2</sub>. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2008. Т. 146. № 7. С. 13–17.
74. Sorokina E.G., Reutov V.P., Senilova Ya.E., Khodorov B.I., Pinelis V.G. Changes in ATP content in cerebellar granule cells during hyperstimulation of glutamate receptors: possible role of NO and nitrite ions. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2007. Т. 143. № 4. С. 442–445.
75. Diakonova T.L., Reutov V.P. Effect of nitrite on the excitability of brain neurons in *Helix*. *Russian Journal of Physiology*. 1998. Т. 84. № 11. С. 1264-1272.
76. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П., Чайлахян Л.М. Возможное участие оксида азота в межнейронном взаимодействии. *Доклады Академии наук*. 2001. Т. 378. № 3. С. 417-420.
77. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Роль гликогена отростков глиальных клеток мозжечка в условиях его повреждения нитритом натрия *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010. Т. 150. № 8. С. 212-215.

78. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Нейро-глиальные контакты в молекулярном слое мозжечка при стимуляции параллельных волокон в присутствии оксида азота (модель инсульта) *Морфология*. 2006. Т. 129. № 2. С. 84.
79. Reutov V.P., Sorokina E.G., Samosudova N.V., Okhotin V.E. Pathogenesis of Neurological and Mental Disorders in Patients with Covid-19: Possible Role of Reactive Nitrogen and Oxygen Species. *International Journal of Psychiatry*. 2021. V. Vol. 6. N. 2. 33–42. DOI: 10.33140/IJP.06.02.03.
80. Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Averianova N.S. et al. Polymorphism of the APOE Gene and Markers of Brain Damage in the Outcomes of Severe Traumatic Brain Injury in Children. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2021. V. 51. N. 1. P. 28-35. DOI: 10.1007/s11055-020-01035-5.
81. Sorokina E.G., Semenova Zh.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, Supplementum*. 2021. V. 131. P. 103-107. DOI: 10.1007/978-3-030-59436-7\_22.
82. Sorokina E.G., Semenova Z.B., Averianova N.S. et al. ApoE gene polymorphism and markers of brain damage in the outcomes of severe traumatic brain injury in children. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2020. V. 120. N. 4. P. 72-80. DOI: 10.17116/jnevro202012004172.
83. Reutov V.P., Samosudova N.V., Sorokina E.G. A Model of Glutamate Neurotoxicity and Mechanisms of the Development of the Typical Pathological Process. *Biophysics (Russian Federation)*. 2019. V. 64. N. 2. P. 233-250. DOI: 10.1134/S0006350919020143.
84. Samosudova N., Reutov V.P. Ultrastructural Changes in the Frog Brain in the Presence of High Concentrations of Glutamate and an NO-Generating Compound. *Biophysics (Russian Federation)*. 2018. V. 63. N. 3. P. 402-415. DOI: 10.1134/S0006350918030211.
85. Kuropteva Z.V., Reutov V.P., Baider L.M., Krushinsky A.L. Complexes of nitric oxide with hemoglobin and paramagnetic metalloenzymes in the brain and blood of mammals after intermittent hypoxia. *Zhurnal Nevrologii i Psihiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2016. V. 116. N. Special Issue 8. P. 9-16. DOI: 10.17116/jnevro2016116829-16.
86. Samosudova N., Reutov V.P. Plastic Rearrangements of Synapse Ultrastructure in the Cerebellum in Toxicity due to Glutamate and NO-Generating Compounds. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2016. V. 46. N. 7. P. 843-848. DOI: 10.1007/s11055-016-0320-z.
87. Krushinsky A.L., Kuzenkov V.S., Dyakonova V.E. et al. Inhibitors of neuronal and inducible nitric oxide synthase enhance the protective effect of short-term adaptation to hypoxia in Krushinsky-Molodkina rats. *Biology Bulletin*. 2015. V. 42. N. 1. P. 67-73. DOI: 10.1134/S1062359015010057.
88. Kuzenkov V., Krushinskii A.L., Reutov V.P. Effect of cation type and concentration of nitrates on neurological disorders during experimental cerebral ischemia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013. V. 155. N. 6. P. 748-751. DOI: 10.1007/s10517-013-2243-9.
89. Kuzenkov V., Krushinskii A.L., Reutov V.P. Potassium nitrate effect on the development of neurological disorders in experimental brain ischemia. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2013. V. 68. N. 1. P. 1-4. DOI: 10.3103/S0096392513010045.
90. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты проблемы Covid-19 и его штаммов: как можно снизить смертность в сотни раз, а также уменьшить неврологические повреждения и ментальные расстройства у пациентов с Covid-19? *Евразийское научное объединение*. 2021. 12 (82) DOI: 10/5281/zenodo.5833160
91. Реутов В.П., Ажипа Я.И., Каюшин Л.П. Кислород как ингибитор нитритредуктазной активности гемоглобина. *Известия Академии наук СССР. Серия биологическая*. 1983. №3. С.408 – 418.
92. Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. Экологические и медико-биологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами. *Физиология человека*. 1990. Т.16. №3. С.131–150.

93. Реутов В.П., Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности. *Биохимия*. 2002. Т.67. №3. С.353–376.
94. Reutov V.P. *Biochemical Predetermination of the NO-Synthase and Nitrite-Reductase Components of The Nitric Oxide Cycle*. *Biochemistry (Moscow)*. 1999. V.64. №5. P.528 – 542.
95. Reutov V.P., Schechter A.N. How in the 20th century physicists, chemists and biologists answered the question: What is life?. *Physics-Uspexhi*. 2010. V. 53. N. 4. P. 377-396. DOI: 10.3367/UFNe.0180.201004d.0393.
96. Reutov V.P., Sorokina E.G., Samosudova N.V., Okhotin V.E. Pathogenesis of Neurological and Mental Disorders in Patients with Covid-19: Possible Role of Reactive Nitrogen and Oxygen Species. *International Journal of Psychiatry*. 2021. Vol. 6. N. 2. 33–42. DOI: 10.33140/IJP.06.02.03.
97. Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Averianova N.S., Karaseva O.V., Arsenieva E.N., Lukanov V.I., Reutov V.P., Asanov A.Yu., Roshal L.M., Pinelis V.G. Polymorphism of the APOE Gene and Markers of Brain Damage in the Outcomes of Severe Traumatic Brain Injury in Children. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2021. V. 51. N. 1. P. 28-35. DOI: 10.1007/s11055-020-01035-5.
98. Sorokina E.G., Semenova Zh.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, Supplementum*. 2021. V. 131. P. 103-107. DOI: 10.1007/978-3-030-59436-7\_22.
99. Sorokina E.G., Semenova Z.B., Averianova N.S., Karaseva O.V., Arsenieva E., Reutov V.P., Asanov A.Y., Roshal L.M., Pinelis V.G. ApoE gene polymorphism and markers of brain damage in the outcomes of severe traumatic brain injury in children. *Zhurnal Nevrologii i Psichiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2020. V. 120. N. 4. P. 72-80. DOI: 10.17116/jnevro202012004172.
100. Kuropteva Z.V., Reutov V.P., Baider L.M., Krushinsky A.L. Complexes of nitric oxide with hemoglobin and paramagnetic metalloenzymes in the brain and blood of mammals after intermittent hypoxia. *Zhurnal Nevrologii i Psichiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2016. V. 116. N. Special Issue 8. P. 9-16. DOI: 10.17116/jnevro2016116829-16.
101. Реутов В.П. COVID-19: четыре возможных сценария развития пандемии. Разновидности штаммов, влияющие на неврологические и ментальные расстройства у человека. *Евразийское Научное Объединение*. 2021. №10-2(80). С.117–153.
102. Реутов В.П. Актуальные медико-биологические проблемы и малоизвестные страницы истории нейрофизиологии. *Евразийское Научное Объединение*. 2021. №12-2 (82). С. 166 – 182.
103. Реутов В.П. К вопросу о механизме ультраструктурных изменений в центральном звене передачи сигнала между нейронами – синапсе – при обучении, функциональной гипоксии, а также при ишемии/гипоксии. Восстанавливая традиции посмертной славы: Памяти Н.С. Косицына (16.05.1934 – 19.08.2020) – неординарного ученого, человека, педагога и популяризатора науки. *Евразийское Научное Объединение*. 2020. №10-3 (68). С. 183–214.
104. Реутов В.П. Анализ роли вегетативных симпатических и парасимпатических нервов в сердечно-сосудистой системе. *Научные достижения и портреты ученых России в интерьере разных эпох/времен*. *Евразийское Научное Объединение*. 2020. №12-3 (70). С. 152-177.

**Сведения об авторах**

**Валентин Палладиевич Реутов,**

д.б.н., в.н.с.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,

Москва, Россия

E-mail: valentinreutov@mail.ru

**Information about authors**

**Valentin Palladievich Reutov,**

Doct. Biol. Sci., PhD,

the leader researcher, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

E-mail: valentinreutov@mail.ru



**Елена Геннадьевна Сорокина,**

*к.б.н., в.н.с.*

*Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей МЗ РФ,*

*Москва, Россия*

*E-mail: sorokelena@mail.ru*

**Elena Genadievna Sorokina,**

*PhD, the leader researcher,*

*«National Medical Research Center for Children's Health», Russian Ministry of Health*

*Moscow, Russia*

*E-mail: sorokelena@mail.ru*

УДК 616.062

ГРНТИ 76.03.31, 34.39.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.301-310

<sup>1</sup>Е. Г. Сорокина, <sup>1</sup>С. А. Афанасьева, <sup>2</sup>О. В. Карасева,

<sup>2</sup>Ж. Б. Семенова, <sup>1</sup>О. В. Глоба, <sup>3</sup>В. П. Реутов, <sup>1</sup>В. Г. Пинелис

<sup>1</sup>ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России

<sup>2</sup>НИИ неотложной детской хирургии и травматологии  
Департамента здравоохранения

<sup>3</sup>ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

### **МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АЛЬБУМИН КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ОКСИДАТИВНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ- ГИПОКСИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ МОЗГА И РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ**

*В статье обсуждаются данные литературы о связи модифицированного альбумина (ИМА) и ишемических/гипоксических повреждений мозга и других органов. Представлены данные о взаимосвязи между повышением содержания ИМА и нарушениями связывания металлов сывороточным альбумином. Такие явления наблюдаются в ходе процессов, сопровождающихся оксидативным и нитрозативным стрессом.*

**Ключевые слова:** *модифицированный альбумин, нитрозативный и оксидативный стресс, гипоксия/ишемия, 3-нитротирозин*

**E G Sorokina, O V Karaseva, S A Afanasyeva, O V Globa,**

**Z B Semenova, V P Reutov, V G Pinelis**

«National Medical Research Center for Children's Health»,  
Russian Ministry of Health

Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology  
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences

### **MODIFIED ALBUMIN AS AN INDICATOR OF OXIDATIVE STRESS IN ISCHEMIC-HYPOXIC INJURIES OF THE BRAIN AND VARIOUS ORGANS**

*The article discusses the literature data on the relationship of modified albumin by ischemia (IMA) and nitrosative stress (nitroalbumin/nitrotyrosine) to the ischemic/hypoxic damage of the brain and other organs. Data on the association of an increase in the content of IMA with a violation of the binding of serum albumin of metals, which is observed in processes accompanied by oxidative oxygen and nitrosative stress, are presented.*

**Key words:** *modified albumin, nitrosative and oxygen stress, hypoxia/ischemia, nitrotyrosine*

#### **Введение**

Альбумин составляет около 55–60 % от всех белков, содержащихся в плазме крови и на 80 % определяет коллоидно-осмотическое давление плазмы. Общая площадь поверхности молекул сывороточного альбумина очень велика, поэтому они особенно хорошо подходят для выполнения функции переносчиков многих транспортируемых кровью и плохо растворимых в воде веществ. Предполагаемая способность быстро

увеличивать внутрисосудистый объем при низких объемах инфузии, наряду с ограничением отека мозга путем увеличения внутрисосудистого онкотического давления определяет выигрыш применения альбумина в качестве жидкости для инфузионной нейрореанимации [1]. Изменение структуры сывороточного альбумина (СА) приводит к потере некоторых транспортных свойств альбумина и к нарушению связывания этого основного белка крови с металлами, а также с такими веществами как билирубин, жирные кислоты, соли желчных кислот, липидные гормоны и некоторые лекарства (антибиотики и сульфаниламиды).

Указанные выше изменения структуры альбумина связаны с посттрансляционными изменениями (окисление, гликирование, карбамилрование, нитрозилирование, гуанилирование, димеризация и т.д.), в которых оксидативный и нитрозативный стресс занимают ведущее место [2, 3]. При гипоксии/ишемии и снижении pH в результате метаболических нарушений, связанных с различными заболеваниями, в крови начинают преобладать новые варианты альбумина, такие как «ишемией модифицированный альбумин» (ИМА) и нитро-альбумин [4–6]. ИМА образуется в результате воздействия активных форм азота и кислорода на альбумин во время ишемии. Поскольку период полураспада сывороточного альбумина (СА) человека составляет приблизительно 2–3 недели, ИМА отражает как интенсивность процессов воздействия активных форм азота и кислорода, так и pH в тканях, что представляет аналогию взаимосвязи между концентрациями глюкозы и гликированного гемоглобина в крови.

Оценка содержания ИМА основывается на данных снижения связывания N-концевого аминокислотного участка альбумина двухвалентных металлов ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$ ) [4, 7]. N-концевая последовательность СА (Asp1-Ala2-His3-Lys4) является очень чувствительной к биохимическим изменениям, вызываемых окислительным стрессом и особенно к увеличению в крови и тканях реактивных форм кислорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ) [4,8]. Эти радикалы могут повреждать структуру СА, вызывая удаление двух или трех N-концевых аминокислот, способствуя таким образом высвобождению в кровь ионов металлов. Образование реактивных форм оксида азота ( $\cdot\text{NO}$ ) (пероксинитрит –  $\text{ONOO}^-$  и двуокись азота  $-\text{NO}_2$ ) приводит к образованию S-нитрозоцистеина, нитрованию тирозиновых остатков СА и повышению концентрации 3-нитротирозина (3-NT, NT) в крови [9].

Некоторые характеристики альбумина дают возможность использовать его в составе инфузионной реанимационной жидкости. В дополнение к ранее упомянутым свойствам, альбумин используется как средство, улучшающее мозговую микроциркуляцию и уменьшающее тромбообразование в ишемизированном мозге. В практике нейрореанимации пациентов с черепно-мозговыми травмами (ЧМТ) особенно привлекательной является способность альбумина ограничивать отек мозга [10]. Однако до сих пор не ясно, всегда ли введение раствора альбумина в кровь оказывает положительное терапевтическое действие у пациентов с ЧМТ. В связи с этим диагностика содержания ИМА, основанная на быстром и простом методе оценки связывания альбумина с металлами, а также определение 3-NT в крови может использоваться в реанимации для прогноза состояний при ишемическом повреждении мозга, сердца, почечных заболеваний, респираторного-дистресс синдрома (РДС) у новорожденных и многих других состояний, сопровождающихся гипоксией/ишемией. Особую роль определение ИМА может иметь в случаях введения альбумина в организм при ЧМТ у детей.

**Цель работы.** Проанализировать данные литературы о роли модифицированного альбумина в прогнозах исходов при заболеваниях с нарушениями мозгового и общего кровообращения и получить предварительные данные о содержании ИМА и 3-нитротирозина в крови детей с ЧМТ и с прогрессирующими неврологическими заболеваниями.

**Анализ данных литературы** показывает, что при различных заболеваниях, сопровождающихся гипоксией/ишемией мозга и других тканей (при инфарктах, инсультах, кардиоваскулярной патологии, эмболии легких, ишемии брыжеечной артерии, РДС у новорожденных детей, интоксикациях и тяжелых повреждениях почек), в сыворотке крови увеличивается содержание ИМА [11–15]. Этот факт отмечен при остром коронарном синдроме [16, 17], хронической сердечной недостаточности [18], кардиомиопатии [19, 20], при ишемическом инсульте [21–23]. Показано, что образование метгемоглобина и отравление СО также способствует росту содержания ИМА [24]. Увеличение ИМА находят при неблагоприятно протекающей беременности [25–31] и гипоксической/ишемической энцефалопатии у новорожденных детей [32]. Наиболее интересными для нас работами являются исследования, посвященные способности ИМА выявлять степень повреждения мозговой ткани. Так, в работе Demirçi et al. [33] было показано, что, чем больший объем повреждений, регистрируемый на МРТ при инсультах, тем более выраженное повышение ИМА в крови. Увеличение ИМА в крови пациентов с психическими расстройствами было показано в работах [34, 35], с нейро-дегенеративными заболеваниями – в работах [36–37]. Наиболее существенное увеличение уровня ИМА было найдено у больных с болезнью Альцгеймера [37] и у пациентов с черепно-мозговыми травмами [38]. Найденное повышение содержания ИМА при ЧМТ авторы объясняют потерей целостности ГЭБ, что в свою очередь, связано с повышением внутричерепного давления (ВЧД). Деструктивные процессы, протекающие на фоне повышенного ВЧД, связывают с активацией каспаз и металлопротеиназ, дисфункцией митохондрий, и их деэнергизацией, чрезмерной активацией глии, воспалительными реакциями и нарушением микроциркуляции [39–41]. В подтверждение этим предположениям Kara, Ramral et al. [42] показали, что повышенное внутримозговое давление у крыс вследствие ЧМТ, гематомы или отека головного мозга приводит к повышению уровня ИМА в крови.

Интересно отметить, что связь образования ИМА с увеличением ионов металлов в крови прослеживалась еще до появления разработанного Bar-Or, Lau and Winkler [7] метода определения ИМА по степени связывания СА с двухвалентными металлами. Так, в 1997 году Berenshtein, Mayer et al. [43] показали, что ионы металлов – меди и железа – увеличиваются в крови после ишемии сердца (в несколько раз) во время реперфузии. Причем, чем более длительная сердечная ишемия, тем большее повышение концентрации ионов металлов наблюдалось при реперфузии. Эти данные, полученные еще до внедрения методов определения ИМА, подтверждают механизм образования ИМА при ишемии, так как именно во время реперфузии возникают условия одновременной активации оксидативного и нитрозативного стресса, способствующие образованию повреждающих N-концевой участок СА свободных радикалов, вследствие чего СА теряет способность связывать металлы.

Во время гипоксии и ишемии происходит активация *NO-синтазной* и *нитритредуктазной компонент цикла оксида азота* [44, 45], и, в зависимости от тяжести и длительности гипоксии/ишемии, помимо возрастания концентрации нитратов и нитритов, образуется «коктейль» из высоко реактивных соединений  $\cdot\text{NO}/\text{NO}_2$ , и  $\cdot\text{OH}$ -радикалов, способных окислять и модифицировать альбумин. Реакция  $\cdot\text{NO}/\text{NO}_2$  с остатками цистеина (SH-группы переходят в S-NO) приводит к образованию S-нитрозоцистеина. Взаимодействие  $\cdot\text{NO}_2$  с OH-группой тирозина приводит к образованию феноксильного радикала тирозина, который является предтечей образования 3-нитротирозина белка альбумина (NOA и/или  $\text{NO}_2\text{SA}$ ), т.е. происходит нитрование тирозина по 3-му положению. В альбумине 6 остатков тирозина. Это делает его весьма чувствительным тестом для оценки интенсивности образования 3-нитротирозина (тирозиновые остатки являются наиболее предпочтительным субстратом для нитрования – атаки  $\cdot\text{NO}_2$ ). Именно NOA появляется в крови и окружающих тканях при внутривенном введении анионов пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ) [6, 46]. Гемоглобин и альбумин относятся к числу белков, участвующих в выведении  $\cdot\text{NO}$

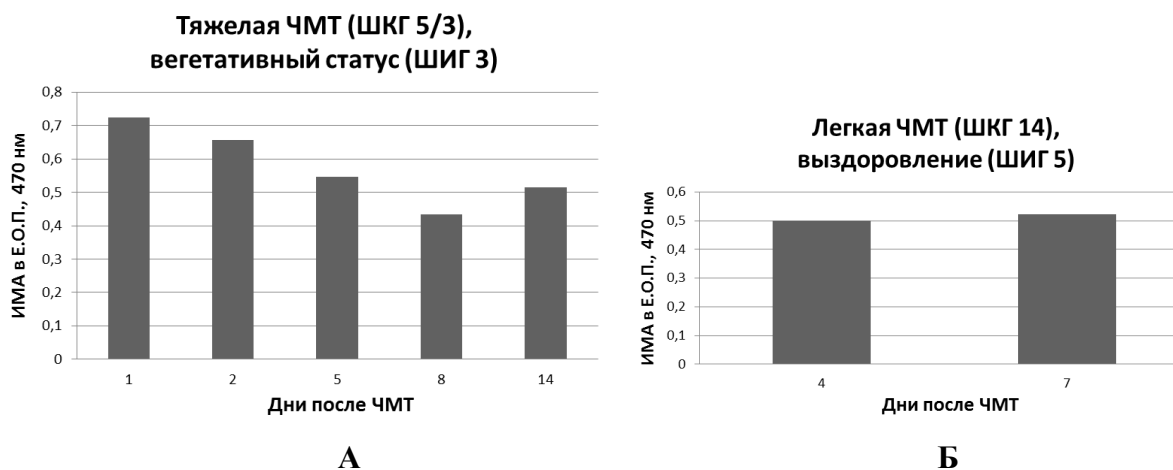
и ONOO<sup>-</sup>. Гемоглобин служит ловушкой ·NO внутри циркулирующих эритроцитов, но он не так эффективен против генерируемого извне аниона пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>), как альбумин. Таким образом, удаление ·NO/NO<sub>2</sub> и ONOO<sup>-</sup> альбумином, может играть роль важного защитного механизма, в основе которого лежит способность нитроальбумина лучше проходить через эндотелий сосудов и гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), чем это может делать не модифицированный токсическими производными NO альбумин [46]. Мы также показали, что у детей с ЧМТ регистрируется в крови отсутствующий в норме 3-нитротирозин, что по всей видимости, является следствием нитрозативного стресса сразу после тяжелой травмы и значительного повышения содержания NO в крови сосудов [47-51].

### Материалы и методы

Для анализа использовали сыворотку и плазму 24 детей с прогрессирующими неврологическими заболеваниями и 102 детей с легкой и тяжелой сочетанной ЧМТ. Сыворотки и плазма хранились при температуре -80°C до проведения анализа. ИМА оценивали с помощью микро-колориметрического метода, разработанного Bar-Or и др. на основе измерения несвязанного с белком кобальта после инкубации с сывороткой [7]. В лунку планшета добавляли 40 мкл сыворотки + 10 мкл 0,1% CoCl<sub>2</sub>; 2) Осторожно перемешивали и ждали 10 мин; 3) В качестве восстанавливающего вещества, дающего окраску, добавляли 10 мкл дитиотреитола (ДТТ) в концентрации 1,5 мг/мл; 4) Через 2 минуты добавляли 200 мкл 0,9% NaCl; 5) Далее проводили измерение оптической плотности при 470 нм с помощью планшетного спектрофотометра CLARIO Star. Результаты представляли в единицах поглощения (Е.О.П.) и считали нормальными значения Е.О.П. до тех пор, пока их значения не выходили за пределы верхней границей значения в Е.О.П.= 0,35. Содержание 3-нитротирозина в плазме крови оценивали с помощью иммуноферментного метода (Нусcult Biotech).

### Полученные результаты

На рисунке 1(А и Б) представлены биохимические данные детей, которые наглядно демонстрируют разницу в динамике содержания ИМА в крови. При тяжелой ЧМТ с неблагоприятным исходом уровень ИМА в 1-й день после травмы высокий и далее снижается, но продолжает оставаться выше нормы. При легкой ЧМТ содержание ИМА не меняется, оно все еще остается повышенным по сравнению с нормальными значениями. По всей вероятности, максимум ИМА наблюдается сразу после травмы. Это соответствует данным о том, что пик ИМА приходится на период сразу после ишемии/гипоксии [6]. Данные определения 3-нитротирозина у детей с разной тяжестью ЧМТ представлены на рисунке 2.



**Рис. 1.** Содержание модифицированного альбумина в сыворотке крови детей с черепно-мозговой травмой. А – ребенок с тяжелой ЧМТ с неблагоприятным исходом (вегетативный статус); Б – ребенок с легкой ЧМТ и хорошим восстановлением. Верхними границами в контроле считали величину Е.О.П.= 0,35.

Анализ результатов свидетельствует о том, что даже при легкой ЧМТ, у некоторых детей с сотрясением мозга в плазме крови 3-нитротирозин регистрируется уже в 1-й день. Чем тяжелее травма и более неблагоприятный исход, тем большее содержание 3-НТ определяется в крови пациента. Наибольшее содержание 3-НТ отмечалось в группе сочетанной тяжелой ЧМТ с неблагоприятным исходом.



**Рис. 2.** Содержание 3-нитротирозина в плазме крови детей с разной по тяжести черепно-мозговой травмой. А - дети с легкой ЧМТ (сотрясение мозга, 1й день после травмы); Б – дети с легкой (ЛЧМТ) и сочетанной ЧМТ(СЧМТ) с благоприятным исходом; В – дети с сочетанной ЧМТ с неблагоприятным исходом; данные представлены в М±m)

У детей с различными прогрессирующими неврологическими заболеваниями, с и без эпилепсии определение ИМА и 3-НТ показало, что наибольшие цифры характерны для группы детей с эпилептическими энцефалопатиями / энцефалопатией развития (таблица).

**Таблица.** Содержание нитротирозина в плазме крови детей с прогрессирующими неврологическими заболеваниями

НД - нейродегенеративные заболевания без эпилепсии, ЭЭ - эпилептическая энцефалопатия/энцефалопатия развития, ТС - туберозный склероз (комплекс туберозного склероза), \*p <0,05 с верхней границей контрольных величин, # p <0,05 с группами ЭЭ и ТС, НД и ТС; жирным цветом отмечено максимальное значение показателей среди 3х групп.

\*p <0,05 с верхней границей контрольных величин, # p <0,05 с группами ТС и НД; жирным цветом отмечено максимальное значение показателей среди 3х групп.

Нейродегенеративные заболевания (НД)	Эпилептические энцефалопатии/энцефалопатия развития (ЭЭ)	Туберозный склероз (ТС)
80 ± 19* (1 – 205 нМ)	<b>299 ± 189*# (35 – 1225 нМ)</b>	16 ± 5 (0 – 26 нМ)

**Выводы**

**1.** Анализ данных литературы показал, что определение ишемически модифицированного альбумина является хорошим прогностическим показателем для оценки наличия оксидативного и нитрозативного стресса у пациентов с гипоксией/ишемией;

**2.** Содержание ИМА повышено у детей с ЧМТ с первых дней после травмы, а у детей с судорожными состояниями наибольший уровень ИМА присутствует в группе пациентов с эпилептическими энцефалопатиями / энцефалопатией развития. У некоторых детей с повышенным ИМА отмечается и увеличение концентрации 3-нитротирозина в крови, что свидетельствует о наличии как оксидативного, так и нитрозативного стресса у этих пациентов.

**3.** В тяжелых случаях ЧМТ (с неблагоприятными исходами) отмечали одновременный рост оксидативного и нитрозативного стресса. Эти данные, как и многочисленные другие данные согласуются с теми обобщающими выводами, которые представлены нами в статье Реутова В.П. и Сорокиной Е.Г. в данном сборнике [52].

### **Заключение**

Авторы считают, что показатели содержания модифицированного альбумина и 3-нитротирозина могут быть перспективными маркерами в оценке состояния и прогноза для пациентов в остром состоянии после ЧМТ. Одновременное определение общего содержания нормального альбумина, белковых фракций сыворотки, «ишемией модифицированного альбумина» и нитроальбумина/нитротирозина могут не только расширить наши представления о влиянии ишемии/гипоксии на компоненты крови, но и оказать помощь в решении вопроса об использовании альбумина в качестве реанимационной терапевтической инфузионной жидкости. Выводы и заключение согласуются с полученными нами данными о том, что у детей с ЧМТ регистрируется в крови отсутствующий в норме 3-нитротирозин [45-47]. Мы полагаем, что это является следствием нитрозативного стресса, возникающего сразу после тяжелой травмы, вследствие значительного повышения содержания .NO/.NO<sub>2</sub> в крови сосудов. Это согласуется с тем, что при тяжелой ЧМТ со смертельным исходом уровень .NO/.NO<sub>2</sub>, а также уровень нитропроизводных во много раз превышал нормальный уровень и увеличивался с ухудшением состояния ребенка [53]. Данные литературы и наши собственные исследования позволяют нам предположить наличие оксидативного и нитрозативного стресса при многих сосудистых патологиях и различных прогрессирующих неврологических заболеваниях [50, 51].

### **Список литературы**

1. Yu, Yue-Tian et al. *Expert consensus on the use of human serum albumin in critically ill patients // Chinese medical journal.* 2021. No.134(14). P.1639-1654.
2. Watanabe H., Imafuku T., Otagiri M., and Maruyama T. *Clinical implications associated with the posttranslational modification - induced functional impairment of albumin in oxidative stress-related diseases // Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2017. No. 106(9). P. 2195–2203.
3. Chubarov A., Spitsyna A., Krumkacheva O. et al. *Reversible dimerization of human serum albumin // Molecules.* 2021. No. 26(1). P. 108.
4. Shevtsova A., Gordiienko I., Tkachenko V., Ushakova G. *Ischemia-Modified Albumin: Origins and Clinical Implications // Dis Markers.* 2021. No. 2021. Article ID 9945424. 18P.
5. Menon B, Ramalingam K, Krishna V. *Study of Ischemia Modified Albumin as a Biomarker in Acute Ischaemic Stroke // Ann Neurosci.* 2018. No.25(4). P. 187-190.
6. Wayenberg J. L., Ransy V., Vermeylen D., Damis E., Bottari S. P. *Nitrated plasma albumin as a marker of nitrative stress and neonatal encephalopathy in perinatal asphyxia // Free radical biology & medicine.* 2009. No. 47(7).P.975–982.
7. Bar-Or D., Lau E., and Winkler, J. V. *A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report // The Journal of emergency medicine.* 2000. No. 19(4). P. 311–315.
8. Christenson R.H., Duh S. H., Sanhai W. R., et al. *Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study // Clin Chem.* 2001. No. 47(3). P. 464-470.
9. Darwish RS, Amiridze N, Aarabi B. *Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury. J Trauma.* 2007;63(2):439-442.
10. Myburgh, J., Cooper, D. J., Finfer, S., Bellomo, R., Norton, R., Bishop, N., Kai Lo, S., & Vallance, S. *Saline or albumin for fluid resuscitation in patients with traumatic brain injury //The New England journal of medicine.* 2007. No. 357(9) P. 874–884.
11. Kahveci, Hasan et al. *Serum Ischemia-Modified Albumin in Preterm Babies with Respiratory Distress Syndrome // Indian journal of clinical biochemistry.* 2016. No. 31(1). P. 38-42.
12. Cho D.K., Choi J.O., Kim S.H., Choi J., Rhee I., Ki C.S., et al. *Ischemia modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary*

- vasospasm // *Coron Artery Dis.* 2007. No.18. P. 83-7.
13. Turedi S, Gunduz A, Mentese A, Karahan SC, Yilmaz SE, Eroglu O, Nuhoglu I, Turan I, Topbas M. Value of ischemia-modified albumin in the diagnosis of pulmonary embolism // *Am J Emerg Med.* 2007. No.25(7). P.770-773.
  14. Gunduz A., Turedi S., Mentese A. et al. Ischemia-modified albumin in the diagnosis of acute mesenteric ischemia: a preliminary study // *Am J Emerg Med.* 2008. No. 26(8). P. 202-205.
  15. Gunduz A., Turedi S., Mentese A., et al. Ischemia-modified albumin levels in cerebrovascular accidents // *Am J Emerg Med.* 2008. No.26(8). P. 874-878.
  16. Mishra B, Pandey S, Niraula SR, et al. Utility of Ischemia Modified Albumin as an Early Marker for Diagnosis of Acute Coronary Syndrome // *J Nepal Health Res Counc.* 2018. No.16(1). P.16-21.
  17. Gurumurthy P, Borra SK, Yeruva RK, Victor D, Babu S, Cherian KM. Estimation of Ischemia Modified Albumin (IMA) Levels in Patients with Acute Coronary Syndrome // *Indian J Clin Biochem.* 2014. No.29(3). P. 367-371.
  18. Ellidag H. Y., Eren E., Yilmaz N., and Cekin Y. Oxidative stress and ischemia-modified albumin in chronic ischemic heart failure // *Redox Report/* 2014. No.19(3). P. 118–123.
  19. Sbarouni E, Georgiadou P, Koutelou M, Sklavainas I, Panagiotakos D, Voudris V. Ischaemia-modified albumin in dilated cardiomyopathy // *Ann Clin Biochem.* 2009. No.46(Pt 3). P. 241-243.
  20. Ma Y, Kang W, Bao Y, Jiao F, Ma Y. Clinical significance of ischemia-modified albumin in the diagnosis of doxorubicin-induced myocardial injury in breast cancer patients // *PLoS One.* 2013. No. 8(11):e79426.
  21. Jena I, Nayak SR, Behera S, et al. Evaluation of ischemia-modified albumin, oxidative stress, and antioxidant status in acute ischemic stroke patients // *J Nat Sci Biol Med.* 2017. No. 8(1). P. 110-113.
  22. Menon B, Ramalingam K, Krishna V. Study of Ischemia Modified Albumin as a Biomarker in Acute Ischaemic Stroke // *Ann Neurosci.* 2018. No.25(4). P. 187-190.
  23. Okda M. A., Kabany R. A. E., Soliman H. S, and Kholy M. S. E. Ischemia-modified albumin for evaluating severity and predicting prognosis in patients with acute cerebrovascular Disease // *Menoufia Medical Journal.* 2020. No. 33(3). P. 1072–1076.
  24. Turedi, S., Cinar, O., Kaldirim, U., Mentese, A., Tatli, O., Cevik, E., Tuncer, S. K., Gunduz, A., Yamanel, L., & Karahan, S. C. Ischemia-modified albumin levels in carbon monoxide poisoning // *The American journal of emergency medicine.* 2011. No. 29(6). P. 675–681.
  25. Cengiz H, Dagdeviren H, Kanawati A, et al. Ischemia-modified albumin as an oxidative stress biomarker in early pregnancy loss // *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016. No. 29(11). P. 1754-1757.
  26. Özdemir S, Kıyıcı A, Balci O, Göktepe H, Çiçekler H, Çelik Ç. Assessment of ischemia-modified albumin level in patients with recurrent pregnancy loss during the first trimester // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011. No.155(2). P.209-212.
  27. D'souza JMP, Harish S, Pai VR, Shriyan C. Increased Oxidatively Modified Forms of Albumin in Association with Decreased Total Antioxidant Activity in Different Types of Hypertensive Disorders of Pregnancy // *Indian J Clin Biochem.* 2017. No. 32(2). P. 200-206.
  28. Papageorghiou AT, Prefumo F, Leslie K, Gaze DC, Collinson PO, Thilaganathan B. Defective endovascular trophoblast invasion in the first trimester is associated with increased maternal serum ischemia-modified albumin // *Hum Reprod.* 2008. No.23(4). P.803-806.
  29. Bambrana V, Dayanand CD, Kotur P. Relationship Between Xanthine Oxidase, Ischemia Modified Albumin, Nitric Oxide with Antioxidants in Non Pregnants, Pre and Post-delivery of Normal Pregnants and Preeclampsia // *Indian J Clin Biochem.* 2017. No.32(2). P. 171-178.
  30. Onat T, Aydoğan Kırmızı D, Başer E, et al. The relationship between oxidative stress and

- preeclampsia. The serum ischemia-modified albumin levels and thiol/disulfide homeostasis // Turk J Obstet Gynecol. 2020. No.17(2). P.102-107.*
31. Bahinipati J., Mohapatra P. C., and Pradhan T. Role of maternal serum ischemia modified albumin as a biochemical marker in preeclampsia // *Biomedical Research. 2014. No.25(2). P. 153–156.*
32. Talat, M. A., Saleh, R. M., Shehab, M. M., Khalifa, N. A., Sakr, M., & Elmesalamy, W. M. Evaluation of the role of ischemia modified albumin in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy // *Clinical and experimental pediatrics //2020. No. 63(8). P. 329–334.*
33. Demirci B., Karakilic M.E. Coskun A. et al. The brain ischemic volume correlation with the ischemic modified albumin level // *Bagcilar Med Bull. 2021. No. 6(1). P. 26-31*
34. Kim H. K., Andrezza A. C., Yeung P. Y., Isaacs-Trepanier C., and Young L. T. Oxidation and nitration in dopaminergic areas of the prefrontal cortex from patients with bipolar disorder and schizophrenia // *Journal of Psychiatry & Neuroscience. 2014. No. 39(4). P.276–285.*
35. Nedic Erjavec G., Konjevod M., Nikolac Perkovic M., et al. Short overview on metabolic approach and redox changes in psychiatric disorders. // *Redox Biol. 2018. No.14. P.178-186.*
36. Costa M., Horrillo R., Ortiz A. M et al. Increased albumin oxidation in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients // *The Journal of Alzheimer's Disease. 2018. No. 63(4). P.1395–1404.*
37. Altunoglu E., Guntas G., Erdenen F., et al. Ischemia-modified albumin and advanced oxidation protein products as potential biomarkers of protein oxidation in Alzheimer's disease // *Geriatr Gerontol Int. 2015. No.15(7). P. 872-880.*
38. Radwan T.A.M., Fahmy R.S., Emady M.F.M., et al. Ischemia-modified Albumin as a Biomarker for Prediction of Poor Outcome in Patients With Traumatic Brain Injury: An Observational Cohort Study // *J Neurosurg Anesthesiol. 2021. No.33(3). P.254-257.*
39. Tan H., Yang W., Wu C. et al. Assessment of the role of intracranial hypertension and stress on hippocampal cell apoptosis and hypothalamic-pituitary dysfunction after TBI // *Sci Rep. 2017. No.7(1). P.3805. Published 2017 Jun 19*
40. Zou X., Wu Z., Huang J., et al. The Role of Matrix Metalloproteinase-3 in the Doxycycline Attenuation of Intracranial Venous Hypertension-Induced Angiogenesis // *Neurosurgery. 2018. No. 83(6). P.1317-1327.*
41. Chen T., Zhu J., Wang Y.H., Hang C.H. ROS-Mediated Mitochondrial Dysfunction and ER Stress Contribute to Compression-Induced Neuronal Injury // *Neuroscience. 2019. No.416. P. 268-280.*
42. Kara I., Pampal H.K., Yildirim F., et al. Role of ischemic modified albumin in the early diagnosis of increased intracranial pressure and brain death // *Bratisl Lek Listy. 2017. No.118(2). P. 112-117.*
43. Berenshtein E, Mayer B, Goldberg C, Kitrossky N, Chevion M. Patterns of mobilization of copper and iron following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury // *J Mol Cell Cardiol. 1997. No. 29(11). P. 3025-3034.*
44. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная активность цикла оксида азота. *Биохимия. 1998. Т.63. №.7. С.1029 – 1040.*
45. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. Цикл окиси азота – новый метаболический цикл, участвующий в регуляции внутриклеточной сигнализации. *Мол. Биол. 1998. Т.32. №2. С.377 – 378.*
46. Predescu, D., Predescu, S., & Malik, A. B. (2002). Transport of nitrated albumin across continuous vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(21), 13932–13937.*
47. Zakirov R. S., Sorokina, E. G., Karaseva O. V., Semenova Z. B., Petrichuk S. V., Roshal L. M., Pinelis V. G. The blood lymphocyte mitochondrial dehydrogenase activity in children with traumatic brain injury // *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk. 2016. No. 5-6. P. 710–717.*
48. Sorokina E.G., Semenova Zh.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. Suppl. No. 131. С. 103-107.
49. Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Лукьянов В.И., Карасева О.В., Афанасьева С.А., Реутов В.П., Рошаль Л.М., Пинелис В.Г. Биохимические предикторы ранних и отдаленных исходов черепно-мозговой травмы у детей // В сборнике: *Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2020. Весенняя сессия. Москва, 2021. С. 154-160.*
50. Reutov V.P., Sorokina E.G., Davydova L.A., Chertok V.M., Sukmansky O.I., Pinelis V.G. The role of nitric oxide and superoxide anion radical cycles in cerebral small vessels pathology // In "Understanding and treating cerebral small vessel disease (A. Gonzalez-Querdo, S. Dambinova, K. Betterman, Eds. NOVA. Medicine and Health, New York 2021 chapter 3. P. 53 – 69.
51. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. Оксид азота в кровеносных сосудах в мозге в норме и при гипоксии/ишемии. В сборнике: *Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2020. Весенняя сессия. Москва, 2021. С. 109-136.*
52. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. Неврологические расстройства и другие известные патологии на фоне нарушений циклов оксида азота и супероксида // В сборнике: *Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2022. Весенняя сессия. Москва, 2022. С.*
53. Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Bazarnaya N.A., et al. Autoantibodies to glutamate receptors and products of nitric oxide metabolism in serum in children in the acute phase of craniocerebral trauma // *Neurosci Behav Physiol*. 2009. No. 39(4). P. 329-334.

**Сведения об авторах**

**Елена Геннадьевна Сорокина,**

к.б.н., в.н.с.

Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей МЗ РФ,

Москва, Россия

E-mail: [sorokelena@mail.ru](mailto:sorokelena@mail.ru)

**Ольга Витальевна Карасева,**

д-р мед. наук, руководитель отдела сочетанной травмы

НИИ неотложной детской хирургии и травматологии

Департамента здравоохранения

Москва, Россия

E-mail: [karaseva.o@list.ru](mailto:karaseva.o@list.ru)

**Софья Анатольевна Афанасьева,**

лаборант-исследователь,

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России

Москва, Россия

E-mail: [afsonia11@yandex.ru](mailto:afsonia11@yandex.ru)

**Оксана Валерьевна Глоба,**

к.м.н., старший науч. сотр.,

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России

Москва, Россия

E-mail: [globa@nczd.ru](mailto:globa@nczd.ru)

**Жанна Борисовна Семенова,**

д.м.н., профессор,

рук. отд. Нейротравмы

НИИ неотложной детской хирургии и травматологии

Департамента здравоохранения

Москва, Россия

E-mail: [j.seman@mail.ru](mailto:j.seman@mail.ru)

**Information about authors**

**Elena Genadievna Sorokina,**

PhD, the leader researcher,

«National Medical Research Center for Children's Health», Russian Ministry of Health

Moscow, Russia

E-mail: [sorokelena@mail.ru](mailto:sorokelena@mail.ru)

**Olga Vitalievna Karaseva,**

M.D., Head of the Department of Combined

Trauma, Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology

Moscow, Russia

E-mail: [karaseva.o@list.ru](mailto:karaseva.o@list.ru)

**Afanasyeva Sofya Anatolyevna,**

laboratory researcher,

«Scientific Medical Research Center for Children's Health», Russian Ministry of Health

Moscow, Russia

E-mail: [afsonia11@yandex.ru](mailto:afsonia11@yandex.ru)

**Oksana Valeryevna Globa,**

Ph.D., senior researcher,

«Scientific Medical Research Center for Children's Health», Russian Ministry of Health

Moscow, Russia

E-mail: [globa@nczd.ru](mailto:globa@nczd.ru)

**Zhanna Borisovna Semenova,**

M.D., professor, the chief of Neurotrauma department, doctor of medical sciences, Research

Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology

Moscow, Russia

E-mail: [j.seman@mail.ru](mailto:j.seman@mail.ru)

**Валентин Палладиевич Реутов,**

д.б.н., в.н.с.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,

Москва, Россия

**E-mail:** valentinreutov@mail.ru

**Всеволод Григорьевич Пинелис,**

д.б.н., профессор, главн. науч. сотр.

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России

Москва, Россия

**E-mail:** pinelis@mail.ru

**Valentin Palladievich Reutov,**

Doct. Biol. Sci., PhD, the leader researcher, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology Russian Academy of Sciences,

Moscow, Russia

**E-mail:** valentinreutov@mail.ru

**Vsevolod Grigorievich Pinelis,**

M.D., professor, chief scientific officer, «Scientific Medical Research Center for Children's Health», Russian Ministry of Health

Moscow, Russia

**E-mail:** pinelis@mail.ru

УДК 577.152.3

ГРНТИ 62.39.51, 62.39.29, 31.22.23

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.310-321

<sup>1</sup> В. П. Дерягина, <sup>1</sup> Н. И. Рыжова, <sup>1</sup> Л. А. Савлучинская, <sup>1</sup> И.

С. Голубева, <sup>1</sup> Л. В. Кривошеева, <sup>1,2</sup> К. И. Кирсанов

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

## УЧАСТИЕ *eNOS* В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБРИДОВ ФЕРМЕНТА

В обзоре обсуждаются литературные данные и результаты собственных исследований о роли эндотелиальной NO синтазы (*eNOS*) в канцерогенезе. Анализируется противоопухолевый потенциал ингибиторов *eNOS* и молекулярные механизмы их действия.

**Ключевые слова:** эндотелиальная синтаза оксида азота (*eNOS*), канцерогенез, ангиогенез, лимфангиогенез, ингибиторы *eNOS*.

<sup>1</sup>V. P. Deryagina, <sup>1</sup>N. I. Ryzhova, <sup>1</sup>L. A. Savluchinskaya,

<sup>1</sup>I. S. Golubeva, <sup>1</sup>L. V. Krivosheeva, <sup>1,2</sup>K. I. Kirsanov

<sup>1</sup>FSBI N.N. Blokhin NMRCO

<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia

## *eNOS* INVOLVEMENT IN CARCINOGENESIS AND PROSPECTS FOR THE USE OF ENZYME INHIBITORS

The review discusses the literature data and the results of our own research on the role of endothelial NO synthase (*eNOS*) in carcinogenesis. The antitumor potential of *eNOS* inhibitors and the molecular mechanisms of their action are analyzed.

**Keywords:** endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*), carcinogenesis, angiogenesis, lymphangiogenesis, *eNOS* inhibitors

### Введение

Оксид азота (NO), генерируемый эндотелиальной NO-синтазой (*eNOS*), участвует в регуляции гомеостаза сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной, мочеполовой и других систем. Повышение экспрессии *eNOS* часто регистрируют как в опухолевых, так и в стромальных клетках при злокачественных новообразованиях молочной железы, мочевого пузыря, толстой кишки, центральной нервной системы и др. [1,2, с.1]. В зависимости от концентрации NO, продолжительности экспозиции клеток к NO, реакций с ключевыми реагентами (кислород, углекислый газ и др.) и мишенями (металлы, тиолсодержащие аминокислоты, гем-содержащие белки), а также особенностей микроокружения, NO и его активные производные могут как способствовать, так и препятствовать канцерогенезу [2,с.1;3, с1]. В условиях избыточной активности *eNOS* в опухолях фермент рассматривается как перспективная мишень для противоопухолевой терапии. В обзоре анализируются обобщенные данные, касающиеся структуры, роли *eNOS*

в опухолевом процессе, а также противоопухолевой активности ингибиторов eNOS *in vitro* и *in vivo*.

**Синтез оксида азота.** Эндотелиальная NO-синтаза представляет собой нерастворимый гомодимерный фермент с молекулярной массой около 135 кДа. eNOS синтезирует NO из гуанидинового азота L-аргинина в реакции с кислородом с участием кофермента (NADPH) и кофакторов (флавины: FAD и FMN; гем (Fe-протопорфирин IX), тетрагидриобиптерин (BH<sub>4</sub>) и Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин). Сопродуктом реакции является L-цитруллин. В условиях гипоксии eNOS может генерировать супероксид-анион радикал, вместо NO. Активность конститутивной формы eNOS зависит от концентрации Ca<sup>2+</sup> в цитоплазме, наличия субстратов и кофакторов, фосфорилирования/дефосфорилирования остатков аминокислот фермента [2, с.1; 3, с.2]. eNOS взаимодействует с мембраной эндотелиальных клеток в кавеолах. Ацилирование N-терминальных остатков глицина в молекулах фермента облегчает взаимодействие eNOS со структурным каркасным белком кавеол – кавеолином-1 и приводит к торможению активности фермента в отсутствие стимулирующих воздействий. eNOS в основном экспрессируется в венозных, артериальных, лимфатических эндотелиальных клетках, миоцитах, тромбоцитах, нейронах, а также в опухолевых клетках. NO, генерируемый eNOS эндотелия, диффундирует в гладкомышечные клетки, где активирует растворимую гуанилатциклазу (sGC). Последняя активирует cGMP-зависимую протеинкиназу G (PKG), которая фосфорилирует многочисленные белки, влияющие на пролиферацию, дифференцировку, мобильность клеток и формирование межклеточных контактов [4-7, с.2]. Уровень внутриклеточного кальция является критической детерминантой активности eNOS, так как для максимальной каталитической функции eNOS необходимо связывание кальмодулина с ферментом. Посттрансляционная регуляция eNOS происходит за счет фосфорилирования и дефосфорилирования остатков аминокислот. Фосфорилирование по Ser1177 увеличивает активность eNOS. В зависимости от первичного стимула фосфорилирование Ser1177 может осуществляться протеинкиназами Akt, AMPK и PKA под влиянием изменения скорости кровотока, при действии брадикинина, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), инсулин-подобных факторов роста, тиреоидных гормонов, ацетилхолина, эстрадиола, сфингозин-1-фосфата и др. Фосфорилирование по сайту Thr495 протеинкиназой C снижает активность фермента. Недавно установлено, что S-нитрозилирование является дополнительным способом посттрансляционной регуляции активности eNOS в эндотелиальных клетках [8,9, с.2].

Еще одним фактором, определяющим активность синтеза NO при опухолевом росте, является уровень аргинина, повышение уровня синтеза которого регистрируется в опухолевых клетках [10-12, с.2]. На активность eNOS влияет наличие полиморфизмов в гене eNOS. Наличие специфических полиморфизмов в гене коррелирует с увеличением или снижением общей выживаемости онкологических больных [13-16, с.2].

### **Оксид азота в канцерогенезе**

**Проопухолевое действие NO.** Высокие концентрации NO, продуцируемые иммунными или опухолевыми клетками, способствуют образованию химически активных производных NO (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ONNO<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и др.), которые вызывают повреждение ДНК тремя возможными механизмами: 1) образование канцерогенных нитрозаминов (R1R2N-NO); 2) прямая модификация ДНК (дезаминирование гуанина, цитозина и аденина, нитрование оснований, окислением нуклеиновых кислот); 3) ингибирование систем, вовлеченных в репарацию повреждённых ДНК, в том числе алкилтрансфераз и ДНК-гликозилаз. При низких концентрациях NO проявляет антиоксидантные свойства. При концентрации NO < 100 нМ опухолевые клетки могут избежать программируемой гибели в результате инактивации каспаз, сверхэкспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-XL и ингибирования высвобождения цитохрома c из митохондрий [17-22, с.2]. В условиях низких концентраций NO стимулирует ангиогенез за счет увеличения пролиферации и миграции эндотелиальных клеток с участием sGC-cGMP сигнального

пути. Малые количества NO, продуцируемые eNOS, активируют лимфоангиогенез и лимфатическое метастазирование [23,24, с.2].

При концентрации 100–500 nM NO способствует индукции нескольких проонкогенных путей, таких как PI3K/Akt, TGF $\beta$ , ERK. Это приводит к увеличению геномной нестабильности, активации генов «стволового» фенотипа, усилению ангиогенеза и метастазирования, иммуносупрессии и развитию резистентности к химиотерапии [2, с.1; 25, с.3]. Недавно было продемонстрировано влияние NO на эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов, включая метилирование ДНК, активность малых РНК и модификацию гистонов [25-26, с.3].

*Противоопухолевое действие NO.* Продолжительная сверхпродукция способствует активации апоптоза в клетке за счет активации p53 и ингибирования антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Это приводит к высвобождению митохондриального цитохрома c в цитоплазму и активации каспаз [26, с.3]. Также при высоких концентрациях NO происходит подавление ангиогенеза за счет ингибирования фосфорилирования белков активаторов – PKC, ERK и JUN. Генерируемый макрофагами, клетками Купфера, натуральными киллерами, эндотелиальными клетками и другими типами клеток, NO оказывает цитостатическое и цитотоксическое действие на опухолевые клетки [27,28, с.3].

*Влияние NO, продуцируемого eNOS, на ангиогенез.* Факторы стресса и ангиогенеза: VEGF-A, -B, -C, -D, -E; PDGF-A, -B, -C, -D; PGF-1, -2; Ang1; TNF $\alpha$ ; TGF $\alpha$ ,  $\beta$ ; MMPs, IL-8 и H $\alpha$ -90 активируют eNOS. Экспозиция клеток к NO может приводить к ускорению пролиферации, миграции эндотелиальных клеток (EC), формированию, созреванию и росту кровеносных сосудов в опухолях за счет активации sGC и нитрования специфичных таргетных белков. С другой стороны, NO способен опосредовать функцию таких ангиогенных факторов, как VEGF, сфингозин-1-фосфат, ангиопоэтин I (Ang1), эстрогены, инсулин, основной фактор роста фибробластов (bFGF) и др. [29-31, с.3]. NO и его активные метаболиты участвуют в регуляции синтеза и активации промета статических и проангиогенных матриксных металлопротеиназ (MMPs), вовлеченных в деградацию базальной мембраны кровеносных сосудов [32, с.3]. NO участвует в опосредованном предшественниками эндотелиальных клеток (EPCs) ангиогенезе. В основе механизма мобилизации прогениторных клеток из ниш стволовых клеток лежит увеличение активности eNOS в строме костного мозга за счет гиперактивации PI3K/Akt, в результате чего возрастает активность MMP-9 и усиливается миграция EPCs в периферическую кровь [33-38, с.3].

*Ингибирование eNOS.* При повышенной экспрессии и активности eNOS в опухолевых клетках, эндотелии сосудов опухолей представляется перспективным селективное ингибирование активности фермента. В экспериментальных исследованиях для снижения активности eNOS чаще всего использовали аналоги аргинина: L-нитроаргинин (L-NNA); его метиловый эфир (L-NAME); N5-(1-иминоэтил)-L-орнитин (L-NIO) и L-N<sup>ω</sup>-монометиларгинин (L-NMMA) [39, с. 3]. Наряду с этим, изучали действие доноров NO, высокоселективного ингибитора к iNOS – 1400 W, производного N,S-замещённых изотиомочевин T1023, рекомбинантного пептида – кавтрата, имитирующего домен Cav-1, а также подход, основанный на нокауте генов eNOS и iNOS.

Известно, что большая часть молекул eNOS связана со структурным белком кавеол – кавеолином-1 и их ферментативная активность подавлена. Синтетический пептид кавтрата сильно и обратимо ингибировал активность eNOS, препятствуя взаимодействию фермента с Ca<sup>2+</sup>/CaM [40, с.3]. Кавтрата ингибировал eNOS, уменьшал гиперпроницаемость микрососудов и задерживал прогрессирование перевиваемых опухолей у мышей. У мышей с нокаутированным геном eNOS<sup>-/-</sup> кавтрата хотя и уменьшал проницаемость сосудов в опухолях, но с меньшей эффективностью, чем у контрольных животных тормозил рост опухолей [41, с.3]. Для того, чтобы восстановить пониженный уровень кавеолина-1 и снизить активность eNOS в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов в опухоли, в вену мышей вводили липокомплекс cDNA кавеолина-1.

Экспрессия рекомбинантного кавеолина-1 задерживала и тормозила развитие опухоли за счет уменьшения плотности микрососудов в центральной части опухолей, что опосредовалось снижением миграции эндотелиальных клеток и формирования тубулярных структур [42, с.4].

Ингибиторы iNOS – 1400W и eNOS – L-NIO тормозили рост и миграцию опухолевых клеток и подавляли экспрессию генов/белков, вовлеченных в ангиогенез. Применение ингибиторов NOS в сочетании с цитостатиком (5-фторурацил) усиливало противоопухолевое действие цитостатика на опухолевые клетки HT-29 и HCT 116 [43, с.4], табл.1. Ингибитор eNOS – L-NIO потенцировал антипролиферативное, антиангиогенное и апоптотическое действие ингибитора тирозинкиназ – ленватиниба (E7080) на клетки колоректального рака HT-29 [44, с.4].

Хорошо известно, что адгезия лейкоцитов к стенкам внутри опухолевых и окружающих опухоль сосудов обычно ослаблена и это может ограничить противоопухолевый ответ иммунных клеток и эффективность иммунотерапии. NO-опосредованное снижение экспрессии адгезионных молекул C18ICAM1 и VCAM1 может частично объяснить это явление. Снижение биосинтеза NO путем ингибирования NOS увеличивает как роллинг, так и стабильность адгезии лейкоцитов [45, с.4]. Одновременно, снижение уровня NO в сосудах может усилить агрегацию тромбоцитов с опухолевыми клетками, облегчить их адгезию к стенкам сосудов. Способность к образованию агрегатов коррелирует с метастатическим потенциалом опухолей и обратно пропорциональна продукции NO. Таким образом, повышение продукции NO в эндотелии сосудов приводит к разнонаправленным эффектам: ограничивает противоопухолевое действие иммунных клеток с одной стороны, с другой – может препятствовать гематогенному метастазированию и оказывать цитотоксическое действие на диссеминированные опухолевые клетки [46,47, с.4].

Вновь разработанное производное N,S-замещённых изотиомочевин – T1023, проявляющее ингибирующую активность по отношению к iNOS и eNOS было протестировано на противоопухолевую и антиметастатическую активность на мышах с подкожно перевиваемой карциномой лёгких Льюиса (КЛ). T1023 существенно тормозило развитие КЛ, подавляло метастазирование. В комбинации с ингибитором VEGF бевацизумабом T1023 усиливало противоопухолевое действие антиангиогенного препарата [48, с.4].

Ингибитор N<sup>ω</sup>-нитро-L-аргинин (L-NNA), селективность которого к eNOS выше, чем к iNOS, устойчиво тормозил рост подкожно перевиваемой аденокарциномы Эрлиха [49,50, с.4].

Как упоминалось выше, NO участвует в опосредованном предшественниками эндотелиальных клеток ангиогенезе. В крови больных глиомой уровень eNOS коррелирует с фракцией EPCs [51, с.4]. На мышинной модели глиом, индуцированных PDGF, показано, что NO способен активировать сигнальный путь Notch в периваскулярных стволовых клетках глиом посредством NO/cGMP/PKG, что приводит к ускорению канцерогенеза. У мышей eNOS<sup>-/-</sup>, наблюдалось увеличение латентного периода появления глиом и повышение выживаемости животных, коррелирующее со снижением активности сигнального каскада Notch [52, с.4]. Обращает внимание работа по исследованию механизмов, контролирующая взаимоотношения между опухоль-иницирующими стволовыми клетками глиомы (GIC) и эндотелиальными клетками опухоли. В обоих типах клеток было показано увеличение активности iNOS, eNOS, что приводило к повышению экспрессии NO-зависимого ингибитора дифференцировки 4 (ID4) через NOS-NO-sGC сигналинг. ID4, в свою очередь, способствовало активации сигнального каскада JAGGED1 - NOTCH. Активация NOTCH связывалась с прогрессированием опухоли вместе с повышенным самообновлением GIC и ростом сосудистой сети в ксено-трансплантатах, которые резко подавлялись ингибитором NOTCH. Истощение eNOS и iNOS в GIC снижало уровни экспрессии ID4 и количество клеток с экспрессией маркеров стволовых клеток. Авторы считают, что ингибирование сигнального пути PDGF-

NOS-ID4-miR129 и активности NOTCH в периваскулярном микроокружении может служить эффективным терапевтическим подходом при глиобlastомах [53, с.5].

К уже идентифицированным лимфангиогенным молекулам были причислены новые молекулы – факторы роста эндотелия сосудов: VEGF-C и VEGF-D. При стимулировании VEGF-A, VEGF-C или VEGF-C156S, PI3K-зависимая активация eNOS осуществлялась через VEGFR-2 или VEGFR-3 рецепторы в EC лимфатических сосудов (LEC). Если NO-доноры оказывали дозо-зависимый пролиферативный эффект на LEC, усиливая их выживаемость, то конкурентный эндогенный ингибитор NOS – L-NMMA ослаблял перитуморальную гиперплазию лимфатических сосудов на модели трансплантируемой фибросаркомы T241, сверхэкспрессирующей VEGF-C. У мышей с генетически инактивированным eNOS<sup>-/-</sup> гиперплазия лимфатических сосудов была менее выражена по сравнению с контролем. Как генетическое, так и фармакологическое ингибирование eNOS значительно уменьшало количество опухолевых клеток, поступающих в дренирующие опухоль лимфатические узлы у мышей с фибросаркомой T-241 и снижало образование макроскопических метастазов при меланоме B16F10 [54,55, с.5].

Стимулирующее влияние NO на лимфангиогенез было продемонстрировано *in vitro* на опухолевых клетках молочной железы MDA-MB-231. Донор NO индуцировал экспрессию VEGF-C, которая значительно ингибировалась при добавлении ингибитора NOS – L-NAME. В образцах опухолей молочной железы большое образование биомаркера NO – нитротирозина, коррелировало с экспрессией VEGF-C и количеством метастазов в лимфоузлы [56, с.5]. К факторам, способствующим повышенному метастазированию папиллярной карциномы щитовидной железы человека относят лимфангиогенный фактор роста VEGF-D, который ассоциируют с повышенной плотностью лимфатических сосудов. Воздействие NO-доноров на клетки карциномы стимулировало экспрессию VEGF-D в клетках, но при внесении в среду ингибиторов NOS индукция ростового фактора снижалась. В опухолевой ткани больных наблюдали повышенную экспрессию VEGF-D, уровень которого коррелировал с уровнем биомаркера NO - нитротирозина и лимфометастазами, что может свидетельствовать об участии NO в метастазировании [57, с.5].

*Эндогенные ингибиторы eNOS.* Регуляция активности eNOS может также осуществляться конкурентными эндогенными ингибиторами фермента – асимметричным N<sup>g</sup>N<sup>g</sup>-диметиларгинином (ADMA) и N<sup>g</sup>-монометиларгинином (L-NMMA). Эти соединения являются распространенными эндогенными метаболитами деградации белков и конкурируют с L-аргинином за связывание с активным сайтом всех изоформ NOS. Изоферменты диметиларгинин диметиламиногидролазы (DDAH) – DDAH1 и DDAH2, ответственны за деградацию L-NMMA и ADMA и поддержание гомеостатического контроля NO. Нарушение регуляции пути DDAH/ADMA/NO приводит к увеличению локальной доступности NO, часто способствует росту опухоли, ангиогенезу и васкулогенной мимикрии. Ингибирование экспрессии и/или активности DDAH *in vitro* и *in vivo* свидетельствует об имеющемся терапевтическом потенциале такого подхода, позволяющего подавлять ангиогенез и васкулогенную мимикрию [58-60, с.5]. В единичных исследованиях продемонстрирована функциональная роль DDAH2 (эмбриональный белок, экспрессируется в тканях плода лёгкого и почек, проявляет антиатеросклеротическое действие) в ангиогенезе опухоли. Так, высокая экспрессия DDAH2 в фибробластах стромы инвазивной аденокарциномы лёгкого сопровождалась выраженной экспрессией eNOS в эндотелии сосудов опухоли и коррелировала с ухудшением прогноза [61, с.5]. Гиперэкспрессия DDAH1 приводит к снижению уровня ADMA, увеличению синтеза NO, повышенной экспрессии и секреции VEGF. Скорость роста перевиваемой глиомы у мышей в гиперэкспрессией DDAH1 значительно выше, чем скорость роста опухолей у мышей дикого типа [62, с.6]. На модели ишемии задних конечностей у диких мышей и у мышей с дефицитом Apo E или трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих DDAH, было показано, что метаболические или генетические изменения в уровнях ADMA в плазме и ткани имели временную зависимость и влияли на выработку NO в тканях, а также на ангиогенный ответ на ишемию [63, с.6]. Повышенная экспрессия

DDAH1 в клеточных линиях рака предстательной железы PC3 и LNCaP способствовала пролиферации, миграции и инвазии клеток и индуцировала экспрессию ряда NO-регулируемых генов. Обработка DDAH1-позитивных клеток PCa ингибиторами NOS (L-NAME и 1400 W) снижала активность DDAH1 [64, с.6]. В продолженных более полных исследованиях с применением другого класса ингибитора DDAH1 – DD1E5 была показана необратимость ингибирования активности DDAH1, торможение пролиферации, миграции и инвазии клеток, и подавление экспрессии проангиогенных факторов. Что более важно, исследование *in vivo* на модели ксенотрансплантатов, полученных из клеток PC3 со сверхэкспрессией DDAH1 показало торможение их роста, снижение в опухолях экспрессии VEGF, NOS и HIF-1 $\alpha$  под влиянием ингибитора DDAH1 и ухудшение васкуляризации [65, с.6]. Синтезированные аналоги аргинина ZST316 и ZST152 ингибировали повышенную экспрессию DDAH1 в клеточных линиях тройного негативного рака молочной железы, что приводило к дозо-зависимому снижению образования капиллярно-подобных трубчатых структур [66, с.6]. Скрининг клеточных линий меланомы показал, что 78% из них имеют повышенные уровни экспрессии DDAH1 по сравнению с нормальными меланоцитами человека. Обработка клеток меланомы A375 с помощью ингибитора DDAH1 – CI-NIO снижала образование NO [67,68, с.6]. Таким образом, поиск селективных ингибиторов DDAH1 и DDAH2 представляется ещё одним подходом, направленным на регуляцию синтеза NO в опухолях, и может стать действенным вариантом улучшающим результаты терапии высокоагрессивных опухолей [59, с.5; 69, с.6].

### **Заключение**

Факторы стресса и ангиогенеза активируют eNOS в опухолях. NO, продуцируемый eNOS в избыточных количествах опухолевыми, эндотелиальными клетками стимулирует рост кровеносных сосудов. NO способен опосредовать функцию ангиогенных факторов, таких как VEGF, сфингозин-1-фосфат, ангиопоэтин I, эстрогены, инсулин и др. eNOS способствует увеличению проницаемости сосудов, мобилизации стволовых и прогениторных клеток, усилению лимфангиогенеза и лимфогенному метастазированию при злокачественных поражениях. Проканцерогенные эффекты eNOS реализуются посредством сигнального каскада NO-sGC-cGMP-PKGs или реакций нитрозирования/денитрозирования многочисленных функциональных белков, в том числе онкобелков. В экспериментальных исследованиях, включающих разные модели опухолевого роста, фармакологическое или генетическое ингибирование активированной eNOS оказывало противоопухолевый эффект, ингибировало миграцию опухолевых клеток, подавляло метастазирование. Ингибиторы DDAH также оказывали антиангиогенное действие и способствовали уменьшению мобильности эндотелиальных клеток, подавляли экспрессию генов и белков, вовлеченных в ангиогенез, снижали проницаемость сосудов, создавая барьер для проникновения опухолевых клеток в кровеносные и лимфатические сосуды.

*Авторы считают, что в данной работе новыми являются* следующие результаты: проведен анализ, систематизация и обобщение данных, касающиеся роли eNOS в прогрессии опухолей, а также дана оценка эффективности ингибиторов eNOS в торможении опухолевого процесса на экспериментальных моделях, что дает основание считать их использование перспективным в терапии опухолей.

**Таблица 1 Действие ингибиторов NOS на опухолевый рост и ангиогенез**

<b>n/p</b>	<b>Модель опухоли</b>	<b>Действующее вещество, модификация гена</b>	<b>Эффект на рост опухоли</b>	<b>Действие на сосуды</b>	<b>Другие эффекты</b>	<b>Экспрессия, активность NOS</b>	<b>Литература</b>
1.	Перевиваемая карцинома лёгких Льюиса (LLC) у мышей	Кавтратин, нокаут гена eNOS	Задерживают прогрессирование опухолей	Уменьшает проницаемость микрососудов и ангиогенез		eNOS ↓	Gratton J.P., 2003

Секция 6. ОКСИД АЗОТА И ПРОДУКТЫ ЕГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

n/p	Модель опухоли	Действующее вещество, модификация гена	Эффект на рост опухоли	Действие на сосуды	Другие эффекты	Экспрессия, активность NOS	Литература
2.	Трансплантируемые опухоли TLT и LLC у мышей	Кавеолин рекомбинантный в составе липосом	Торможение роста опухолей	Уменьшает плотность сосудов, снижает миграцию эндотелиальных клеток		eNOS↓	Brouet A., 2005
3.	Клеточные линии опухолей толстой кишки HT-29 и HCT 116	1400 W; L-NIO один или в комб инации с 5-фторурацилом	Торможение роста и миграции опухолевых клеток с усилением при воздействии комбинации	Супрессия экспрессии ключевых генов, белков, вовлеченных в ангиогенез: HGF, TIMP3, MMP2, MMP9, SPHK1, молекулы белка Serpin B5, эндотелин-1			Gao Y., 2019
4.	Клеточные линии опухолей толстой кишки человека HT-29 и HCT 116	Нокаут генов iNOS, eNOS	Ингибирование роста опухолевых клеток			eNOS↓ iNOS↓	Gao Y., 2019
5.	Линия клеток HT29 аденокарциномы толстой кишки человека	Ленватиниб в комбинации с L-NIO	Выраженный антипролиферативный эффект	Выраженное антиангиогенное действие	Апоптотический эффект		Altun Ah., 2013
6.	Перевиваемые опухоли LLC и Ehrlich у мышей	L-NNA, AG, NP	Умеренное торможение роста опухолей			NO-производные↓	Deryagina V.P. 2012
7.	LLC у мышей	Производное N,S-замещённых изотиомочевин, T1023. Комбинация T1023+бевацизумаба (BB3)	Торможение роста опухоли, подавление метастазирования. При T1023+BB3 – тенденция к усилению этих эффектов	Антиангиогенное действие		.	Филимонова М.В., 2019
8.	Клеточные линии глиомы человека (GICs)	L-NAME, нокаут генов iNOS, eNOS			Снижает экспрессию Notch, активность ингибитора дифференцировки ID4 и число стволовых клеток (маркеры: CD133, SOX2 и Nestin)		Jeon H.M., 2014; Charles N., 2010
9.	Сконструированная модель регенерации дермы у мышей; Трансплантационные опухоли фибросаркомы T241 и меланомы B16F10 у мышей.	L-NMMA, нокаут гена eNOS		Снижает миграцию опухолевых клеток в лимфатические узлы, ингибирует образование макроскопических метастазов			Lahdenranta J., 2009
10	Клетки рака	A) DDAH1↑	A) Ускорение	A) Индукция	A)		Reddy KRK,



п/п	Модель опухоли	Действующее вещество, модификация гена	Эффект на рост опухоли	Действие на сосуды	Другие эффекты	Экспрессия, активность NOS	Литература
.	предстательной железы РС3 с повышенной экспрессией DDAH1	Б) L-NAME, 1400 W	роста ксенотрансплантатов	VEGF, HIF-1 $\alpha$ , bFGF, IL-8, увеличение синтеза NO	Повышенная пролиферация, миграция, инвазия	Б) Снижение активности DDAH1	2018
11	А) Клетки РС3 со сверхэкспрессией DDAH1; Б) ксенотрансплантаты	Ингибитор DDAH1–DD1 E5	А) Торможение пролиферации, миграции и инвазии; Б) Торможение роста ксенотрансплантатов	А) Подавление экспрессии проангиогенных факторов: VEGF, iNOS, с-Мус, HIF-1 $\alpha$ , bFGF, NO, IL8 Б) Снижение экспрессии VEGF, NOS и HIF-1 $\alpha$ , ухудшение васкуляризации	Подавление синтеза NO, IL8		Reddy KRK, 2019

**Примечание:** 1400 W [*N*-(3-(aminomethyl)-benzyl)acetamide], LNIO (N5-(1-иминоэтил)-L-орнитин), L-NIL (N6-(1-иминоэтил)-L-лизин), L-NNA (N<sup>o</sup>-нитро-L-аргинин), AG – аминогуанидин, L-NAME– N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, L-NMMA– N(G)-monomethyl-L-arginine, monoacetate salt, DDAH - диметиларгинин диметиламино гидролазы, HGF – фактор роста гепатоцитов, BCL-2 – регулятор апоптоза, TIMP3 – тканевой ингибитор металлопротеиназ-3, Serpin B5 – ингибитор протеаз, SPHK1 – сфингозинкиназа 1, VEGF – фактор роста эндотелия сосудов, с-МУС – протоонкогенный белок, HIF-1 $\alpha$  – фактор, индуцируемый гипоксией; IL-8 – провоспалительный цитокин, SNAP – S-нитрозопеницилламин, донор NO; MMP9 – матриксные металлопротеиназы 2, 9

### Список литературы

1. Choudhari S.K., Chaudhary M., Bagde S. et al. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol* 2013;11: 118.
2. Somasundaram V., Basudhar D., Bharadwaj G. et al. Molecular mechanisms of nitric oxide in cancer progression, signal transduction, and metabolism. *Antioxid Redox Signal* 2019; 30:1124–43.
3. Forstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33(7): 829–37, 837a–837d.
4. Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399(6736): 601–5.
5. Ju H., Zou R., Venema V.J., Venema R.C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 1997; 272(30): 18522–5.
6. Sakoda T., Hirata K., Kuroda R. et al. Myristoylation of endothelial cell nitric oxide synthase is important for extracellular release of nitric oxide. *Mol Cell Biochem* 1995;152(2):143–8.
7. Rabender C.S., Alam A., Sundaresan G. et al. The role of nitric oxide synthase uncoupling in tumor progression. *Mol Cancer Res* 2015;13(6): 1034–43.
8. Rafikov R., Fonseca F.V., Kumar S. et al. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol* 2011; 210(3): 271–84.
9. Erwin P.A., Lin A.J., Golan D.E., Michel T. Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2005; 280(20):19888–94.
10. Keshet R., Erez A. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis Model Mech* 2018;11(8): dmm033332.
11. Huang H.L., Chen W.C., Hsu H.P. et al. Argininosuccinate lyase is a potential therapeutic target in breast cancer. *Oncol Rep* 2015;34(6):3131–9.

12. Huang H.L., Chen W.C., Hsu H.P. et al. Silencing of argininosuccinate lyase inhibits colorectal cancer formation. *Oncol Rep* 2017;37(1): 163–70.
13. Fujita S., Masago K., Hatachi Y. et al. Genetic polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene correlate with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *BMC Med Genet.* 2010; 11:167.
14. Oliveira-Paula G.H., Lacchini R., Tanus-Santos J.E. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* 2016; 575(2 Pt 3):584–99.
15. Duarte J., Francisco V., Perez-Vizcaino F. Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food Funct* 2014; 5(8):1653–68.
16. Дерягина В.П., Реутов В.П. Модулирование образования активных форм азота ингредиентами растительных продуктов при ингибировании канцерогенеза. *Успехи Мол Онкологии.* 2019; 6(1): 18-36.
17. Wink D.A., Vodovotz Y., Laval J. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis.* 1998; 19(5): 711-721.
18. Nguyen T., Brunson D., Crespi C.L. et al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 3030-3034.
19. Laval F. and Wink D.A. Inhibition by nitric oxide of repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis* 1994; 15: 443-447.
20. Дерягина В.П., Н.И. Рыжова Н.И., Кривошеева Л.В., Голубева И.С., Савлущинская Л.А., Хоченков Д.А. Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов NO при росте опухоли разного гистогенеза. *Успехи молекулярной онкологии.* 2016; С. 73-80.
21. Sahni S., Hickok J.R., Thomas D.D. Nitric oxide reduces oxidative stress in cancer cells by forming dinitrosyliron complexes. *Nitric Oxide* 2018; 76: 37–44.
22. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин И.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. 156 с.
23. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S. et al. The Chemical biology of nitric oxide. Implication in Cellular Signaling. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(1):18–316.
24. Ziche M., Morbidelli L. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. *Eur. Cytokine Netw.* 2009; 20(4): 164-70.
25. Vasudevan D., Hickok J.R., Bovee Rh.C., Pham V., Mantell L.L., Bahroos N., Kanabar P., Cao X.J., Maienschein-Cline M., Garcia B.A. and Thomas D.D. Nitric oxide regulates gene expression in cancers by controlling histone posttranslational modifications. *Cancer Res.* 2015; 75(24): 5299-5308.
26. Mijatovi'c S, Savi'c-Radojevi'c A, Plješa-Ercegovac M, et al. The Double-Faced Role of Nitric Oxide and Reactive. *Antioxidants* 2020, 9, 374.
27. Hanahan D., Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353–64.
28. Kroncke K.D., Fehsel K. and Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when and where? *Nitric oxide.* 1997; 1:107-120.
29. Fukumura D., Gohongi T., Kadambi A. et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2604–9.
30. Fukumura D., Kashiwagi S., Jain R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7):521–34.
31. Dudzinski D.M., Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 2007;75(2):247–60.
32. Donnini S., Monti M., Roncone R. et al. Peroxynitrite inactivates human-tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *FEBS Lett* 2008;582(7):1135–40.
33. Zhao X., Liu H.Q., Li J., Liu X.L. Endothelial progenitor cells promote tumor growth and progression by enhancing new vessel formation. *Oncol Lett* 2016;12(2):793–9.
34. Heissig B., Hattori K., Dias S. et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*

- 2002;109(5):625–37.
35. Aicher A., Heeschen C., Mildner-Rihm C. et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 2003;9(11):1370–76.
  36. De la Puente P., Muz B., Azab F., Azab A.K. Cell trafficking of endothelial progenitor cells in tumor progression. *Clin Cancer Res* 2013;19(13): 3360–8.
  37. Padera T.P., Meijer E.F., Munn L.L. *The Lymphatic System in Disease Processes and Cancer Progression. Annu Rev Biomed Eng.* 2016;18: 125–58.
  38. Coso S., Zeng Y., Opeskin K., Williams E.D. Vascular endothelial growth factor receptor-3 directly interacts with phosphatidylinositol 3-kinase to regulate lymphangiogenesis. *PLoS One* 2012;7(6): e39558.
  39. Vitacek J, Lojek, A, Valacchi G, and Kubala L. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. *Mediat Inflamm.* 2012; 2012:22.
  40. Ju H., Zou R., Venema V.J., Venema R.C. Direct interaction of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 1997; 272: 18522-25.
  41. Gratton J.P., Lin M.I., Yu J. et al. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell.* 2003; 4: 31-9.
  42. Brouet A., Dewever J., Martinive Ph. et al. Antitumor effects of in vivo caveolin gene delivery are associated with the inhibition of the proangiogenic and vasodilatory effects of nitric oxide. *FASEB J.* 2005; 19:602-4.
  43. 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.
  44. Altun Ah., Temiz T.K., Balci E. et. al. Effects of tyrosine kinase inhibitor E7080 and eNOS inhibitor L-NIO on colorectal cancer alone and in combination. *Chin J Cancer Res.* 2013; 25(5): 572–584.
  45. Fukumura D., Yuan F., Endo M., Jain R.K. Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. *Am J Pathol.* 1997; 150(2): 713-725.
  46. Qiu H., Orr F.W., Jensen D. Arrest of B16 melanoma cells in the mouse pulmonary microcirculation induces endothelial nitric oxide synthase-dependent nitric oxide release that is cytotoxic to the tumor cells. *Am J Pathol.* 2003; 162 (2): 403-412.
  47. Ortega A.L., Mena S., Estrela J.M. Oxidative and nitrosative stress in the metastatic microenvironment. *Cancers.* 2010; 2(2):274-304.
  48. Филимонова М.В., Южаков В.В., Филимонов А.С. и др. Сравнительное исследование влияния ингибитора NOS T1023 и бевацизумаба на рост и морфологию карциномы легких Льюис. *Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal.* 2019; 63(2): 89-98.
  49. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Golubkina N.A. Production of nitrogen derivatives under the influence of NO-synthase inhibitors and natural compounds in mice with transplanted tumors. *Exp Oncol.* 2012. 34(1): 29-33.
  50. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Савлущинская Л.А., Кривошеева Л.В., Курсанов К.И. Противоопухолевое действие доноров оксида азота (NO) и механизмы его реализации. Сб. материалов конференции: "Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии". 2021. С. 142-153.
  51. Zheng P.P., Hop W.C., Luiders Th.M. et al. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells and circulating endothelial nitric oxide synthase in patients with gliomas. *Ann Neurol.* 2007; 62(1): 40-8.
  52. Charles N., Ozawa T., Squatrito M. et al. Perivascular nitric oxide activates NOTCH signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 6:141–52.
  53. Jeon H.M., Kim S-H., Jin X. et al. Crosstalk between Glioma-Initiating Cells and Endothelial Cells Drives Tumor Progression. *Cancer Res.* 2014; 74(16): 4482-92.
  54. Lahdenranta J., Hagendoorn J., Padera T.P. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Mediates Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis. *Cancer Res.* 2009; 69 (7): 2801-08.

55. Han L., Zhang M, Liang Xu et al. Interleukin-33 promotes inflammation-induced lymphangiogenesis via ST2/TRAF6-mediated Akt/eNOS/NO signalling pathway. 2017; 7(1):10602.
56. Nakamura Y., Yasuoka H., Tsujimoto M. et al. Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(4).
57. Nakamura Y., Yasuoka H., Zuo H. et al. Nitric oxide in papillary thyroid carcinoma: induction of vascular endothelial growth factor D and correlation with lymph node metastasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91: 1582–5.
58. Leiper J.M., Santa Maria J., Chubb A. et al. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J.* 1999; 343(Pt1):209–14.
59. Kostourou V., Robinson S.P., Whitley G.S., Griffiths J.R. Effects of overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase on tumor angiogenesis assessed by susceptibility magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 2003; 63(16):4960–6.
60. Murphy R.B., Tommasi S., Lewis B.C., Mangoni A.A. Inhibitors of the hydrolytic enzyme dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): discovery, synthesis and development. *Molecules.* 2016; 21:(5): 615.
61. Shiozawa T., Iyama S., Toshima S. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 promotes tumor angiogenesis in lung adenocarcinoma. *Virchows Arch.* 2016; 468(2):179–90.
62. Kostourou V., Robinson S.P., Cartwright J.E., Whitley G.S. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis. *Br J Cancer.* 2002; 87:673–80.
63. Achan V., Ho H.K., Heeschen C. et al. ADMA regulates angiogenesis: genetic and metabolic evidence. *Vasc Med.* 2005; 10: 7-14.
64. Reddy K.R.K., Dasari C., Duscharla D. et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 (DDAH1) is frequently upregulated in prostate cancer, and its overexpression conveys tumor growth and angiogenesis by metabolizing asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Angiogenesis.* 2018; 21:79–94.
65. Reddy K.R.K., Dasari C., Vandavasi S. et al. Novel cellularly active inhibitor regresses DDAH1 induced prostate tumor growth by restraining tumor angiogenesis through targeting DDAH1/ADMA/NOS pathway. *ACS Combinator Sci.* 2019; 21:241–56.
66. Hulin J.A., Tommasi S., Elliot D., Mangoni A.A. Small molecule inhibition of DDAH1 significantly attenuates triple negative breast cancer cell vasculogenic mimicry in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2019; 111:602-612.
67. Hulin J.A., Tommasi S., Elliot D. et al. **MiR-193b regulates breast cancer cell migration and vasculogenic mimicry by targeting dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1.** *Sci Rep.* 2017; 7: 13996.
68. Wang Y., Hu Sh., Jr A.M.G. et al. **Developing an irreversible inhibitor of human DDAH-1, an enzyme upregulated in melanoma.** *Chem Med Chem.* 2014; 9(4): 792-797.
69. Hulin J.-A., Gubareva E.A., Jarzebska N. et al. Inhibition of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase (DDAH) Enzymes as an Emerging Therapeutic Strategy to Target Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Cancer. *Front Oncol.* 2019; 9:1455.

**Сведения об авторах**

**Валентина Петровна Дерягина,**

к.б.н., с.н.с.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ

Москва, Россия

**e-mail:** derygina@inbox.ru

**Information about authors**

**Valentina Petrovna Deryagina,**

Ph. Dr., senior research. Employee

FSBI N.N. Blokhin NMRCO

Moscow, Russia

**e-mail:** derygina@inbox.ru

**Наталья Ильинична Рыжова,**

к.б.н., с.н.с.,

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ

Москва, Россия

**e-mail:** 1124415@mail.ru

**Людмила Александровна Савлущинская**

к.б.н., н.с.,

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ

Москва, Россия

**e-mail:** blood-research@yandex.ru

**Ирина Сергеевна Голубева,**

к.б.н., в.н.с.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ

Москва, Россия

**e-mail:** derygina@inbox.ru

**Лейла Владимировна Кривошеева,**

к.б.н., в.н.с.,

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ

Москва, Россия

**e-mail:** lvkrivosheeva@mail.ru

**Кирилл Игоревич Кирсанов,**

д.б.н., руководитель лаборатории канцерогенных веществ

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

МЗ РФ

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

Москва, Россия

**e-mail:** Kkirsanov85@mail.ru

**Natalia Ilynichna Ryzhova,**

Ph. Dr., senior research. Employee

FSBI N.N. Blokhin NMRCO

Moscow, Russia

**e-mail:** 1124415@mail.ru

**Ludmila Alexandrovna Savluchinskaya,**

Ph. Dr., scientific. Employee

FSBI N.N. Blokhin NMRCO

Moscow, Russia

**e-mail:** blood-research@yandex.ru

**Golubeva Irina Sergeevna,**

Ph. Dr., the vedas. scientific. Employee

FSBI N.N. Blokhin NMRCO

Moscow, Russia

**e-mail:** derygina@inbox.ru

**Leyla V. Krivosheeva,**

Ph. Dr., the vedas. scientific. employee;

FSBI N.N. Blokhin NMRCO

Moscow, Russia

**e-mail:** lvkrivosheeva@mail.ru

**Kirill Kirsanov,**

Doct. Biol. Sci., Head of the Laboratory of Chemical Carcinogens

FSBI N.N. Blokhin NMRCO

Peoples' Friendship University of Russia

Moscow, Russia

**e-mail:** Kkirsanov85@mail.ru

УДК 577.121.7:616.64/.69

ГРНТИ 31.27.15, 76.29.43

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.321-324

**А. Ф. Иштулин, Н. В. Короткова, И. В. Матвеева,**

**И. В. Минаев, П. М. Полякова,**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России)

## **МЕТАБОЛИТЫ ОКСИДА АЗОТА У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ**

*В данной статье представлены результаты исследования по определению метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов с хроническим простатитом III B с астенозооспермией и пациентов с варикоцеле II и III степени с астенозооспермией.*

**Ключевые слова:** оксид азота, хронический простатит, варикоцеле, спермоплазма

**Artem F.Ishtulin, Natalya V.Korotkova, Irina V.Matveeva, Ivan**

**V.Minaev, Polina M.Polyakova**

Ryazan State Medical University

## **METABOLITES OF NITROGEN OXIDE AMONG PATIENTS WITH DISTURBANCE OF REPRODUCTIVE FUNCTION**

*This article presents the results of an exploration of the determination of nitrogen oxide metabolites in spermoplasm among patients with chronic prostatitis IIIB with asthenozoospermia and patients with varicocele of II and III stages with asthenozoospermia.*

**Key words:** nitrogen oxide, chronic prostatitis, varicocele, spermoplasm.

### **Введение**

Оксид азота (NO) является важным регулятором физиологических процессов,

который в норме регулирует межклеточные и внутриклеточные процессы, поддерживая гомеостаз организма на постоянном уровне. Спектр биологических эффектов NO широк и разнообразен и изучение его образования может быть важным для понимания патогенеза таких заболеваний как хронический простатит III B и варикоцеле II-III степени.

В организме оксид азота синтезируется преимущественно из аминокислоты аргинина под действием фермента NO-синтазы (NOS), имеющей три изоформы: нейрональную, эндотелиальную и макрофагальную. Нейрональная и эндотелиальная изоформы принимают участие в синтезе NO в нормальных условиях, обеспечивая регуляцию нервной и сосудистой систем. Макрофагальная NO – синтаза активна только при различных патологических состояниях. Её активацию осуществляют разнообразные патогенные агенты [1].

Хронический простатит- распространённое урологическое заболевание, встречающееся у мужчин разных возрастных групп. В соответствии с современной классификацией хронический простатит делится на 2 категории:

-III A хронический процесс с наличием воспалительного компонента (наличие в секрете простаты лейкоцитов и возбудителей инфекции)

-III B хроническая патология с отсутствием воспалительного компонента (отсутствие лейкоцитов и возбудителей в секрете простаты).

Этиопатогенез хронического простатита III B до сих пор не изучен [2].

Варикоцеле- это аномальное расширение вен семенного канатика и внутренних семенных вен. У мужчин данное заболевание встречается в 15-20% случаев при нарушении репродуктивной функции.

Оба заболевания часто приводят к снижению фертильности и развитию мужского бесплодия. Проблема мужского бесплодия в настоящее время является крайне актуальной и требует поиска новых биохимических маркеров, с целью своевременной диагностики нарушения репродуктивной функции.

### **Цель работы**

Целью нашей работы было изучение конечных метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов с нарушением репродуктивной функции.

### **Материалы и методы**

Исследование одобрено на заседании ЛЭК ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России от 11 мая 2021 года (выписка из протокола № 11). В исследовании принимало участие 45 пациентов. Все пациенты проходили обследование в Государственном бюджетном учреждении Рязанской области «Городская клиническая больница № 8» в клинико-диагностической лаборатории. Возраст пациентов составил  $27 \pm 2$  года. Все обследуемые подписали информационное согласие на участие в исследовании. Пациенты были разделены на три равные группы: 1 группа составили 15 мужчин с хроническим простатитом III B с сопутствующей астенозооспермией в анамнезе; 2 группу составили 15 мужчин с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией в анамнезе; 3 группу составили 15 мужчин без нарушения репродуктивной функции.

Материалом для исследования явился эякулят, который был получен путем мастурбации после 5-6 дневного полового воздержания. Биологический материал собирали в стерильную одноразовую посуду. Спермоплазму получали методом центрифугирования образца спермы в течение 10 минут при скорости 1000 оборотов в минуту [3]. После отделения осадка спермоплазму однократно замораживали при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения исследования.

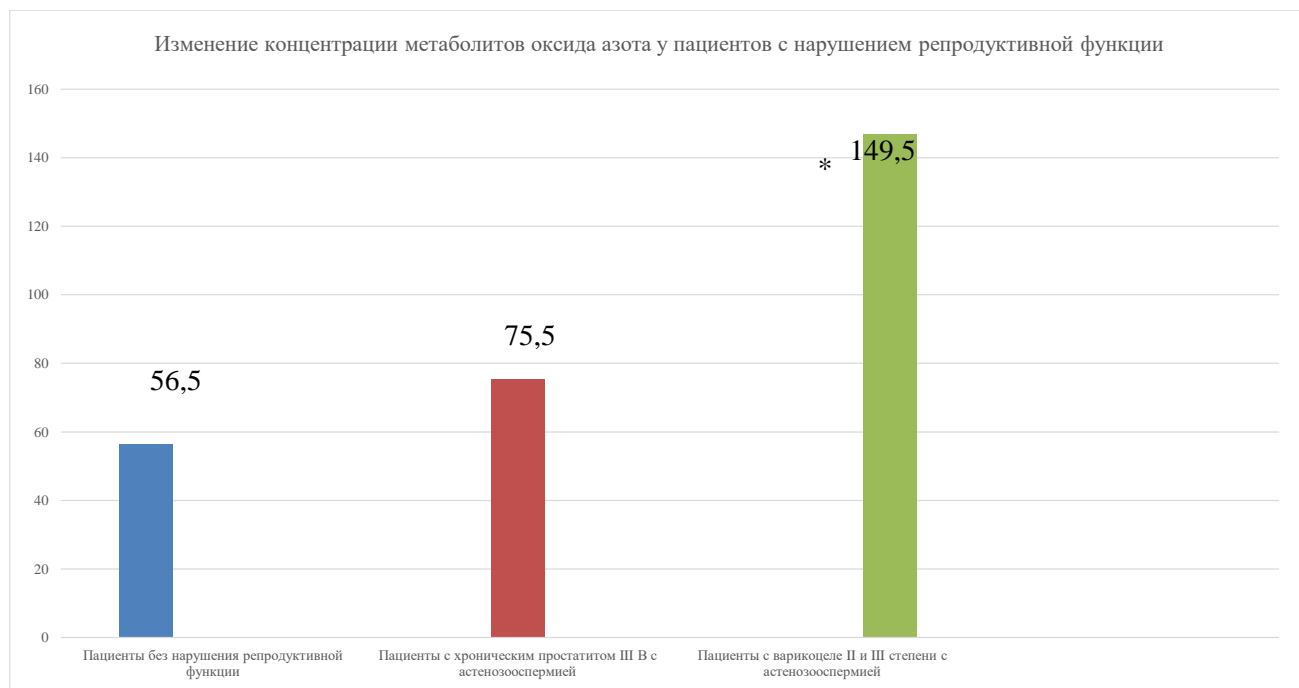
Суммарную концентрацию нитратов и нитритов (содержание конечных метаболитов оксида азота) определяли фотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса на иммуноферментном анализаторе *StatFax 3200 (AwarenessTechnology, Inc., США)*.

Полученные данные анализировали с помощью компьютерных программ *Statistica 26.0 (StatSoftInc., США)* и *MicrosoftOfficeExcel 2016*. Множество групп сравнивали с

помощью непараметрического Н–критерия Крускали-Уоллеса. Впоследствии проводили апостериорное множественное сравнение по непараметрическому U- критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

В первой исследуемой группе у пациентов с хроническим простатитом III В с сопутствующей астенозооспермией в анамнезе в спермоплазме наблюдалось незначительное увеличение метаболитов оксида азота, что не явилось статистически значимым, а в спермоплазме пациентов второй группы с варикоцеле II-III степени с сопутствующей астенозооспермией в анамнезе было выявлено увеличение метаболитов (NO) в 2,5 раза, что явилось статистически значимым (рис.1). Увеличение метаболитов оксида азота в спермоплазме у пациентов с варикоцеле II и III степени с сопутствующей астенозооспермией, может быть связано с гипоксией яичка, которая приведет к усилению синтеза цитокинов, экспрессирующих индуцибельную (NOS), что может приводить к высокому уровню NO [4,5].



**Рис.1** Изменение концентрации метаболитов оксида азота у пациентов с нарушением репродуктивной функции, мкмоль/мл

\*статистически значимые отличия от контрольной группы ( $p \leq 0,05$ )

### Заключение

Авторы считают, что данное исследование демонстрирует возможную роль метаболитов оксида азота спермоплазмы пациентов с варикоцеле в качестве диагностического маркера нарушения репродуктивной функции.

### Список литературы

1. Шангичев А.В. Оксид азота — биохимический маркер воспаления хронического абактериального простатита/ синдрома хронической тазовой боли (ХАП/СХТБ IIIA) // Вестник РУДН, серия медицина. 2010. № 4. С. 83-86.
2. Шорманов И.С., Можяев И.И., Соколова Х.А., Рыжков А.И., Шорманова Н.С. заимодействие системных и локальных нарушений гомеостаза при хроническом абактериальном простатите III–В категории (экспериментальное исследование) // Экспериментальная и клиническая урология. 2018. № 1. С. 20-27. DOI: 10.29188/2222-8543-2018-9-1-20-27.
3. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пятое

издание. ISBN 978-5-905106-09-05 // Издательство «КАПИТАЛ ПРИНТ». Москва. - 2012. - 305 с.

4. *Метаболический синдром* Под ред.чл.-корр. РАМН Г.Е. Ройтберга.- М.: МЕД-М54 пресс-информ, 2007. -224 с.
5. *Sheridan D.J. Mechanisms od reduced coronary reserve in cardiac hypertrophy.* // UK.: London. 1998. - P.135-143.

**Сведения об авторах**

**Артём Федорович Иштулин,**

ассистент кафедры биологической химии с курсом КЛД  
ФДПО

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России  
Рязань, Россия

**E-mail:** a.ishtulin@yandex.ru

**Наталья Васильевна Короткова,**

к.м.н., доцент, доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО, с.н.с. ЦНИЛ

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России  
Рязань, Россия

**E-mail:**fnv8@yandex.ru

**Ирина Васильевна Матвеева,**

к.м.н., доцент, зав. кафедрой биологической химии с курсом КЛД ФДПО

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России  
Рязань, Россия

**E-mail:** i.matveeva@rzgmu.ru

**Иван Вячеславович Минаев,**

студент лечебного факультета  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России  
Рязань, Россия

**E-mail:** ivan.minaev98@yandex.ru

**Полякова Полина Михайловна,**

студентка лечебного факультета  
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России  
Рязань, Россия

**E-mail:** pelageia18@gmail.com

**Information about authors**

**Artem F.Ishtulin,**

Assistant,  
Ryazan State Medical University

Ryazan, Russia

**E-mail:** a.ishtulin@yandex.ru

**Natalya V.Korotkova,**

Cand. Sci. (Med), Assistante Professor,

Ryazan State Medical University

Ryazan, Russia

**E-mail:**fnv8@yandex.ru

**Irina V.Matveeva,**

Cand. Sci. (Med), Assistante Professor,

Head of the Department of Biological Chemistry

Ryazan State Medical University

Ryazan, Russia

**E-mail:** i.matveeva@rzgmu.ru

**Ivan V.Minaev,**

Student,

Ryazan State Medical University

Ryazan, Russia

**E-mail:** ivan.minaev98@yandex.ru

**Polina M.Polyakova,**

Student,

Ryazan State Medical University

Ryazan, Russia

**E-mail:** pelageia18@gmail.com



УДК 62.98  
ГРНТИ 50.09.37  
DOI  
10.47501/978-5-6044060-2-1.325-330

<sup>1</sup>Е. А. Бадеева, <sup>1</sup>Т. И. Мурашкина, <sup>1</sup>С. И. Герашенко,  
<sup>2</sup>Д. И. Серебряков, <sup>1</sup>В. А. Бадеев, <sup>1</sup>Т. В. Паршикова  
<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»  
<sup>2</sup>АО «НИИ физических измерений»

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ КАТЕТЕРНОГО ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО ДАТЧИКА ДЛЯ ИНВАЗИВНОГО ИЗМЕРЕНИЯ НИЗКИХ ДАВЛЕНИЙ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

*Рассмотрены проблемные вопросы, возникающие при измерении низких давлений при диагностике физиологического и патофизиологического состояния организма человека и связанные в связи с этим сложности проектирования средств измерений. Предложено использовать волоконно-оптический датчик низких давлений (ВОДНД), располагаемый в узком катетере. Рассчитан прогиб тефлоновой мембраны, имеющей малые габариты и стабильную упругость материала, обеспечивающий требуемую чувствительность преобразования оптического сигнала в диапазоне измерения давления 0...100 мм рт. ст.*

**Ключевые слова:** Измерение, низкое давление, волоконно-оптический датчик, функция преобразования, мембрана диагностика, измерение, катетер, оптическое волокно, упругий элемент

<sup>1</sup>E. A. Badeeva, <sup>1</sup>T. I. Murashkina, <sup>1</sup>S. I. Gerashchenko,  
<sup>2</sup>D. I. Serebryakov, <sup>1</sup>V. A. Badeev, <sup>1</sup>T. V. Parshikova  
<sup>1</sup>Penza State University  
<sup>2</sup>JSC «Research Institute of Physical Measurements»

## INVESTIGATION OF THE POSSIBILITY OF CREATING F CATHETER FIBER-OPTIC SENSOR FOR INVASIVE MEASUREMENT OF LOW PRESSURES IN THE DIAGNOSIS OF THE PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL STATE OF THE HUMAN BODY

*The problematic issues that arise when measuring low pressures in the diagnosis of the physiological and pathophysiological state of the human body and the associated difficulties in designing measuring instruments are considered. It is proposed to use a fiber-optic low pressure sensor located in a narrow catheter. The deflection of a Teflon membrane with small dimensions and stable elasticity of the material is calculated, providing the required sensitivity of the optical signal conversion in the pressure measurement range 0...100 mm Hg.*

**Keywords:** Measurement, low pressure, fiber-optic sensor, conversion function, membrane diagnostics, measurement, catheter, optical fiber, elastic element

### Введение

Давление является наиболее показательным источником информации о состоянии здоровья пациента при диагностике физиологического и патофизиологического состояния организма человека [1]. Давление может упасть до минус 10 кПа (минус 75 мм рт. ст.) в случае внутриальвеолярного и внутритрахеального давления и может подняться до 40 кПа (300 мм рт. ст.) для аортального и левого желудочка. Диастолическое давление в расслабленном кровеносном сосуде имеет нормальный диапазон 60...80 мм рт. ст. и может быть повышено до 90...120 мм рт. ст. в систолическом сокращенном кровеносном сосуде [2].

При разработке датчиков давления определяющими являются диапазон измеряемых давлений и чувствительность измерительного преобразователя датчика [3]. Измерение должно быть точным в соответствующем диапазоне измерений для исследуемого органа. Основная проблема, встающая перед инженерами-разработчиками датчиков давления, - это низкие значения давлений, подлежащих измерению [4,5]. В настоящее время точность измерения давления в различных органах человека достаточно низкая, так как давление часто измеряется косвенно через водяной или воздушный столб и/или

в месте, удаленном от интересующего объекта [6].

Анализ катетерных медицинских датчиков прямого измерения давления показал практическое отсутствие таковых из-за трудности достижения достаточной чувствительности преобразования сигналов из-за низких значений давления (в среднем 60 мм рт. ст.), из-за малых поперечных размеров катетеров (диаметр 2,5...3,0 мм), в которых они устанавливаются. Для таких значений давления трудно подобрать упругий воспринимающий элемент (мембрану), имеющий малые габариты, стабильную упругость материала, из которого он изготовлен.

Датчики на основе оптических волокон становятся отличной альтернативой электрическим датчикам на основе катетеров, проводников и МЭМС [8]. Их небольшие размеры делают их идеальными для использования в зонах с ограниченным объемом. Поскольку они изготовлены из кварцевого стекла, они невосприимчивы к радиочастотному излучению и, следовательно, совместимы для использования в МРТ, их можно стерилизовать, не влияя на их свойства.

### Цель работы

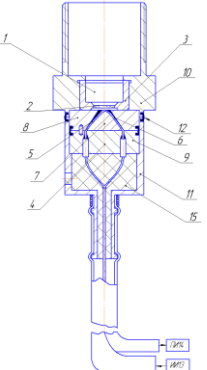
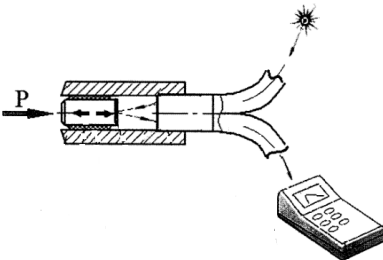
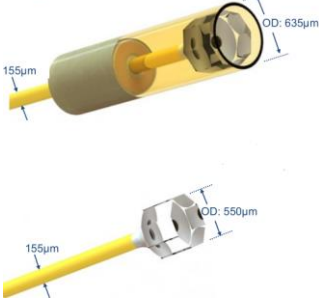
Цель работы - разработка катетерного малогабаритного прецизионного волоконно-оптического датчика отражательного типа для прямого инвазивного измерения низких давлений на разных стадиях диагностики физиологического и патофизиологического состояния организма человека.

### Материалы и методы

Проведен патентный поиск волоконно-оптических датчиков давления (ВОДД), имеющих малые габаритные размеры, в первую очередь, малый диаметр с точки зрения возможного их расположения в катетере. В процессе поиска отобрано несколько охраняемых документов, наиболее близких к объектам разработки и принятых для детального анализа. В частности, известен ВОДД, имеющий канал для подвода рабочей среды, оканчивающийся заглушкой в виде мембраны, на обратной стороне которой выполнены стойки, в которых жестко закреплено оптическое волокно с двумя решетками Брэгга в качестве чувствительного элемента [9]. Недостатком данного устройства является наличие волоконной решетки Брэгга, средство обработки которой - интеррогатор - имеет высокую стоимость, порядка 1...1,5 млн. руб. Кроме того, большие поперечные размеры затрудняют их расположение в катетере.

Известен малогабаритный ВОДД, содержащий мембранный блок, блок оптических волокон, в котором срезанные под некоторым углом концы подводящих и отводящих оптических волокон расположены во втулке на детали треугольной формы и прижаты крышкой (таблица 1, рисунок 1) [10].

Таблица 1 – Известные технические решения малогабаритных волоконно-оптических датчиков давления

		
<p>Рисунок 1 – Волоконно-оптический датчик давления [10]</p>	<p>Рисунок 2 - Датчик измерения давления в кровеносном сосуде [11]</p>	<p>Рисунок 3 - Оптоволоконный датчик давления FISO [12]</p>

Этот датчик имеет малый поперечный диаметр, удобный для расположения в

катетере, но его основным недостатком является наличие стеклянной мембраны, что не подходит для измерения низкого давления, нужен более эластичный и гибкий материал для мембраны.

Особый интерес представляет датчик измерения давления в кровеносном сосуде, содержащий полый цилиндрический корпус, внутри которого закреплен чувствительный элемент и волоконно-оптический преобразователь, включающий излучающий и приемный световоды для регистрации перемещений чувствительного элемента (ЧЭ) и расположенный вне корпуса блока измерения интенсивности света, к которому подключен приёмный световод волоконно-оптического преобразователя (таблица 1, рисунок 2) [11]. ЧЭ выполнен в виде коаксиально установленных во внутренней полости корпуса металлического стержня и эластичной втулки, которая жёстко соединена со стенкой внутренней полости корпуса и стержнем, с возможностью упругого возвратно-поступательного перемещения стержня вдоль продольной оси корпуса, причём торец стержня, обращённый к волоконно-оптическому преобразователю, имеет зеркальную поверхность. Данный ВОДД мог бы быть прототипом разрабатываемого ВОДНД. Но предварительны расчеты показали, что диапазон измерения такого датчика смещен в зону давлений, превышающих 300 мм рт. ст. из-за соединительного элемента, обеспечивающего возвратно-поступательное движение стержня.

В качестве прототипа выбран оптоволоконный датчик давления FISO, который позволяет измерять инвазивно давление в сердечно-сосудистой системе, внутричерепное давление, внутриглазное, уретральное, давление мочевого пузыря и т.д. (таблица 1, рисунок 3) [12]. Однако датчик имеет сложную технологию изготовления, что ведет к большой стоимости. Кроме того, этот датчик необходимо расположить в катетере, что еще более усложнит возможность его применения.

Авторы работы [3] провели многочисленные исследования в области проектирования микро-оптико-механических систем ВОДД в основном для изделий ракетно-космической техники. Необходимо эти разработки адаптировать к разрабатываемым конструктивно-технологическим решениям нового ВОДНД медицинского назначения.

### **Полученные результаты**

В качестве базового измерительного преобразователя используется волоконно-оптический преобразователь линейных микроперемещений отражательного типа (рисунок 4) [13].

Впервые волоконно-оптический преобразователь микроперемещений будет изначально встроен в катетер малого диаметра новой конструкции, а зеркальная поверхность будет сформирована по новой технологии напыления на внутренней поверхности тефлоновой микромембраны, что позволит повысить чувствительность преобразования низких давлений в изменение интенсивности оптического ИК-излучения, снизить габаритные размеры ВОДНД в сравнении с известными инвазивными средствами измерений низких давлений.

Модуляция интенсивности оптического сигнала осуществляется благодаря изменению под действием измеряемого давления зеркальной поверхности, сформированной на внутренней поверхности тефлоновой микромембраны.

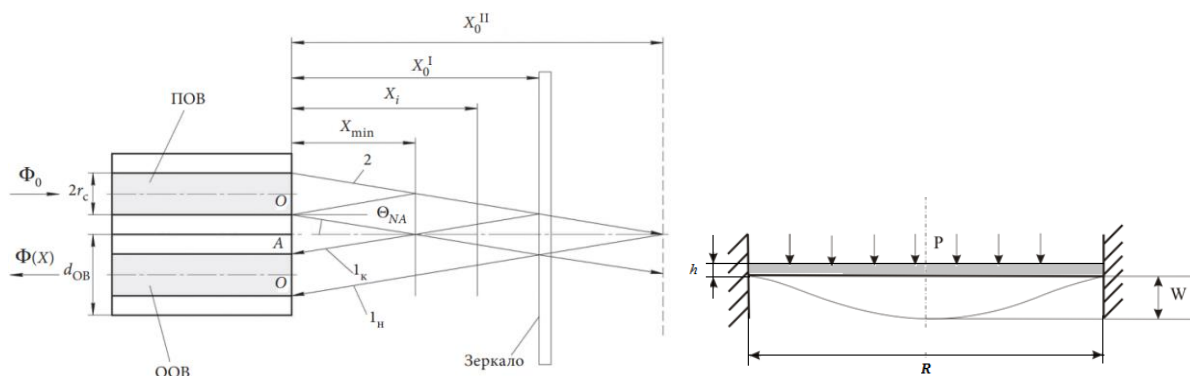


Рисунок 4 – Схема, поясняющая процесс модуляции оптического сигнала при перемещении отражающей поверхности мембраны относительно торцов оптических волокон в ВОДНД

Лучи света (габаритные лучи 1 и 2) от передающего подводящего волокна ПОВ проходят в прямом направлении путь  $L(X)/2$  до отражателя и путь  $L(X)/2$  в обратном направлении до отводящего оптического волокна ООВ под апертурным углом  $\Theta_{NA}$  к оптической оси волокна. Функция преобразования ВОДНД имеет вид [8]:

$$\Phi(X) = \Phi_0 \frac{\rho}{4\pi r_c (2X_i \Theta_{NA} - r_c)} \left\{ \frac{R}{2} \left[ \frac{\pi}{90} \arcsin \frac{a}{2R} - \sin \left( 2 \arcsin \frac{a}{2R} \right) \right] + \right. \\ \left. + \frac{r_c^2}{2} \left[ \frac{\pi}{90} \arcsin \frac{a}{2r_c} - \sin \left( 2 \arcsin \frac{a}{2r_c} \right) \right] \right\}, \quad (1)$$

где  $\Phi_0$  - световой поток, введенный в зону измерения;  $\rho$  - коэффициент отражения зеркальной поверхности;  $r_c$  - радиус сердцевины оптического волокна (ОВ);  $\Theta_{NA}$  - апертурный угол ОВ;  $X_i$  - текущее значение расстояния от отражающей поверхности мембраны до ООВ;  $R$  - внешний диаметр кольцевой освещенной зоны в плоскости ООВ,  $R=2(X_i \Theta_{NA} - r_c)$ .

Определено что, если в ВОДНД применяется плоская мембрана, то при воздействии давления  $P$  на мембрану, она деформируется, принимая сферическое очертание. Для определения микроперемещений центра мембраны  $w$  необходимо воспользоваться известной формулой [14]:

$$w = \frac{3pR^4(1-\mu^2)}{16Eh^2} \quad (2)$$

Выбираем материал мембраны – тефлон, модуль упругости  $E$  которого равен 4500 МПа; коэффициент Пуассона  $\mu=0,45$ , материал напыляющего слоя мембраны - серебро, коэффициент отражения которого  $\rho=0,95$ , радиус мембраны  $R=1$  мм, чтобы разместить чувствительный элемент в катетере диаметром не более 3 мм.. Толщину мембраны  $h$  возьмём равной 0,024...0,025 мм, чтобы обеспечить нужную чувствительность преобразования сигналов. Начальное расстояние между мембраной и оптическими волокнами 0,95...1,0 мм. Диапазон изменения давления принят равным равным 0...100 мм рт. ст., то есть 0...13,3 кПа [1].

По результатам расчёта (таблица 2) построим график зависимости прогиба мембраны  $w$  от действующего на неё давления  $p$  (рисунок 5).

Таблица 2 – Результаты расчёта прогиба тефлоновой мембраны в зависимости от действующего на неё давления

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$p$ , кПа	0	1,33	2,66	3,99	5,32	6,65	7,98	9,31	10,64	11,97	13,3
$p$ , мм рт. ст.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
$w$ , мкм	0	3,2	6,4	9,6	12,8	16	19,2	22,4	25,6	28,8	32

Из графика видно, что зависимость прогиба мембраны от действующего на него давления линейная.

**Выводы.** Предварительные расчеты геометрических параметров мембраны позволяют надеяться на создание новой конструкции катетерного ВОДНД, встроенного в узкий катетер и обеспечивающего прямое измерение давления в конкретных точках и зонах тела человека.

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

- обоснование возможности создания малогабаритного прецизионного катетерного ВОДНД;
- обоснование используемых материалов мембраны, ОВ, обеспечивающих снижение габаритов ВОДНД;
- результаты расчёт мембраны с выбранными параметрами, показавшие, что зависимость прогиба мембраны от действующего на неё давления линейная.

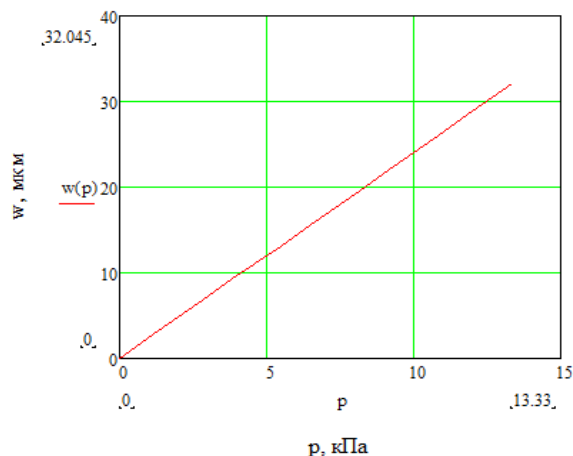


Рисунок 5 – Зависимость прогиба мембраны от действующего на неё давления

### **Благодарности**

**Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда и администрации Краснодарского края в виде гранта № 22-15-20069**

### **Список литературы**

1. Проблемные вопросы применения ВОДД в медицинской практике/Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Геращенко С.И. и др. // В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2021. Весенняя сессия. Москва, 2021. С. 16-32
2. Optical Fibre Pressure Sensors in Medical Applications/Sven Poeggel , Daniele Tosi, Dinesh Babu Duraibabu, Gabriel Leen, Deirdre McGrath and Elfed Lewis // Sensors 2015, 15(7), 17115-17148
3. Микро-оптико-механические системы волоконно-оптических датчиков давления: монография / Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, А.В. Бадеев. Пенза.: изд-во ПГУ, - 2020. - 268 с.
4. Tagawa, T.; Tamura, T.; Oberg, P.A. Pressure Measurement. In Biomedical Sensors and Instruments, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2011; Chapter 2.
5. Clausen, I.; Glott, T. Development of Clinically Relevant Implantable Pressure Sensors: Perspectives and Challenges. Sensors 2014, 14, 17686–17702.
6. Бордин Д.С., Валитова Э.Р. Методика проведения и клиническое значение манометрии пищевода. Методические рекомендации № 50 ДЗМ) / Под ред. д.м.н., проф. Л.Б. Лазебника. – М.: ИД "МЕДПРАКТИКА-М". – 2009. – 24 с.
7. Бордин Д.С., Валитова Э.Р. Методика проведения и клиническое значение манометрии пищевода (Методические рекомендации № 50 ДЗМ) / Под ред. д.м.н., проф. Л.Б. Лазебника. – М.: ИД "МЕДПРАКТИКА-М". – 2009. – 24 с.
8. Волоконно-оптические приборы и системы: Научные разработки НТЦ "Нанотехнологии волоконно-оптических систем" Пензенского государственного

- университета Ч. I / Т. И. Мурашкина, Е. А. Бадеева. СПб.: Политехника, 2018. 187 с.
9. Патент РФ № 2628734, 2016.11.09,  
[https://yandex.ru/patents/doc/RU2628734C1\\_20170821](https://yandex.ru/patents/doc/RU2628734C1_20170821)
10. патент РФ № 2474798, 2011.02.01,  
[https://yandex.ru/patents/doc/RU2474798C2\\_20130210](https://yandex.ru/patents/doc/RU2474798C2_20130210)
11. патент РФ № 149252, [https://yandex.ru/patents/doc/RU149252U1\\_20141227](https://yandex.ru/patents/doc/RU149252U1_20141227)
12. [https://fiso.com/wp-content/uploads/2018/10/МС-00263\\_-Medical-Pressure-Monitoring-Product-Datasheet\\_R7.pdf](https://fiso.com/wp-content/uploads/2018/10/МС-00263_-Medical-Pressure-Monitoring-Product-Datasheet_R7.pdf)
13. Бадеева Е. А., Мурашкина Т. И., Мещеряков В. А. Волоконно-оптические датчики давления отражательного типа для летательных аппаратов // Датчики и системы. 2001. №9. С.14-18.
14. Андреева, Л. Е., Упругие элементы приборов.– М. : Машиностроение, 1981.

**Сведения об авторах**

**Елена Александровна Бадеева,**

д.т.н., доцент,  
профессор кафедры «Радиотехника и радиоэлектронные устройства»,  
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия

**E-mail:** [badeeva\\_elena@mail.ru](mailto:badeeva_elena@mail.ru)

**Татьяна Ивановна Мурашкина ,**

д.т.н.,  
профессор кафедры «Приборостроение»  
ФГБОУ ВО  
«Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия

**E-mail:** [timurashkina@mail.ru](mailto:timurashkina@mail.ru)

**Сергей Иванович Геращенко,**

д.т.н., профессор, заведующий кафедрой «Медицинская кибернетика и информатика»,  
ФГБОУ ВО  
«Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия

**E-mail:** [mpo@list.ru](mailto:mpo@list.ru)

**Дмитрий Иванович Серебряков,**

к.т.н.,  
начальник научно-исследовательской лаборатории  
АО «НИИ физических измерений»  
Пенза, Россия

**Владислав Александрович Бадеев,**

слушатель-абитуриент  
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия

**Татьяна Викторовна Паришкова,**

студентка кафедры «Приборостроение»  
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия

**E-mail:** [ms.parshikova01@mail.ru](mailto:ms.parshikova01@mail.ru)

**Information about authors**

*Elena Aleksandrovna Badeeva,  
Doctor of Technical Sciences, Associate Professor,  
Professor of the Department of Radio Engineering  
and Radio Electronic Devices,  
Penza State University  
Penza, Russia*

**E-mail:** [badeeva\\_elena@mail.ru](mailto:badeeva_elena@mail.ru)

*Tatiana Ivanovna Murashkina ,  
Doctor of Technical Sciences,  
Professor of the Department of Instrument Engi-  
neering  
Penza State University  
Penza, Russia*

**E-mail:** [timurashkina@mail.ru](mailto:timurashkina@mail.ru)

*Sergey Ivanovich Gerashchenko,  
Doctor of Technical Sciences, Professor,  
Head of the Department of Medical Cybernetics  
and Computer Science,  
Penza State University  
Penza, Russia*

**E-mail:** [mpo@list.ru](mailto:mpo@list.ru)

*Dmitry Ivanovich Serebryakov,  
Candidate of Technical Sciences,  
Head of the Research Laboratory  
JSC "Research Institute of Physical Measurements"  
Penza, Russia*

**Vladislav Alexandrovich Badeev,**

*student-entrant  
Penza State University  
Penza, Russia*

*Tatiana Viktorovna Parshikova,  
student of the Department of "Instrument Engineer-  
ing"*

*Penza State University  
Penza, Russia*

**E-mail:** [ms.parshikova01@mail.ru](mailto:ms.parshikova01@mail.ru)

УДК 62.93, 62-791.2  
ГРНТИ 59.14, 59.31  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.331-336

<sup>1</sup>Т. И. Мурашкина, <sup>2</sup>Е. А. Бадеева, <sup>3</sup>Ф. С. Аюпова  
<sup>3</sup>Ю. А. Васильев, <sup>3</sup>Т. В. Пономаренко, <sup>2</sup>Т. В. Паршикова  
<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»  
<sup>2</sup>ООО «Специальные волоконно-оптические  
измерительные системы»  
<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный  
медицинский университет»

## СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗМЕРОВ И КОНФИГУРАЦИИ НЁБА ПАЦИЕНТА

*В статье предлагается для точного измерения давления языка на нёбо ввести в конструкцию волоконно-оптического датчика давления дополнительный элемент, профиль и размеры которого повторяют профиль и размеры неба пациента. Для его быстрого и тонкого изготовления предлагается с помощью оригинального устройства, представляющего собой платформу с полозьями, по которым перемещается волоконно-оптический чувствительный элемент, определять по изменению отраженного от неба светового потока расстояния до отдельных точек нёба.*

**Ключевые слова:** волоконно-оптический способ, нёбо, морфометрическое измерение, волоконно-оптический датчик, давление, дополнительный элемент, оптическое волокно

<sup>1</sup>T. I. Murashkina, <sup>2</sup>E. A. Badaeva, <sup>3</sup>F. S. Ayupova,  
<sup>3</sup>Y. A. Vasiliev, <sup>3</sup>T. V. Ponomarenko, <sup>2</sup>T.V. Parshikova  
<sup>1</sup>Penza State University  
<sup>2</sup>LLC "Special fiber-optic measuring system"  
<sup>3</sup>Kuban state medical University

## PROBLEMATIC ISSUES OF THE USE OF FIBER-OPTIC PRESSURE SENSORS IN MEDICAL PRACTICE

*The article proposes to accurately measure the pressure of the tongue on the palate to introduce an additional element into the design of a fiber-optic pressure sensor, the profile and dimensions of which repeat the profile and dimensions of the patient's palate. For its rapid and high-quality manufacture, it is proposed to determine the distance to individual points of the sky by changing the reflected light flux from the sky using an original device, which is a platform with runners on which a fiber-optic sensor element moves.*

**Keywords:** fiber-optic method, sky, morphometric measurement, fiber-optic sensor, pressure, additional element, optical fiber

### Введение

На разных стадиях диагностики челюстно-лицевых патологий человека необходимы соответствующие медицинские технические достоверные средства измерения. При челюстно-лицевых патологиях (врожденных или приобретенных) одним из первых меняет свое положение язык в полости рта [1,2]. Он смещается в глубину ротовой полости, его спинка приподнимается к краям расщелины нёба, а кончик не принимает участия в формировании звуков. В полости рта – язык оказывает давление на окружающие ткани, так как является сильнейшим мышечным органом полости рта [3]. Давление языка на небо является наиболее показательным источником информации о состоянии полости рта [4]. Эти проблемные вопросы в работах [5,6] было предложено решить с помощью малогабаритных микроизгибных и аттенуаторно-отражательных волоконно-оптических датчиков давления (ВОДД), снижающего дискомфорт и риск повреждения мягких тканей, вызывающих травматизацию с болевым синдромом.

Одна из проблем, встающая перед разработчиками средств измерения давления языка на нёбо связана с неоднозначностью морфометрических параметров полости рта. Для точного измерения давления языка на нёбо необходим контакт установочной поверхности датчика со слизистой оболочкой нёба, а мембраны – с языком, для чего надо точно знать морфометрические параметры нёба.

В работе [7] приведены сведения о различных способах измерения высоты нёба:



«Диагностическое значение измерений высоты нёба выдвинуто *Simon*. При помощи описанного им гнатографа сагиттальную и трансверсальную кривую нёба переносят на миллиметровую бумагу. Кривую нёба можно перенести на миллиметровую бумагу, применив также симметрограф *Korkhaus* со срезающей решеткой или с рисовальщиком. Срезающая решетка (конструкция, предложенная *van Loon*) состоит из большого количества тонких металлических прутьев, которые при освобождении зажимного приспособления перерезают модель в сагиттальном или трансверсальном направлении, и кривую нёба с помощью острого карандаша переносят на миллиметровую бумагу. Рисовальщик кривую нёба отображает сразу графически на миллиметровой бумаге.

*Mehnert* (1956) описывает метод фотографирования моделей с целью изображения кривой нёба. По данному методу делают трансверсальную и сагиттальную диаграммы небного свода.

Измерение высоты нёба на моделях в сагиттальном и трансверсальном направлениях проводят по различным методикам. А. И. Яворовская (1948) пользовалась аппаратом и методом М. А. Пискунова (1944), который измерял высоту, ширину и длину нёбного свода в 4 плоскостях: на уровне первых и вторых премоляров и на уровне первых и вторых моляров. А. И. Яворовская измеряла высоту нёба и на уровне клыков. Ширина нёба измерялась по внутренней поверхности зубов, высота – в области срединного сагиттального шва на уровне десневого края и до уровня жевательных поверхностей зубов, длина нёба устанавливалась от десневого края по линии, параллельной окклюзионной плоскости.

Для измерения высоты неба Л. В. Ильина-Маркосян (1951) сконструировала специальную линейку с вырезкой в середине, в которую вставлен подвижный стержень со шкалой. Эту линейку укладывают на бугры клыков, премоляров и моляров и измеряют высоту неба по сагиттальной линии.

*Korkhaus* измерял глубину неба при помощи трехмерного циркуля от прямой линии, соединяющей середину фиссур первых моляров, к нёбному шву перпендикулярно по отношению к окклюзионной плоскости. Высоту нёба определяют по отношению к длине зубных дуг по формуле:

$$\frac{\text{Высота нёба} \times 100}{\text{Длина зубной дуги}} = \text{индекс высоты нёба} \cdot$$

*Bertzbach* отмечает, что определение высоты нёба по альвеолярному отростку не может считаться удовлетворительным, особенно когда необходимо выяснить взаимосвязь роста носовых костей и верхней челюсти. Кроме того, высота нёба не является метрически устанавливаемой величиной, так как не существует определенных измерительных точек. *Vloch*, например, измерял высоту нёба от середины линии, идущей по жевательным поверхностям зубов, вертикально к костному небному шву, *Harth* рельеф нёба обозначал вдоль премоляров и моляров, *Kjaerholm* – относительно орального и гингивального края верхней челюсти в области 1.6 и 2.6.

Чтобы установить высоту нёба, *Bertzbach* (1959) измерял на моделях ширину зубных дуг в области 1.6 и 2.6 и ширину верхних резцов.

По мнению автора, высокое и плоское небо определяет не абсолютная высота, а его соотношение с шириной зубной дуги. Поэтому автор по примеру *Meuer* рассчитал индекс высоты неба, который равен:

$$\frac{\text{Высота нёба} \times 100}{\text{Ширина зубной дуги}} \cdot$$

Высота нёба измерялась автором и на телерентгенограммах по отношению к окклюзионной плоскости и к плоскости базиса верхней челюсти (от мезиальных бугров 1.6 и 2.6 до костного нёбного шва). Средняя высота неба по отношению окклюзионной плоскости равна 42,4, а по отношению к плоскости базиса – 43,3».



Эти сведения были опубликованы в 1970 году. Естественно, они сейчас вызывают улыбку у разработчиков средств измерений. Но, к сожалению, более совершенных простых и доступных средств измерения не разработано.

В настоящее время в стоматологии используют интраоральные (внутриротовые) 3D-сканеры -устройства для создания цифровых слепков [8]. Подобно другим оптическим 3D-сканерам, они проецируют свет на сканируемый объект, принимают отраженный световой сигнал и передают в компьютер для составления объемного изображения. Интраоральный или внутриротовой сканер удобное решение для стоматолога. Но такие сканеры не могут быть применены для определения профиля и размеров нёба по нескольким причинам:

- имеют габаритные размеры, превышающие размеры полости ребенка;
- чувствительность преобразования оптического сигнала будет низкая, так как отражающая поверхность нёба имеет малый коэффициент отражения, соответственно точность измерения расстояний до нёба тоже низкая
- в большинстве своем они рассчитаны на использование сложного программного обеспечения и сложной вторичной аппаратуры.

**Цель исследования** – повышение точности выполнения морфометрических измерений размеров и конфигурации нёба пациента для дальнейшего прецизионного измерения давления языка на нёбо.

#### **Материалы и методы**

При давлении языка на воспринимающий элемент ВОДД аттенюаторно-отражательного типа, рассмотренного в работе [4], аттенюатор перемещается перпендикулярно между торцами рабочих отводящих оптических волокон ООВ<sub>р</sub> и неподвижной зеркальной поверхностью. Конструкция ВОДД не позволяет абсолютно точно расположить его в полости рта, так как воспринимающая поверхность плоская, а нёбо имеет вогнутый профиль. Это в конечном счете снижает точность измерения давления. Для результативного измерения давления языка на нёбо необходимо в конструкцию ВОДД ввести дополнительный элемент, повторяющий контур нёба, для контактирования датчика с нёбом. Но в виду того, что ротовая полость разная у разных пациентов, то дополнительный элемент должен изготавливаться под конкретного пациента, то есть он будет съёмным.

Возникает необходимость определения её геометрических размеров, которые будут соответствовать размерам полости рта конкретного пациента. Для этого предлагается профиль нёба определять с помощью разрабатываемого оптического способа определения размеров и сканера.

#### **Полученные результаты**

Предлагается сканировать поверхность нёба с помощью волоконно-оптического устройства, представляющего собой платформу, располагаемую в полости рта пациента, в которой выполнены ползья, по которым перемещается чувствительный элемент ЧЭ (рисунок 1).

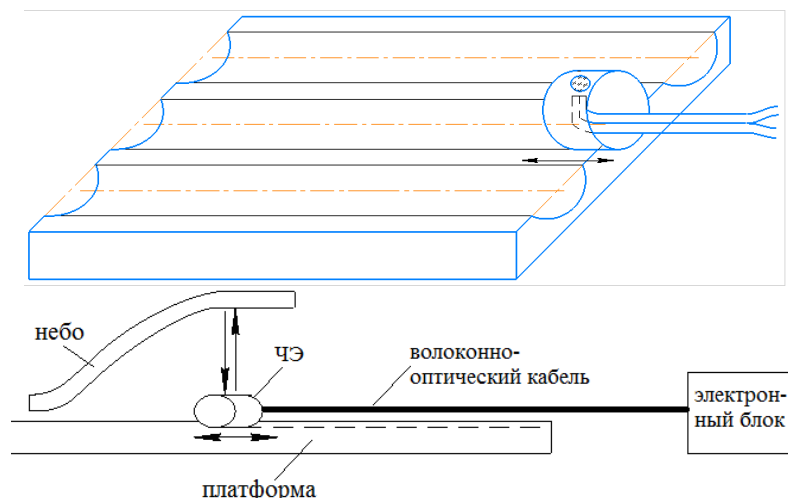


Рисунок 1 – Упрощенная конструкция волоконно-оптического устройства для определения размеров и профиля нёба

В ЧЭ расположены торцы подводящего и отводящего оптических волокон. При необходимости увеличения чувствительности преобразования оптического сигнала возможно применение фокусирующей линзы, которая одновременно формирует необходимое пространственное распределение светового потока с выхода излучающего торца подводящего оптического волокна. С помощью волоконно-оптического кабеля ЧЭ соединен с электронным блоком, в котором расположены источник и приемник излучения, и осуществляется электрооптическое и фотоэлектрическое преобразования.

Световой поток направляется перпендикулярно поверхности нёба, принимается отраженный от нёба световой поток, по интенсивности которого судят о расстоянии от источника излучения до облучаемой поверхности. Эти действия повторяются несколько раз, результаты измерений заносятся в базу данных, которая используется при изготовлении дополнительного элемента для ВОДД на 3D-принтере из безопасного для здоровья пациента пластика.

### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются:

- системный подход к оценке ситуации в области морфометрических измерений параметров полости рта, в частности нёба, показавший отсутствие соответствующих доступных отечественных средств измерения необходимой точности и малых габаритов;

- новый способ измерения размеров и профиля нёба пациента.

### Благодарности

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда и администрации Краснодарского края в виде гранта № 22-15-20069*

### Список литературы

1. Волоконно-оптическая диагностическая система аномалий челюстно-лицевой области у детей, связанных с дисфункцией языка/ Бадеева Е.А., Арутюнов Д.И., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Хасанишина Н.А., Славкин И.Е.// Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + M&Ec`2020 (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2020 г.). 2020. Весенняя сессия. 124 с. С.5-10
2. Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Геращенко С.И., Бростилова С.И., Васильев С.И. 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&Es`2021. Весенняя сессия. Москва, 2021. С. 16-32*
3. Волоконно-оптический датчик силы (давления) мышц языка/ Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Ю.А. Васильев, Д.И. Серебряков, Т.Ю. Бростилова, Н.А. Хасанишина, Л.Ф. Терещенко // *Модели, системы и сети в экономике, технике, природе и обществе*. – 2019. - №3. – С. 83-93.
  4. Врожденные пороки развития лица у детей крупного региона России: современное состояние проблемы и перспективные диагностические решения / Арутюнов А.В., Волобуев В.В., Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А. // *Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + M&Es`2020 (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2020 г.)*. 2020. Весенняя сессия. 124 с. С.73-76
  5. Патент на изобретение РФ 2741274 Волоконно-оптический датчик силы мышц языка – давления языка на небо и способ его сборки/ Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Ю.А.Васильев, Д.И. Серебряков, А.В. Арутюнов, Л.Ф.Терещенко, Т.Ю. Бростилова, Н.А. Хасанишина// Опубликовано: 2021.01.22, бюл.3
  6. Патент на изобретение РФ 2740538 МПК G01L 13/00. Способ преобразования светового потока и реализующий его волоконно-оптический датчик давления/ Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Д.И. Серебряков, А.В.Бадеев// Опубликовано: 2021.01.15, бюл.2
  7. Ужумецкене И.И., *Методы исследования в ортодонтии*, М: изд.во «Медицина» - 1970
  8. *carestreamdental.com*

**Сведения об авторах**

**Татьяна Ивановна Мурашкина**,  
д.т.н.,  
профессор кафедры «Приборостроение»  
ФГБОУ ВО  
«Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия

**E-mail:** [timurashkina@mail.ru](mailto:timurashkina@mail.ru)

**Елена Александровна Бадеева**,  
д.т.н., доцент,  
генеральный директор  
ООО «Специальные волоконно-оптические  
измерительные системы»  
Заречный, Россия

**E-mail:** [badeeva\\_elena@mail.ru](mailto:badeeva_elena@mail.ru)

**Фарида Сагитовна Аюпова**,  
к.м.н., доцент, доцент кафедры детской стоматологии,  
ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии,  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный  
медицинский университет»  
Краснодар, Россия

**E-mail:** [farida.sag@mail.ru](mailto:farida.sag@mail.ru)

**Юрий Анатольевич Васильев**,  
ассистент кафедры общественного здоровья, э  
дравоохранения и истории медицины,  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный  
медицинский университет»  
Краснодар, Россия

**E-mail:** [yurii-59@mail.ru](mailto:yurii-59@mail.ru)

**Тамара Владимировна Пономаренко**,  
клинический ординатор кафедры стоматологии общей  
практики,  
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный  
медицинский университет»  
Краснодар, Россия

**E-mail:** [farida.sag@mail.ru](mailto:farida.sag@mail.ru)

**Information about authors**

**Tatiana Ivanovna Murashkina**,  
Doctor of Technical Sciences,  
Professor of the Department of Instrument Engi-  
neering

Penza State University  
Penza, Russia

**E-mail:** [timurashkina@mail.ru](mailto:timurashkina@mail.ru)

**Elena Aleksandrovna Badeeva**,  
Doctor of Technical Sciences,  
Associate Professor,  
General Director  
LLC "Special fiber-optic measuring system", Za-  
rechny, Penza region, Russia

**E-mail:** [badeeva\\_elena@mail.ru](mailto:badeeva_elena@mail.ru)

**Farida Sagitovna Ayupova**,  
PhD, Associate Professor, Associate Professor of  
the Department of Pediatric Dentistry,  
Orthodontics and Maxillofacial Surgery,  
Kuban state medical University  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** [farida.sag@mail.ru](mailto:farida.sag@mail.ru)

**Yuri Anatolyevich Vasiliev**,  
Assistant  
of the Department of Public Health, Healthcare  
and History of Medicine,  
Kuban state medical University  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** [yurii-59@mail.ru](mailto:yurii-59@mail.ru)

**Tamara V. Ponomarenko**,  
Clinical Resident  
of the Department of General Practice Dentistry,  
Kuban state medical University  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** [farida.sag@mail.ru](mailto:farida.sag@mail.ru)

**Татьяна Викторовна Паршикова,**  
студентка кафедры «Приборостроение»  
ООО «Специальные волоконно-оптические измерительные  
системы»  
Пенза, Россия  
E-mail: ms.parshikova01@mail.ru

**Tatiana Viktorovna Parshikova,**  
student of the Department of "Instrument Engineer-  
ing"  
LLC "Special fiber-optic measuring system", Za-  
rechny, Penza region, Russia  
E-mail: ms.parshikova01@mail.ru

УДК 613.952:613.287.8  
ГРНТИ 59.14, 59.31  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.336-341

<sup>1</sup>Е.Ю. Плотникова, <sup>2</sup>Е. А. Бадеева, <sup>2</sup>Т. И. Мурашкина,  
<sup>1</sup>А. Н. Ломтева, <sup>1</sup>А. Г. Фоменко, <sup>1</sup>Е. Л. Шаповалова,  
<sup>1</sup>Е. Г. Давыденко, <sup>1</sup>Е. С. Кочетова, <sup>3</sup>А. В. Оленская  
ГБУЗ Роддом г. Краснодара Министерства Здравоохранения  
Краснодарского края  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»  
<sup>3</sup>Федеральное государственное образовательное учреждение  
высшего образования «Кубанский государственный  
медицинский университет» Минздрава России

## ОСОБЕННОСТИ ГРУДНОГО И ИСКУССТВЕННОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ НОВОРОЖДЕННЫХ ПЕРИНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА

*Рассматривается взаимосвязь анатомо-физиологических особенностей языка при грудном и искусственном вскармливании с силой его давления. Внедрение волоконно-оптической диагностики силы давления языка новорожденного, так как позволит облегчить подбор оптимального диаметра выходного отверстия соски при искусственном вскармливании ребенка при несостоятельном сосательном рефлексе.*

**Ключевые слова:** грудное и искусственное вскармливание, сосание, сила всасывания, язык, грудное молоко, волоконно-оптический датчик, давление, оптическое волокно.

<sup>1</sup>E Y Plotnikova, <sup>2</sup>E A Badeeva, <sup>2</sup>T I Murashkina,  
<sup>1</sup>A.N. Lomteva, <sup>1</sup>A. G. Fomenko, <sup>1</sup>E.L. Shapovalova,  
<sup>1</sup>E.G. Davydenko, <sup>1</sup>E.S. Kochetova, <sup>3</sup>A.V. Olenskay  
GBUZ Maternity Hospital of Krasnodar of the Ministry of Health  
Penza State University  
Kuban state medical University

## FEATURES OF BREASTFEEDING AND ARTIFICIAL FEEDING OF NEWBORNS OF THE PERINATAL PERIOD

*The interrelation of anatomical and physiological features of the language during breastfeeding and artificial feeding with the strength of its pressure is considered. The introduction of fiber-optic diagnostics of the pressure force of the newborn's tongue, as it will facilitate the selection of the optimal diameter of the nipple outlet during artificial feeding of the child with an untenable sucking reflex.*

**Keywords:** breastfeeding and artificial feeding, sucking, suction force, tongue, breast milk, fiber-optic sensor, pressure, optical fiber.

### Введение

Рациональное питание играет важную роль в процессе роста и развития детей, соответственно правильно организованный процесс грудного и искусственного питания влияет на дальнейшее развитие новорожденного. Первые научные исследования по изучению процесса сосания относятся к началу 20-го века. Ученые (стоматологи, ортодонты, педиатры) изучали процесс сосания при грудном вскармливании, вскармливании из бутылочки через соску при смешанном вскармливании [1].

При рождении изменяется тип питания ребенка, его источник и режим.

Приспособление к этой перемене - важный аспект адаптации к внеутробной жизни [2]. Исключительно грудное вскармливание, особенно раннее, является одним из самых эффективных способов улучшения показателей выживаемости детей 1-го года жизни [3]. У детей формируются и созревают многие органы и системы, совершенствуются их функции. Поэтому детский организм быстрее реагирует на недостаток или избыток различных веществ в рационе, быстро развиваются нарушения деятельности тех или иных систем организма, физического развития, снижается иммунологическая реактивность.

### Цель работы

Анализ условий, необходимых для физиологического сосания новорожденных в перинатальном периоде и дальнейшее влияние на последующее развитие челюстно-лицевых структур.

### Материалы и методы

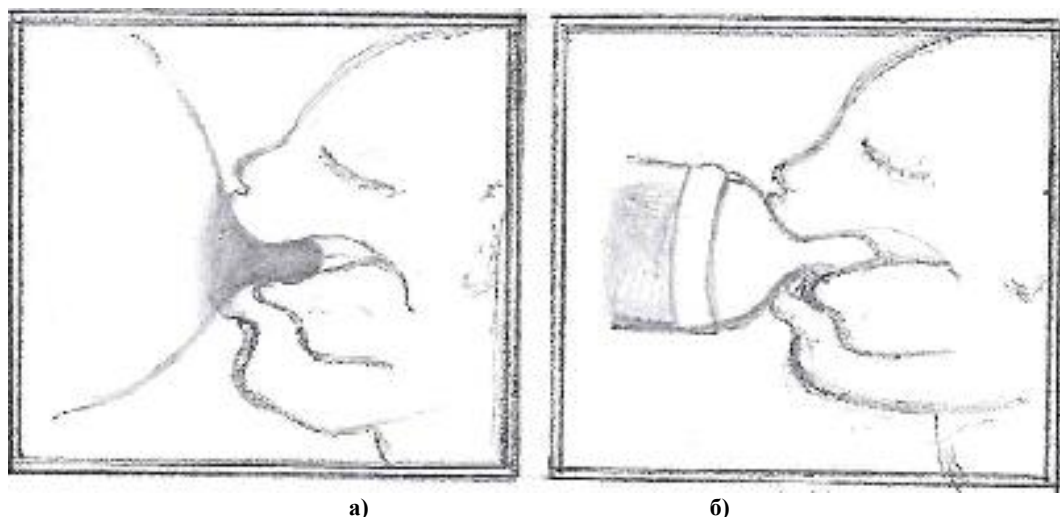
Для проведенного исследования были избраны комбинации методов: анализ научной литературы и статистических данных, полученных на практических результатах отделения новорожденных №1 ГБУЗ роддома г. Краснодара.

### Обсуждение

Ребенок рождается с ретроградно расположенной нижней челюстью (младенческая ретрогения), что облегчает физиологическое прохождение через родовые пути [2]. Но к году нижняя челюсть располагается почти на одной линии с лицевым черепом. Благодаря работе мышц, нижняя челюсть выдвигается вперед, за счет чего альвеолярный отросток становится шире. У взрослого человека нижняя челюсть занимает более 1/3 лицевой части черепа, у новорожденного — менее 1/4.

Сразу после рождения ребенок умеет сосать, но сосательные движения, а так же движения нижней челюсти еще не скоординированы должным образом за счет физиологической незрелости и отсутствия суставного бугорка [3].

При грудном вскармливании ребенок широко раскрывает рот, заглатывая сосок материнской груди и совершает сагиттальные движения, в которых участвует спинка и корень языка, а также мягкое нёбо (рисунок 1а).



а) б)  
Рисунок 1- Кормление ребёнка до года

Формируется отрицательное давление в ротовой полости. Молоко из соска поступает в ротовую полость небольшими порциями и смачиваясь слюной, запускает процесс пищеварения начиная с ротовой полости. Затем ребенок глотает, в этот момент он задерживает дыхание и молоко поступает в глотку.

Ребенок должен совершать ритмичные строго координированные, гармоничные перемещения спинки языка, корня языка и мягкого неба. Именно это позволяет

получить определенную силу всасывания. Сосок материнской груди при этом изменяет свою форму - уплощается снизу и становится асимметричным. Детей следует кормить грудью как можно дольше, так как доказано, что грудное молоко - самая оптимальная пища для новорожденного. В соответствии с резолюцией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), принятой в 2002 году, рекомендуется исключительно грудное вскармливание в течение первых шести месяцев жизни ребенка.

Грудное молоко каждой матери уникально и адаптировано именно для ее ребенка. Оно так же обладает биологической специфичностью. Содержащиеся в молоке пищевые ингредиенты соответствуют ферментативным системам ребенка.

Естественное, или грудное вскармливание - кормление ребенка посредством прикладывания к груди его биологической матери. Главным преимуществом грудного молока является сбалансированный состав всех необходимых ребенку пищевых веществ.

Отделение новорожденных №1 ГБУЗ Роддома г. Краснодара, оснащенное 80-ю койко-местами (60 коек в физиологическом отделении на 3-м этаже и 20 коек в обсервационном отделении на 1-м этаже). Также на базе роддома функционирует отделение патологии новорожденных и недоношенных детей на 15 коек, которые размещены на 3-м этаже в 3-х палатах для совместного пребывания и в двух палатах для раздельного пребывания, исходя из тяжести состояния. Коллектив отделения работает по принципам, провозглашенным ВОЗ/ЮНИСЕФ «Охрана, поощрение и поддержка грудного вскармливания и совместного пребывания матери и ребенка» [4]. Родильный дом полностью оправдывает звание, полученное в 2004 году «Больница, доброжелательная к ребенку».

Большинство родившихся детей находятся на совместном пребывании «мать - дитя» и вскармливаются грудью по требованию ребенка, за исключением детей в критическом состоянии. Практически все дети выписываются домой на грудном вскармливании. Работа построена на поэтапном, круглосуточном оказании медицинской помощи новорожденным, начиная с родильного зала. Сразу после рождения ребенок выкладывается на живот матери «кожа к коже» для контаминации материнской микрофлорой и впервые прикладывается к груди в течение первых 30 минут жизни.

Грудное вскармливание возможно при наличии адекватного сосательного рефлекса, скоординированного с глотанием [5,6]. Сосательно-глотательный рефлекс относится к врожденным оральным рефлексам, которые обеспечивают процесс сосания. Если ребенок родился в срок и здоровым, его прикладывают к груди и он автоматически начинает сосать. Сосательный рефлекс формируется к 33-34 неделям гестации, но по ряду причин этот рефлекс снижается или вовсе угасает. Акт сосания новорожденного также затрудняет короткая уздечка языка (кончик языка при крике приподнимается вверх) [7]. Дети с ослабленным рефлексом вяло сосут грудь или соску бутылочки, либо и вовсе отказываются от питания [8]. Если же ребенок не может быть на грудном вскармливании по ряду причин (острые инфекционные, гнойно-воспалительные заболевания, мастит, оперативное вмешательство в родах и после них, со стороны ребенка это некоторые наследственные болезни: нарушение обмена аминокислот, в том числе галактоземия, фенилкетонурия) в этом случае следует перевести ребенка на искусственное вскармливание (рисунок 1б). Данный вид вскармливания так же сопровождается рядом проблем, одной из которых является парафункция языка [5].

Для предупреждения данного осложнения необходимо проводить контроль поступления количества смеси через отверстие в соске. Если отверстие слишком большое-глотание носит «судорожный» характер за счет того, что объем жидкости за одно глотание больше должествующего объема, вследствие чего ребенок не успевает сосать и просто «проглатывает» смесь, которая свободно поступает и наполняет ротовую полость. Технология оптико-волоконной диагностики измерения давления языка при кормлении поможет предупредить и скорректировать данное осложнение путем подбора соответствующего кормлению выпускного отверстия в соске.

Так же при правильно подобранной соске, ее размере, уходе за ней и своевременной смене, удастся существенно снизить все возможные риски и стимулировать

правильное развитие челюсти. Учитывая все факторы, становится понятно, что при данном виде вскармливания необходимо, чтобы ребенок активно выдвигал нижнюю челюсть, а так же «работал» губами, языком. Следуя им удастся существенно сократить все возможные риски и предотвратить развитие аномалий.

Подводя итог краткого анализа литературных, статистических данных можно сделать вывод, что данная проблема, связанная с искусственным вскармливанием возникла давно и остается актуальной по настоящее время. И в частности размер соски, ее форма, диаметр и количество отверстий, а так же сила с которой ребенок производит акт сосания определялись на основании экспериментальных данных, косвенно требуют дальнейшего изучения.

В работе [9] предложен волоконно-оптический датчик давления языка на нёбо пациента. Данное техническое решение с успехом может быть использовано для решения вышеуказанной проблемы [10]. Такое решение обусловлено малыми размерами датчика, его абсолютной безопасностью для ребёнка. Измерение давления языка на нёбо у новорожденного позволит облегчить подбор оптимального диаметра выходного отверстия соски при искусственном вскармливании ребёнка при несостоятельном сосательном рефлексе.

### **Выводы**

Рациональное вскармливание детей раннего возраста оказывает существенное влияние на физическое и нервно-психическое развитие младенцев. Благодаря анализу анатомо-физиологических аспектов давления языка на мягкое нёбо, окружающие ткани ротовой полости при искусственном вскармливании, метод оптико-волоконной диагностики облегчает подбор оптимального диаметра выходного отверстия соски при искусственном вскармливании новорождённого.

### **Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются: результаты анализа научной литературы и статистических данных, полученных на объективных результатах отделения новорожденных №1 ГБУЗ Родильного Дома г. Краснодара за 2019-2021гг.

**Благодарность.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ) и администрации Краснодарского края (КНФ), проект № 22-15-20069.

### **Список литературы**

1. Хайретдинова Т.Б., Хабибуллина А.Р., Нугуманова Р.Т. – сост. *Вскармливание детей первого года жизни // Учебное пособие. Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2015. С 72.*
2. Шабалов Н.П. *Неонатология: Учебное пособие: в 2 т / . - Т.1- 3-е изд., испр. и доп. // М.: МЕДпресс-информ, 2004.-608 с.*
3. Суразова Л.В. *Оценка качества жизни детей первого года жизни, в зависимости от вида вскармливания // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 6. ; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=23533> (дата обращения: 01.04.2022).*
4. Гурбич Г.И., Плотникова Е.Ю., Васильев Ю.А. *Организационные аспекты блока родовспоможения // В сборнике: Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции. Весенняя сессия. Под редакцией проф. Е.Л.Глориозова. 2018.- С. 261-265.*
5. Булгакова М.И., Симановская Е.Ю., Няшин Ю.И., Тверье *Биомеханика В.М. Вскармливания детей раннего возраста // Российский журнал биомеханики. 2003. №4 (7). С.9-21.*
6. Кузьменко Л.П. *Сосательный рефлекс у новорожденных // Педиатрия.-1957.- №11.- С.22-27.*
7. Плотникова Е.Ю., Тодоренко А.П., Удина И.Г., Васильев Ю.Ю., Васильев Ю.А.



- Способ лечения анкилоглоссии у детей в перинатальном возрасте. Патент на изобретение RU 2558979 С1. 10.08.2015. Заявка №2014100331/14 от 09.01.2014.
8. Васильев Ю.А., Учаева В.С., Грачева А.С., Плотникова Е.Ю., Удина И.Г. Изучение врожденной патологии челюстно-лицевой области у детей крупного региона РФ с учетом пространственно-временной динамики и факторов загрязнения окружающей среды // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Межд. Конф. NT + M&Ec 2019. Весенняя сессия. 2019. С.128-132.
  9. Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Хасаницина Н.А., Славкин И.Е. Волоконно-оптические датчики давления языка на небо изгибного типа // Биотехнические, медицинские и экологические системы, измерительные устройства и робототехнические комплексы - Биомедсистемы-2020. Материалы XXXIII Всероссийской науч.-техн. конференции студентов, молодых ученых и специалистов. Рязань. 2020. С.546-552.
  10. Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Серебряков Д.И., Арутюнов А.В., Терещенко Л.Ф., Бростилова Т.Ю., Хасаницина Н.А. ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИЙ ДАТЧИК СИЛЫ МЫШЦ ЯЗЫКА - ДАВЛЕНИЯ ЯЗЫКА НА НЕБО И СПОСОБ ЕГО СБОРКИ Патент на изобретение 2741274 С1, 22.01.2021. Заявка № 2020111257 от 19.11.2019.

**Сведения об авторах**

**Екатерина Юрьевна Плотникова,**

врач-неонатолог первой категории отделения новорожденных №1,

ГБУЗ Роддом г. Краснодара Министерства Здравоохранения Краснодарского Края

Краснодар, Россия

**E-mail:** [cat.roll@yandex.ru](mailto:cat.roll@yandex.ru)

**Елена Александровна Бадеева,**

д.т.н., доцент,

профессор кафедры «Радиотехника и радиоэлектроника»

ФГБОУ ВО

«Пензенский государственный университет»

Пенза, Россия

**E-mail:** [badeeva\\_elena@mail.ru](mailto:badeeva_elena@mail.ru)

**Татьяна Ивановна Мурашкина,**

д.т.н.,

профессор кафедры «Приборостроение»

ФГБОУ ВО

«Пензенский государственный университет»

Пенза, Россия

**E-mail:** [timurashkina@mail.ru](mailto:timurashkina@mail.ru)

**Анна Николаевна Ломтева**

врач-ординатор отделения новорожденных №1

ГБУЗ Роддом г. Краснодара Министерства Здравоохранения Краснодарского Края

Краснодар, Россия

**E-mail:** [lmtva@mail.ru](mailto:lmtva@mail.ru)

**Алевтина Гурьевна Фоменко**

врач-неонатолог высшей категории отделения новорожденных №1

ГБУЗ Роддом г. Краснодара Министерства Здравоохранения Краснодарского Края

Краснодар, Россия

**E-mail:** [fomenko.al.66@mail.ru](mailto:fomenko.al.66@mail.ru)

**Елена Леонидовна Шаповалова**

врач-неонатолог высшей категории отделения новорожденных №1

ГБУЗ Роддом г. Краснодара Министерства Здравоохранения Краснодарского Края

Краснодар, Россия

**E-mail:** [drshap65@gmail.com](mailto:drshap65@gmail.com)

**Information about authors**

**Ekaterina Yr"evna Plotnikova**

neonatologist of the first category of the neonatal unit No. 1,

GBUZ Maternity Hospital of Krasnodar of the Ministry of Health of the Krasnodar Territory

Krasnodar, Russia

**E-mail:** [cat.roll@yandex.ru](mailto:cat.roll@yandex.ru)

**Elena Aleksandrovna Badeeva,**

Doctor of Technical Sciences,

Associate Professor, Professor of the Department

of "Radio Engineering and Radioelectronics"

Penza State University

Penza, Russia

**E-mail:** [badeeva\\_elena@mail.ru](mailto:badeeva_elena@mail.ru)

**Tatiana Ivanovna Murashkina,**

Doctor of Technical Sciences,

Professor of the Department of Instrument Engineering

Penza State University

Penza, Russia

**E-mail:** [timurashkina@mail.ru](mailto:timurashkina@mail.ru)

**Anna Nikolaevna Lonteva**

Resident doctor of the neonatal Unit No. 1

GBUZ Maternity Hospital of Krasnodar of the Ministry of Health of the Krasnodar Territory

Krasnodar, Russia

**E-mail:** [lmtva@mail.ru](mailto:lmtva@mail.ru)

**Alevtina Gyr"evna Fomenko**

neonatologist of the highest category of neonatal unit No. 1

GBUZ Maternity Hospital of Krasnodar of the Ministry of Health of the Krasnodar Territory

Krasnodar, Russia

**E-mail:** [fomenko.al.66@mail.ru](mailto:fomenko.al.66@mail.ru)

**Elena Leonidovna Shapovalova**

neonatologist of the highest category of neonatal unit No. 1

GBUZ Maternity Hospital of Krasnodar of the Ministry of Health of the Krasnodar Territory

Krasnodar, Russia



**Евгения Геннадиевна Давыденко**

врач-неонатолог высшей категории отделения новорожденных №1,  
ГБУЗ Роддом г. Краснодара Министерства Здравоохранения Краснодарского Края  
Краснодар, Россия

**E-mail:** [davidenko181118@mail.ru](mailto:davidenko181118@mail.ru)

**Елена Сергеевна Кочетова**

врач-неонатолог высшей категории отделения новорожденных №1,  
ГБУЗ Роддом г. Краснодара Министерства Здравоохранения Краснодарского Края  
Краснодар, Россия

**E-mail:** [ElenaKochetova81@mail.ru](mailto:ElenaKochetova81@mail.ru)

**Александра Владимировна Оленская**,  
старший преподаватель

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет»  
Краснодар, Россия

**e-mail:** [alexzobenko@mail.ru](mailto:alexzobenko@mail.ru)

**Evgenia Gennadijevna Davydenko**

neonatologist of the highest category of neonatal unit No. 1  
GBUZ Maternity Hospital of Krasnodar of the Ministry of Health of the Krasnodar Territory  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** [davidenko181118@mail.ru](mailto:davidenko181118@mail.ru)

**Elena Sergeevna Kochetkova**

neonatologist of the highest category of neonatal unit No. 1  
GBUZ Maternity Hospital of Krasnodar of the Ministry of Health of the Krasnodar Territory  
Krasnodar, Russia

**E-mail:** [ElenaKochetova81@mail.ru](mailto:ElenaKochetova81@mail.ru)

**Aleksandra Vladimirovna Olenkskay**  
senior lecturer

Federal State Educational Institution of Higher Education "Kuban State Medical University"  
Krasnodar, Russia

**e-mail:** [alexzobenko@mail.ru](mailto:alexzobenko@mail.ru)

УДК 61:004:378

ГРНТИ 76.01.21

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.341-343

**В. Я. Зобенко, А. В. Оленская, Ю.А. Васильев**

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России

## **НАДСТРОЙКИ EXCEL В УЧЕБНЫХ КУРСАХ ПО МЕДИЦИНСКОЙ ИНФОРМАТИКЕ**

*В статье изучается опыт применения различных надстроек для программы Excel в учебном процессе со студентами медиками. Разбираются такие приложения-надстройки, как «Пакет анализа», «AtteStat», «Поиск решения».*

**Ключевые слова:** информационные технологии, статистика, надстройки для программы Excel, учебный процесс

**V. Y. Zobenko, A. V. Olenkskaya, Y. A. Vasiliev**  
Kuban state medical university

## **EXCEL ADD-INS IN MEDICAL INFORMATICS TRAINING COURSES**

*The article examines the experience of using various add-ons for Excel in the educational process with medical students. Such add-on applications as "Analysis Package", "AtteStat", "Solution Search" are being analyzed.*

**Keywords:** information technology, statistics, add-ons for Excel, educational process

В курсах преподавания таких учебных дисциплин, как «Медицинская информатика», «Информатика, медицинская информатика и статистика», «Автоматизированные системы обработки данных», «Информационные технологии в науке и медицине» организованных на кафедре общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины КубГМУ Минздрава России для студентов и аспирантов закрепляются навыки работы в текстовых и графических редакторах, в электронных таблицах и в системах управления базами данных.

Цель работы: рекомендации в совместном использовании в учебном процессе нескольких надстроек по статистической обработке и в случае поиска решений экономической задачи. В частности, одновременное применение и сравнение работы нескольких надстроек при статистической обработке одних и тех-же медицинских данных и

сравнение с работой онлайн статистических калькуляторов. Также в результате применения приложений студенты-медики приобретали компетенции по активации встроенных надстроек и установке отдельных модулей приложений.

Итак, для того чтобы применять настройки *Excel* в учебном процессе в процессе изучения различных курсов медицинской информатики на практических занятиях студенты вначале изучают основные приемы работы в электронных таблицах *Excel*, пополняя и углубляя те знания и умения, которые были получены ими в курсе средней школы. Доля часов аудиторных практических занятий, посвященных этому модулю, составляет 25% от общего количества часов практики. И только после защиты знаний и умений в виде текущей отчетности по основным возможностям *Excel*, приступают к изучению приложений в виде надстроек, доля часов от общего количества практических часов составляет около 12%.

На практических занятиях мы рекомендуем обязательно начинать проводить обучение учащихся с процесса активации той или иной надстройки, поставляемой уже в программе *Excel* [1]. При этом обучаемые знакомятся с различными типами надстроек, которые есть в разделе «Параметры». В конце занятия после окончания расчетов каждый студент должен деактивировать надстройки, а также удалить установленные внешние надстройки на своем учебном месте. В качестве встроенных надстроек изучали надстройки «Пакет анализа» и «Поиск решения».

Одновременно с изучением работы приложения «Пакет анализа» изучали внешнюю по отношению к программе *Excel* надстройку *AtteStat* [2]. Удобство данной надстройки заключается в том, что она упрощается механизм применения и ввода данных при статистических процедурах, хотя и имеет некоторые ограничения. Во время занятия студенты проводят скачивание надстройки *AtteStat*, установку этой надстройки и согласуют работу этого приложения с работой базовой программы.

Опираясь на одни и те же первичные статистические данные, которые для каждого учащегося являются уникальными, студенты проводят расчет отдельных статистических показателей, чаще всего это параметры описательной статистики. Регистрируя промежутки времени, которые затрачивает студент для нахождения параметров описательной статистики, вначале с помощью стандартных функций определения статистических параметров *Excel*. Затем студент определяет время для нахождения таких же параметров по той же выборке, но используя надстройку «Пакет анализа». После выполнения одно и той же процедуры проводится сравнение числового значения параметров, но самое главное, сравнение временных затрат на проведение одного и того же исследования и делается вывод об эффективности применения надстройки «Пакет анализа».

Помимо сравнения времени расчета с помощью стандартных статистических функций и с помощью «Пакета анализа», учащиеся проводят измерение временных затрат на аналогичные расчеты с помощью надстройки *AtteStat*, предварительно установленных, и с помощью статистических калькуляторов онлайн [3].

Применяя указанные выше надстройки для *Excel*, мы, во-первых, знакомим студентов с расширением расчетных возможностей базовой программы за счет внутренних и внешних надстроек, во-вторых, закрепляем умения и навыки в технологическом управлении этими приложениями в виде активации, установки надстроек, в-третьих, знакомим с работой онлайн-калькуляторов, в-четвертых, позволяем студентам повысить эффективность обработки статистических данных.

Результат выполнения практической работы в такой комбинации позволяет, также, выявить самостоятельно для каждого учащегося наиболее комфортные варианты проведения обработки статистических данных. Установить элементы различия и элементы одинаковости в проведении статистических расчетов, и, в дальнейшем, активно применять знания об этих элементах для решения профессиональных задач.

Аналогично изучалась надстройка «Поиск решения». Закреплялся на практическом занятии навык активизации и деактивации приложения. Работа самой надстройки и дальнейший поиск решения учащиеся осуществляли на примере экономической задачи.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: одновременное использование нескольких надстроек *Excel* при обучении студентов-медиков для статистических расчетов, такое сравнение позволяет самостоятельно для каждого учащегося выбрать наиболее эффективный путь статистических расчетов. Использование несколько разных надстроек для решения одной цели и разных надстроек для разных целей формирует у студентов понимание многочисленных подходов автоматизирующих и статистические расчеты, и поиск решений.

### Список литературы

1. Служба поддержки Microsoft [Электронный ресурс]. 2022. URL: <https://support.microsoft.com/> (дата обращения: 13.04.2022)
2. Attestat [Электронный ресурс]. 2022. URL: <https://attestat-for-excel.software.informer.com/> (дата обращения: 13.04.2022)
3. Статистический калькулятор [Электронный ресурс]. 2022. URL: <https://medstatistic.ru/calculators.html> (дата обращения: 13.04.2022)

### Сведения об авторах

**Владимир Яковлевич Зобенко,**

к.т.н., доцент

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России

Краснодар, Россия

**e-mail:** vov1955@mail.ru

**Александра Владимировна Оленская,**

старший преподаватель

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет»

Краснодар, Россия

**e-mail:** alexzobenko@mail.ru

**Юрий Анатольевич Васильев,**

ассистент кафедры общественного здоровья,

здравоохранения и истории медицины,

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

Краснодар, Россия

**E-mail:** yurii-59@mail.ru

### Information about authors

**Vladimir Yakovlevich Zobenko,**

associate Professor,

Kuban state medical university

Krasnodar, Russia

**e-mail:** vov1955@mail.ru

**Aleksandra Vladimirovna Olenskay**

senior lecturer

Federal State Educational Institution of Higher Education "Kuban State Medical University"

Krasnodar, Russia

**e-mail:** alexzobenko@mail.ru

**Yuri Anatolyevich Vasiliev,**

Assistant

of the Department of Public Health, Healthcare and History of Medicine,

Kuban state medical University

Krasnodar, Russia

**E-mail:** yurii-59@mail.ru

УДК 616-71/-78

ГРНТИ 58.35.05, 34.49.17, 34.49.33

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.343-352

М. С. Булатов, Д. А. Жидков, Г. И. Кленов, В. С. Хорошков,

А. Н. Черных

НИЦ «Курчатовский институт»

### ПРОЕКТ ЦЕНТРА ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ В НИЦ «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ», МОСКВА

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 Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (далее – НИЦ «Курчатовский институт») определен головной научной организацией Программы.

Программа предусматривает разработку и запуск в НИЦ «Курчатовский институт»

*Комплекса протонной лучевой терапии для долговременных многолетних разработок новых поколений оборудования и технологий ПЛТ, подготовки кадров (медицинских физиков и клиницистов, лечения ограниченного контингента онкологических пациентов и проведения клинических исследований). Комплекс протонной лучевой терапии будет включать в себя два процедурных кабинета, один кабинет с системой поворота протонного пучка – гантри и один - с фиксированным пучком. Синхротрон с максимальной энергией 250 МэВ и с возможностью ее изменения от 70 до 250 МэВ непосредственно в процессе ускорения протонов будет снабжать каждый процедурный кабинет протонными пучками с требуемыми параметрами. В настоящее время ведется разработка всего нестандартизированного оборудования создаваемого комплекса. Проектируется здание, строительство должно начаться в 2023 году. Аналитически выполнен расчет радиационно-защитных стен, ведется более детальный расчет.*

**Ключевые слова:** протонная лучевая терапия, синхротрон, радиационная защита.

M. S. Bulatov, D. A. Zhidkov, G. I. Klenov, V. S. Khoroshkov,  
A. N. Chernykh  
National Research Center «Kurchatov Institute»

### **PROTON BEAM THERAPY CENTER AT NRC "KURCHATOV INSTITUTE", MOSCOW**

*In March 2020, the Government of the Russian Federation approved the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Synchrotron and Neutron Research and Research Infrastructure for 2019–2027 (FSTP). In accordance with the Decree, the Federal State Budgetary Institution “National Research Center “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute”) is designated as the lead scientific organization of the Program.*

*The program provides for the development and launch at the National Research Center "Kurchatov Institute" of the Proton Beam Therapy Complex for long-term multi-year development of new generations of PBT facilities and technologies, training of personnel (medical physicists and clinicians, treatment of a limited number of cancer patients and clinical trials). The complex of proton beam therapy will include two treatment rooms, one room with a rotating proton beam rotation system - gantry and one with a fixed beam. A synchrotron with a maximum energy of 250 MeV will supply each treatment room with proton beams. The beam energy can vary from 70 to 250 MeV directly in the process of proton acceleration. The features of the developed proton beam therapy system are compared with other systems. Currently, the development of all non-standardized equipment of the complex being created is underway. The building is being designed, construction should begin in 2023. The calculation of radiation-protective walls has been analytically performed, a more detailed calculation is being carried out.*

**Key words:** proton beam therapy, synchrotron, radiation shielding

### **ВВЕДЕНИЕ**

После того, как Р. Уилсон [1] сформулировал преимущества использования ускоренных протонов в дистанционной лучевой терапии, начался экспериментальный период развития протонной лучевой терапии (ПЛТ) в физических институтах, оснащенных протонными ускорителями, и продолжался с 1952 г. (1954 г. первое облучение протонами пациента в Национальной лаборатории им. Лоуренса в Беркли) до 1990 года. В 1990 г. при больнице университета в Лома-Линда был запущен первый многокабинный клинический центр протонной лучевой терапии [2].

В настоящее время в мире насчитывается порядка 100 центров ПЛТ, сосредоточенных в основном в США, Японии, Европе и Китае [3]. 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 Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (далее

– НИЦ «Курчатовский институт») определен головной научной организацией Программы.

Программа предусматривает разработку и запуск в НИЦ «Курчатовский институт» Комплекса протонной лучевой терапии. В конце 2022 года должно быть завершено проектирование здания. Строительство планируется завершить к концу 2023 года, а в 2024 году осуществить физический пуск оборудования.

Основная цель лучевой терапии состоит в том, чтобы доставить предписанную врачом дозу пациенту в планируемый целевой объем (PTV) с минимальным воздействием на здоровые ткани и органы риска (OAR) пациента находящиеся рядом с PTV. В настоящее время протонная лучевая терапия находит широкое применение в клинической практике. Это обусловлено, прежде всего, возможностью качественного улучшения пространственного распределения излучения с высочайшими краевыми градиентами дозы и кардинальным снижением лучевой нагрузки на здоровые ткани по сравнению с традиционно используемыми для этих целей в конвенциональной лучевой терапией пучками электронов и  $\gamma$ -квантов. Ионизационные потери частиц (т.е. доза) возрастают по мере проникновения пучка протонов в вещество и достигают максимума в месте остановки заряженных частиц, образуя так называемый пик Брэгга. Доза обычно доставляется в фракционированной форме, а не в большой разовой дозе, для повышения дифференциальной чувствительности между здоровыми и злокачественными клетками. Лучевая терапия эффективна при лечении рака, поскольку злокачественные клетки более радиочувствительны, чем здоровые клетки [4].

В проекте выбрана система ПЛТ на основе синхротрона, поскольку возможность быстрой перестройки энергии ускоряемого пучка протонов в синхротроне лучше подходит для активных методов формирования дозового распределения - сканирования [5]. Сканирование пучком протонов — это высокотехнологичный метод лучевой терапии, поскольку он позволяет отказаться от использования механических формирователей дозового распределения, таких как коллиматоры и болюсы. В отличие от конвенциональной лучевой терапии с помощью адронных пучков возможно реальное трехмерное сканирование за счет изменения энергии пучка протонов. Это свойство адронных пучков делает протонную терапию с модулированной интенсивностью (IMPT) [6] одной из самых передовых форм лучевой терапии.

Основные элементы установки, такие как синхротрон, лучевая установка с поворотом протонного пучка вокруг лежащего на позиционере пациента - гантри, лучевая установка с фиксированным направлением протонного пучка - ГФП, каналы транспортировки протонного пучка к лучевым установкам, устройства формирования дозовых распределений и система управления, являются частью пакета оборудования, который будет разработан совместно с АО «НИИЭФА им Д.В. Ефремова».

Защита от вторичного излучения является серьезной проблемой при проектировании здания. Выбранная планировка радиационно-защитного блока основывается на расчетах, выполненных при разработке проекта Центра протонной лучевой терапии при ГКБ им. М.В. Боткина [7]. Основываясь на аналитической оценке и измерениях, определены предварительные габариты радиационно-защитного блока для размещения всего нестандартизированного оборудования. Проведено предварительное моделирование методом Монте-Карло (MC), подтверждающее соблюдение норм радиационной безопасности. По мере разработки нестандартизированного оборудования, взаимодействующего с пучком, будет проводится дальнейшее моделирование для более детальной оценки радиационной безопасности. В рамках мероприятий по разработке проекта системы радиационной защиты будет разработана система радиационного контроля, связанная с работой ускорителя и размещенная в пультовой ускорителя, а также локально в каждом процедурном помещении, где располагаются лучевые установки. Детекторы нейтронов будут контролировать фон вторичных нейтронов во всех помещениях радиационно-защитного блока, также в этих помещениях будут установлены и детекторы гамма-излучения для контроля наведенной активности.

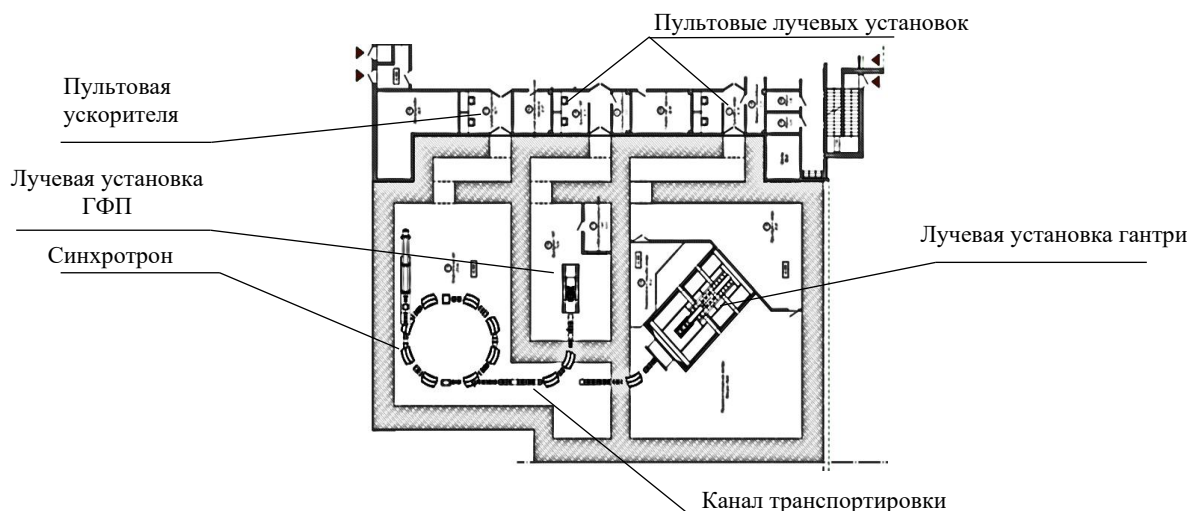


Рис. 1. Схема части здания комплекса протонной лучевой терапии с изображением радиационно-защитного блока, включающего: процедурные кабинеты, синхротрон и каналы транспортировки протонного пучка.

### ОСНОВНОЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Концепцией создания Комплекса протонной лучевой терапии НИЦ «Курчатовский институт» предусмотрена разработка и оснащение комплекса тремя основными элементами оборудования – ускоритель с каналами транспортировки протонных пучков в два процедурных помещения - лучевая установка гантри для многопольного облучения пациента в положении лежа и лучевая установка с фиксированным в горизонтальной плоскости направлением протонного пучка для облучения пациента в положении сидя (ГФП), как показано на рис. 1.

В качестве ускорителя для Комплекса ПЛТ НИЦ «Курчатовский институт» будет разработан протонный синхротрон, позволяющий осуществлять выбор энергии выводимых из него пучков протонов в диапазоне от 70 до 250 МэВ и изменять ее от одного цикла ускорения к другому. Таким образом, вывод протонов не при максимальной, как в циклотроне, а при требуемой для конкретного пациента энергии, и высокая эффективность вывода делают протонный синхротрон значительно более удобной машиной в эксплуатации и более безопасной в радиационном смысле.

Гантри представляет собой поворотное на 360° устройство, состоящее из поворотной рамы, на которой располагается магнитооптический канал транспортировки протонного пучка и система формирования дозового распределения. Поворотная рама обеспечивает жесткость для поддержания изоцентричности в пределах диаметра 1 мм. Диаметр вращения составляет около 11 м, так что гантри занимает более двух этажей [8].

ГФП оборудована роботизированным креслом для лечения пациентов в положении сидя, что удобно, например, при лечении офтальмологических пациентов или пациентов со злокачественными новообразованиями в области головы и шеи. [9].

### ФОРМИРОВАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПУЧКА

Оборудование для формирования дозового распределения лучевой установки гантри располагается в конце канала транспортировки протонного пучка в гантри. Гантри будет оборудован комбинированной системой формирования дозового распределения, состоящей из системы пассивного формирования и системы для сканирования карандашным пучком - активного. Система пассивного формирования может быть использована для реализации как метода рассеяния [10], так и метода воблинга при формировании терапевтического пучка. Система активного формирования оптимизирована для формирования пучка малого размера с использованием дополнительных квадрупольных и отклоняющих магнитов и выполнения растрового сканирования [11].

Схематическое изображение разрабатываемой системы формирования дозового распределения для лучевой установки гантри приведена на рис. 2.

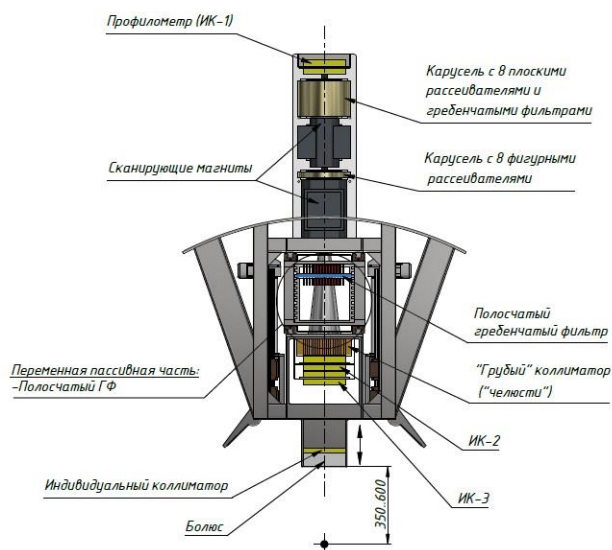


Рис. 2. Схема компоновки оборудования для формирования дозового распределения лучевой установки гантри

Другим известным методом сканирования является точечное сканирование. Центрами, в которых началось развитие этого метода, являются *PSI* в Швейцарии и *HIMAC* в Японии [12]. При точечном сканировании протонный пучок останавливается в точке, чтобы доставить предписанную дозу, при этом энергия пучка изменяется, чтобы покрыть всю глубину РТВ, прежде чем пучок перемещается в другую точку. Точечное сканирование может быть медленнее, чем растровый метод, из-за остановки перед каждым изменением положения.

Сканирование считается более предпочтительным методом формирования конформного дозового распределения, чем метод рассеяния, поскольку он может обеспечить истинную трехмерную конформацию, но у него есть недостаток, заключающийся в более высокой чувствительности к подвижности органов, в первую очередь из-за дыхания и перистальтики. Один из способов обойти эту проблему — использовать стробирование пучка по сигналам дыхания. Более продвинутым методом является управление пучком протонов с определением положения опухоли, который изучается группой в *PSI* [13]. Управляющее программное обеспечение, необходимое для выполнения сканирования, является более сложным, поэтому в настоящее время основные усилия будут направлены на реализацию стандартной системы формирования дозового распределения.

Для реализации системы пассивного формирования дозового распределения моноэнергетический пик Брэгга необходимо расширить в направлении пучка, чтобы охватить им весь объем опухоли. Область дозы, которая образуется в результате модификации кривой Брэгга называется расширенным пиком Брэгга (*SOBP*) рисунок 3.



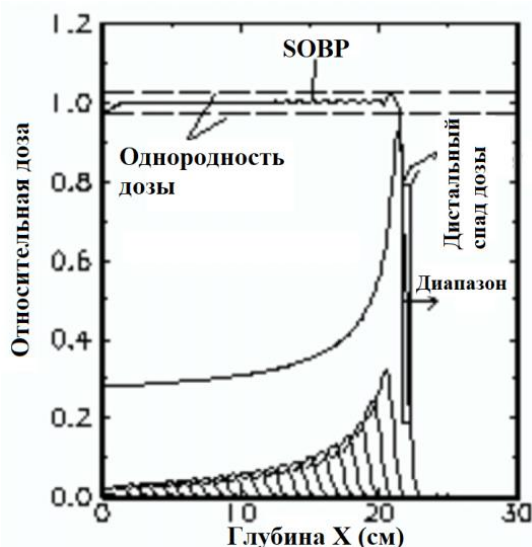


Рис. 3. Определение SOBP, глубины пробега, дистального спада дозы и однородности дозы.

Два практических метода достижения переменной SOBP заключаются в использовании 1) вращающегося колеса переменной толщины, 2) статического гребенчатого фильтра [14]. Для охвата широкого диапазона SOBP необходимы десятки наборов гребенчатых фильтров.

Оборудование для формирования дозового распределения ГФП располагается в конце канала транспортировки протонного пучка к соответствующей лучевой установке. Оборудование будет располагаться на оптической скамье непосредственно в процедурном помещении, и состоять из системы пассивного формирования с возможностью дальнейшей модернизации до системы сканирования карандашным пучком.

Фактическая отпущенная доза контролируется при помощи ионизационных камер, размещенных в системе формирования дозового распределения [15]. Калибровка ионизационных камер осуществляется путем проведения клинической дозиметрии с использованием водного фантома и небольших ионизационных камер, также для реализации гарантии качества облучения для калибровки планируется использовать метод двойных совпадений.

Основные характеристики создаваемого комплекса перечислены в Таблице 1.

Таблица 1. Основные характеристики создаваемого комплекса

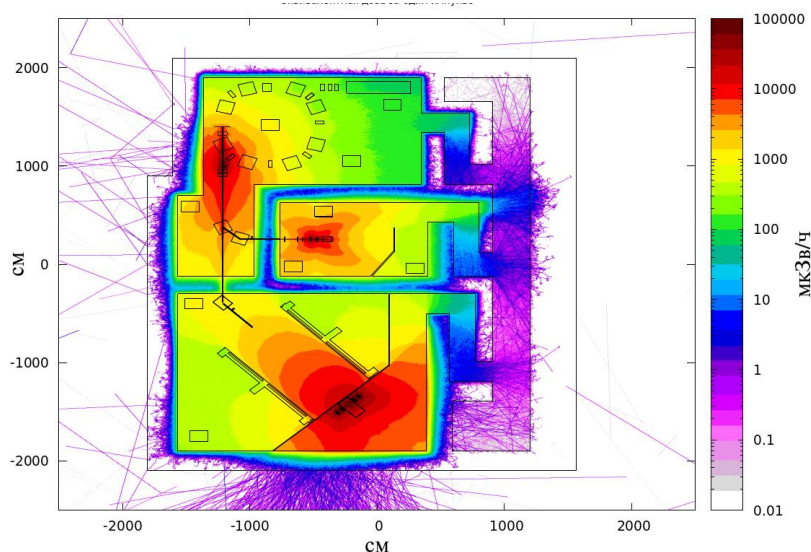
Наименование параметра установки	Значение
<i>Ускорительный комплекс</i>	
Ускоритель	Протонный синхротрон
Энергия ускоренных протонов	70–250 МэВ
Интенсивность	$5 \times 10^{10}$ протонов в секунду
<i>Лучевая установка Гантри</i>	
Энергия протонов	70–250 МэВ
Поворот протонного пучка	$\pm 185^\circ$
Система формирования дозового распределения	активно/пассивная
Максимальный размер дозового распределения	$25 \times 25 \text{ см}^2$
Система позиционирования	2D и 3D система рентгеновского позиционирования
Позиционер	6D стол позиционер
Локализации	- голова, шея; - новообразования абдоминальной области



Наименование параметра установки	Значение
<i>Лучевая установка с фиксированным направлением протонного пучка</i>	
Энергия протонов	70–250 МэВ
Система формирования дозового распределения	пассивная
Максимальный размер дозового распределения	25 × 25см <sup>2</sup>
Система позиционирования	2D-система рентгеновского позиционирования
Позиционер	кресло позиционер
Локализации	- голова, шея; - внутриглазные новообразования; - новообразования орбиты глаза

### РАДИАЦИОННАЯ ЗАЩИТА

Проект здания для размещения оборудования ПЛТ находится в активной разработке и ежемесячно претерпевает изменения, улучшающие удобство пребывания и безопасность пациентов и персонала. На рисунке 4. Показан результат моделирования радиационной обстановки в радиационно-защитном блоке в момент работы всех процедурных кабинетов. Довольно большая доза, наблюдаемая в процедурных лучевых установках, должна быть уменьшена за счет оптимизации набора индивидуальных средств пассивного метода формирования дозового распределения, а для лучевой установки Гантри, предполагается использовать активные методы облучения для большинства пациентов, кардинально снижающие нагрузку от вторичного излучения. Стоит также учитывать, что моделирование проводилось при самых неблагоприятных условиях эксплуатации Комплекса, а значит имеет тенденцию завышать реальную дозу.



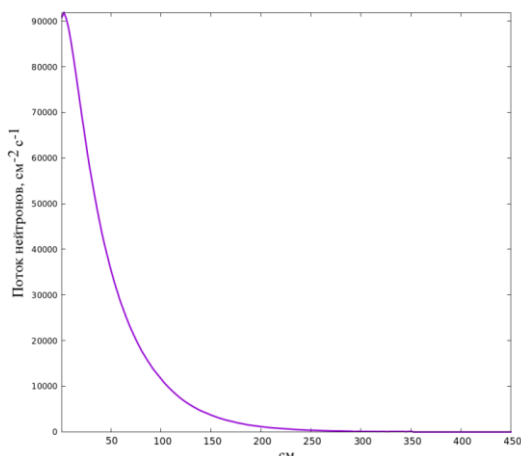
**Рис. 4.** Радиационная обстановка в радиационно-защитном блоке во время облучения пациентов.

Важным вопросом при проектировании здания является оптимизация защиты для уменьшения дозы облучения, получаемой персоналом и пациентами при работе ускорителя. Для выбора толщины стен и потолка было проведено моделирование методом Монте-Карло с использованием программного пакета *Fluka*. Предполагаемая модель работы Комплекса представлена в таблице 2 и предполагается, что ускоритель будет работать не менее 45 часов в неделю.

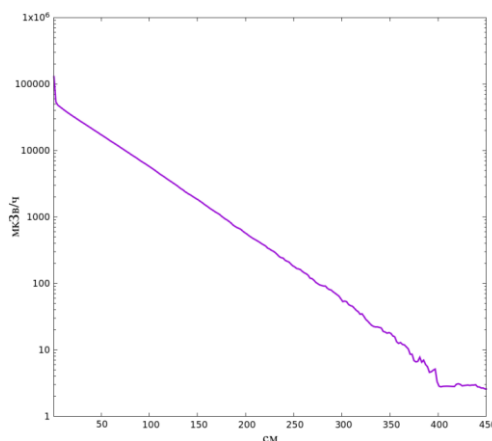
**Таблица 2. Оценка времени работы Комплекса ПЛТ и работы ускорителя в неделю в зависимости от вида проводимых работ**

Вид работ	Часов в неделю, час	Работа ускорителя, час
Облучение пациентов	94	14
Калибровка оборудования	24	12
Обслуживание	12	1
Выполнение ВНИР	10	10
Работы по модернизации	16	2
Выполнение иных работ	12	6
Всего	168	45

Предполагается, что в течении всего времени работы ускорителя в помещениях радиационно-защитного блока будут рождаться вторичные нейтроны, наибольшее количество вторичных частиц ожидается в процедурных помещениях, где протонный пучок вынуждено коллимируется устройствами формирования дозового распределения выполненными из железа и меди. На рисунке 5 показан поток нейтронов, проходящий через бетонную стену в процедурной с горизонтальным фиксированным пучком.



**Рис. 5. Ослабление потока нейтронов в зависимости от толщины бетонной стены радиационно-защитного блока.**



**Рис. 6 Зависимость эквивалентной дозы вторичного излучения от толщины стены радиационно-защитного блока.**

На рисунке 6 показана эквивалентная доза вторичного излучения в зависимости от толщины стены, эквивалентной бетону. Проведенное моделирование показало необходимость проведения полномасштабного моделирования конфигурации всего здания методом Монте-Карло для уточнения предлагаемых конструктивных решений радиационно-защитного блока.

Система радиационного контроля будет осуществлять мониторинг вторичных нейтронов в процедурных кабинетах, в пультовых и в некоторых общедоступных

помещениях с помощью зональных мониторов, оснащенных пропорциональными счетчиками, окруженными полиэтиленовым замедлителем (так называемыми сферами Бонера). Гамма-излучение также будет проверяться с помощью зональных мониторов типа счетчиков Гейгера-Мюллера.

### ТЕКУЩИЙ СТАТУС

Строительство здания начнется в начале следующего года, а завершить его планируется в декабре 2023 года. Остается ряд вопросов по срокам разработки и монтажа оборудования, которые требуют дальнейшего уточнения при более детальном анализе графика строительства. Лечение пациентов может начаться в 2025 году. Другие важные факторы, влияющие на начало клинической эксплуатации объекта, включают период ввода в эксплуатацию и проведение клинических испытаний.

*Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ от 28.10.2021г. № 2751).*

### Список литературы

1. R. R. Wilson, *Radiology* 47, 487 (1946).
2. J. Slater, *Int. J. Rad. Onc. Biol. Phys.* 22, 383 (1992).
3. *Particle therapy facilities in operation. Particle Therapy Cooperation Group (PTCOG).* [Электронный ресурс] <http://ptcog.web.psi.ch/>.
4. Кленов Г.И. Адронная терапия: история, статус, перспективы / Г.И. Кленов, В.С. Хорошков // УФН 186 891–911 (2016).
5. W. Beeckman et al., *Nucl. Instrum. Methods B* 56/57, 1201 (1991).
6. A. Lomax, *Phys. Med. Biol.* 44, 185 (1999).
7. Кленов Г.И. Ускорители для протонной лучевой терапии / Г.И. Кленов, В.С. Хорошков, А.Н. Черных // *Медицинская физика*. 2014. № 1 (61). С. 5-17.
8. A. N. Chernykh, M. S. Bulatov, G. I. Klenov, V. S. Khoroshkov // *27th Russian Particle Acc. Conf. RuPAC2021, Alushta, Russia JACoW, Proceedings of RuPAC-2021. – 2021 г. – С. 196-198. doi:10.18429/JACoW-RuPAC2021-MOPSA46.*
9. Черных А.Н. Кресло позиционер для проведения протонной лучевой терапии внутривидных злокачественных новообразований / Черных А.Н., Люевич В.И. // *Сборник трудов 22-ой Международной конференции и дискуссионного научного клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии».* - 2014 г. - С. 28-29.
10. A. Koehler et al., *Nucl. Instrum. Methods* 131, 437 (1975).
11. V. Marchand et al., in *Proceedings of European Particle Accel. Conference (2000)*, p. 2539.
12. M. Kanazawa et al., in *Proceedings of the 2nd Asian Particle Accel. Conference (2001)*, p. 846.
13. <http://bio.web.psi.ch/tuloc.html>.
14. U. Weber, G. Kraft, *Phys. Med. Biol.* 44, 2765 (1999).
15. W. Chu, in *Ion Beams in Tumor Therapy*, edited by U. Linz (Chapman & Hall GmbH, 1995), p. 234.

#### Сведения об авторах

**Михаил Сергеевич Булатов**,  
лаборант исследователь  
НИЦ «Курчатовский институт»  
Россия, Москва  
E-mail: [bulatow@gmail.com](mailto:bulatow@gmail.com)

#### Information about authors

**Mikhail Sergeevich Bulatov**,  
laboratory assistant researcher  
National Research Center «Kurchatov Institute»  
Moscow Russia,  
Email: [bulatow@gmail.com](mailto:bulatow@gmail.com)

**Дмитрий Алексеевич Жидков**,  
научный сотрудник  
НИЦ «Курчатовский институт»  
Россия, Москва  
**E-mail:** Zhidkov\_DA@nrcki.ru  
**Геннадий Иванович Кленов**,  
заместитель начальника отдела  
НИЦ «Курчатовский институт»  
Россия, Москва  
**E-mail:** Klenov\_GI@nrcki.ru  
**Владимир Сергеевич Хорошков**,  
начальник отдела  
НИЦ «Курчатовский институт»  
Россия, Москва  
**E-mail:** vskhoroshkov@yandex.ru  
**Черных Алексей Николаевич**,  
старший научный сотрудник  
НИЦ «Курчатовский институт»  
Россия, Москва  
**E-mail:** Chernykh\_AN@nrcki.ru

**Dmitry Alekseevich Zhidkov**,  
researcher  
National Research Center «Kurchatov Institute»  
Moscow Russia  
**E-mail:** Zhidkov\_DA@nrcki.ru  
**Gennady Ivanovich Klenov**,  
deputy head of department  
National Research Center «Kurchatov Institute»  
Moscow Russia  
**E-mail:** Klenov\_GI@nrcki.ru  
**Vladimir Sergeevich Khoroshkov**,  
head of department  
National Research Center «Kurchatov Institute»  
Moscow Russia  
**E-mail:** vskhoroshkov@yandex.ru  
**Alexey Nikolaevich Chernykh**,  
senior researcher  
National Research Center «Kurchatov Institute»  
Moscow Russia  
**Email:** Chernykh\_AN@nrcki.ru

УДК 62.93, 62-791.2  
ГРНТИ 59.14, 59.31  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.352-357

<sup>1</sup>Т. И. Мурашкина, <sup>2</sup>С. И. Геращенко, <sup>2</sup>Е. А. Бадеева,  
<sup>2</sup>А. В. Бадеев, <sup>2</sup>М. С. Геращенко  
ООО «Специальные волоконно-оптические  
измерительные системы»  
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ПУЛЬСОВОЙ ВОЛНЫ ПРИ НЕИНВАЗИВНОЙ ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ С ПОМОЩЬЮ ПРЕЦИЗИОННЫХ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИХ ДАТЧИКОВ МИКРОПЕРЕМЕЩЕНИЙ

*Рассмотрены проблемные вопросы, возникающие при неинвазивном измерении скорости пульсовой волны кровотока - важного прогностического параметра сердечно-сосудистых заболеваний, и связанные в связи с этим сложности проектирования средств измерений, в первую очередь, низкая достоверность и точность измерения известных фотоплетизмографических средств измерения и диагностики, ведущая к увеличению составляющих основной погрешности, габаритных размеров устройств, применению косвенных методов измерений, влекущих большие методические погрешности измерений. Предлагается перейти к передовым волоконно-оптическим датчикам микроперемещений и новым способам измерения скорости пульсовой волны кровотока с их помощью.*

**Ключевые слова:** скорость пульсовой волны, кровотока, фотоплетизмограмма, волоконно-оптический датчик микроперемещений, диагностика, неинвазивное измерение, оптическое волокно

<sup>1</sup>T. I. Murashkina, <sup>2</sup>S. I. Gerashchenko, <sup>2</sup>E. A. Badeeva,  
<sup>2</sup>A.V. Badeev, <sup>2</sup>M. S. Gerashchenko  
<sup>1</sup> LLC "Special fiber-optic measuring systems"  
<sup>2</sup>Penza State University

## DETERMINATION OF THE PULSE WAVE PROPAGATION VELOCITY DURING NONINVASIVE ASSESSMENT OF THE STATE OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM USING PRECISION FIBER-OPTIC MICRO-DISPLACEMENT SENSORS

*The problematic issues arising from the non-invasive measurement of the pulse wave velocity of blood flow, an important prognostic parameter of cardiovascular diseases, and the associated difficulties in designing measuring instruments, first of all, the low reliability and accuracy of measurement of known photoplethysmographic measuring and diagnostic tools, leading to an increase in the components of the basic error, the overall dimensions of the devices, the use of indirect measurement methods entailing large methodological measurement errors. It is proposed to switch to advanced fiber-optic micro-displacement sensors and new methods of measuring the pulse wave velocity of blood flow with their help.*

**Keywords:** pulse wave velocity, blood flow, photoplethysmogram, fiber-optic micro-displacement sensor, diagnostics, non-invasive measurement, optical fiber

### Введение

В связи с большим количеством сердечно-сосудистых заболеваний, частотой и тяжестью осложнений от них, неинвазивная оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы (ССС) актуальна. Известно, что функциональное состояние ССС определяется не только работой сердца и артериальным давлением, но и состоянием сосудов – жесткостью (эластичностью) их стенок, сосудистым сопротивлением и т.д. [1]. Состояние ССС характеризует также скорость распространения пульсовой волны (далее - PWV) [2]. Чем выше жесткость сосудов, тем быстрее по ним распространяется пульсовая волна [3,4,5].

PWV необходимо оценивать и в крупных магистральных сосудах (например, аорте), и в более мелких периферических сосудах по ходу тока крови вдоль всего тела пациента, так как в них PWV различна (в аорте примерно 4...6 м/с, в лучевой артерии 8...12 м/с) [6]. Выброс крови из желудочка во время сокращения сердечной мышцы (систола) создает волну повышенного давления, которая распространяется по всему телу от аорты до мельчайших сосудов (капилляров). Распространяясь по эластичным артериям и артериолам, пульсовая волна вызывает краткосрочное расширение сосудистой стенки [7], что и фиксируется, так формируется первый пик (рисунок 1) [8]. Второй пик пульсовой волны возникает вследствие отражения волны от мест разветвления крупных сосудов. Интенсивность этого отражения зависит от тонуса сосудов в местах разветвления, а время отражения напрямую зависит от PWV.

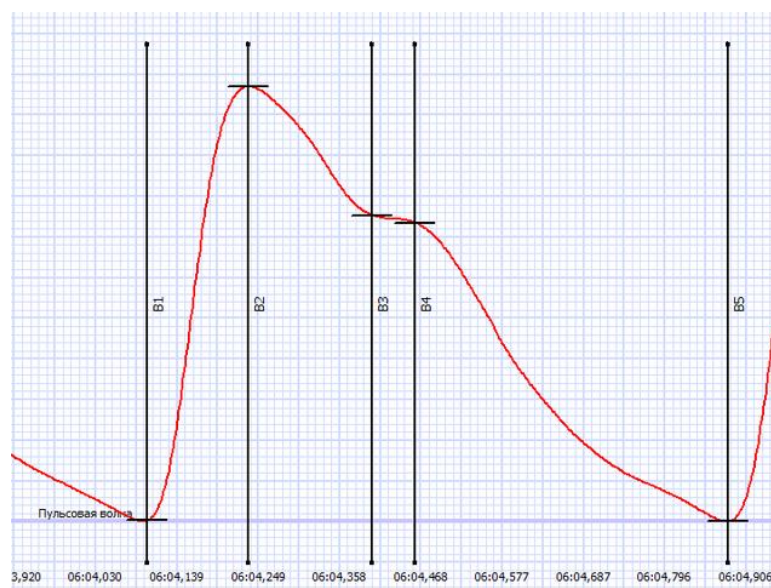


Рисунок 1 - Форма пульсовой волны [9]

Зная форму пульсовой волны, можно оценить функциональное состояние и структурные изменения периферического сосудистого русла [9]. Для вычисления индексов пульсовой волны необходимо установить маркеры, указывающие на характерные точки пульсовой кривой: B1 - начало сердечного цикла, B2 - момент максимального

расширения сосуда в фазу изгнания, В3 - точка, которая соответствует протодиастолическому периоду, В4 - начало диастолы, В5 - завершение сердечного цикла.

На основании зарегистрированной датчиком плетизмограммы PWV в аорте определяется по формуле:  $PWV_{ao} = 2Lk/T$ , где  $k$  – масштабный коэффициент для нормирования полученного значения;  $L$  - длина ствола аорты,  $T$  - время запаздывания пика отражённой волны по отношению ко времени прихода пика прямой волны на плетизмограмме [10]. Вязкость крови, жёсткость стенок сосудов, наличие патологий и другие факторы оказывают на форму огибающей PW «размывающее» действие, ее максимумы смещаются, меняется время запаздывания пика отражённой волны  $T$  [9].

Более точными являются «двухточечные» методы, когда определяется задержка времени  $T$  между импульсом сигнала ЭКГ и приходом пика прямой PW, регистрируемой в артерии датчиком давления [11,12]. Это способ дорогой и инвазивный.

Наиболее перспективны методы, использующие оптические фотоплетизмографические датчики (ФПГ-датчики) регистрации пульсовой волны, которые регистрируют изменения светопропускания/светоотражения тканей в зависимости от кровенаполнения крупных сосудов в течение сердечного цикла [13,14]. Во время выброса крови сердцем увеличивается кровоток в тканях, вызывая расширение сосудов, как результат - ткани изменяют свои поглощающие, отражающие и преломляющие свойства, что вызывает изменение формы пульсовой волны.

Низкая точность измерения параметров кровотока обусловлена высокой методической погрешностью известных фотоплетизмографических методов измерения, которые не учитывают точную трассу прохождения светового потока через слои того участка, на котором устанавливается датчик. При этом взаимное расположение светодиодов нерационально, что снижает точность измерений.

**Цель работы** – повышение точности и достоверности неинвазивного измерения скорости распространения пульсовой волны для оценка функционального состояния ССС.

### **Материалы и методы**

Для повышения точности и достоверности проводимых измерений необходимо учитывать основные законы геометрической оптики: отражения, преломления на границах сред, каковыми являются отдельные слои измерительного участка на теле пациента, а также рассеяния на неоднородностях [15].

Для выбора источника излучения (его спектральной характеристики) необходимо учитывать прозрачность отдельных слоев, например для кожи наибольшая прозрачность лежит в интервале (650...1200) нм.

При измерении кровенаполнения необходимо измерять расстояние до границы раздела сред, каковыми являются слои поверхности тела человека, поэтому предлагается адаптировать технологически отработанные технические решения волоконно-оптических средств измерения микроперемещений на изделиях других наукоемких отраслей, описанные в работах [16, 17, 18].

### **Результаты исследований**

Разрабатываемый волоконно-оптический датчик (ВОД) микроперемещений для определения кровенаполнения сосуда будет содержать приемный торец отводящего оптического волокна (ООВ), от одного до четырех излучающих торцов подводящих оптических волокон (ПОВ), расположенных симметрично относительно оптической оси фотоприемника под углом  $\alpha$  (рисунок 2).



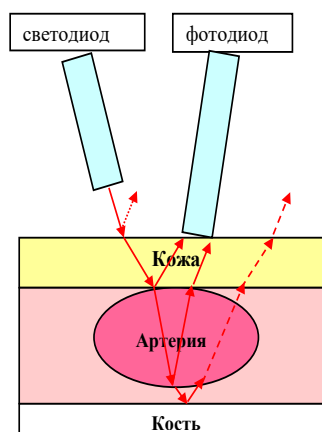


Рисунок 2 – Структура волоконно-оптического датчика микроперемещений стенок кровеносного сосуда для определения скорости пульсовой волны и ход оптических лучей

Каждый ПОВ стоит в фокусе собирающей микролинзы для формирования параллельного пучка света. ООВ может быть расположен относительно собирающей микролинзы на расстоянии меньшем, чем ее фокусное расстояние для того, чтобы было сформировано световое пятно, соизмеримое с размерам приемного торца ООВ. Пучки параллельных лучей проходят под углом  $\alpha$  через кожу с коэффициентом преломления  $n_1$  путь  $l_1 = H / \cos \alpha$ , где  $H$  – расстояние от излучающей поверхности линзы до границы раздела двух сред («кожа – кровеносный сосуд»). Преломившись на границе раздела сред, лучи под углом  $\beta$  проходят через кровь с коэффициентом преломления  $n_2$  путь  $l_2 = X / \cos \beta$ , где  $X$  – расстояние между верхней и нижней границами кровеносного сосуда в момент измерения;  $\beta = \arcsin\left(\frac{n_1}{n_2} \sin \alpha\right)$  до нижней границы кровеносного сосуда. Отраженный световой поток проходит обратный путь к фотоприемнику.

При этом мощность оптического излучения ослабляется в соответствии с законом Бугера [19]:

$$P = \rho \exp(-2(\chi_1 l_1 + \chi_2 l_2)) P_0, \quad (1)$$

где  $\chi_1, \chi_2$  – коэффициенты экстинкции (коэффициенты потерь оптического излучения за счет поглощения и рассеяния света) первой и второй сред соответственно;  $l_1, l_2$  – путь, пройденный световым потоком в первой и второй средах соответственно;  $P_0, P$  – мощность оптического излучения в начале и в конце трассы соответственно,  $\rho = \rho_0 \rho_1 \rho_2$ , где  $\rho_0$  – коэффициент отражения внешней поверхности кожи;  $\rho_1, \rho_2$  – коэффициенты отражения верхней и нижней поверхностей кровеносного сосуда;  $\tau_0, \tau_1$  – коэффициенты прозрачности кожи и крови.

При определении угла  $\alpha$ , под которым световой поток падает на кожу, и расстояния  $d$  между оптическими осями ПОВ и ООВ необходимо учитывать то, что часть лучей пройдет сквозь нижнюю границу кровеносного сосуда, дойдет до кости, отразится от нее и может поступить на торец ООВ, внося искажения в результат измерения (см. рисунок 3). Такой расчет никогда до нас не проводился. Поэтому можно утверждать, что известные ФПП-датчики имели неоптимальное конструктивно-технологическое исполнение. Выполненные с помощью таких средств измерения имели большую инструментальную и методические погрешности до 30 %.

Проведенные нами предварительные расчеты показали, что чем больше расширение сосуда, тем меньше угол  $\alpha$ . В рассмотренном варианте  $\alpha \approx 0,5 \dots 3^\circ$ , расстояние  $d$  составило (5...7) мм, при этом габаритные размеры оптического узла составили  $\varnothing 20 \times 15$  мм.

### Вывод

Переход к передовым ВОД микроперемещений и новым способам измерения скорости пульсовой волны кровотока с их помощью позволит повысить достоверность оценки состояния ССС пациентов.

### Заключение

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

- системный подход к оценке ситуации в области измерения скорости пульсовой волны кровотока в медицинской практике, показавший отсутствие отечественных средств измерения необходимой точности;
- новый подход к измерению скорости пульсовой волны кровотока на основе использования высокопрецизионных волоконно-оптических средств измерений;
- структура ВОД микроперемещений стенок кровеносного сосуда для определения скорости пульсовой волны и ход оптических лучей через слои тела пациента;
- найденные параметры ВОД, обеспечивающие необходимую чувствительность преобразования оптического сигнала в зоне измерения: угол  $\alpha$ , под которым оптический поток проходит через кожу, и расстояние  $d$  между оптическими осями ПОВ и ООВ.

### Список литературы

1. Каро К. и др. *Механика кровообращения: Пер. с англ.* - М.: Мир, 1981. – 624с.
2. Герман И. *Физика организма человека. Пер. с англ.: Научное издание / И. Герман – Долгопрудный: ИД «Интеллект», 2011. – 992 с.*
3. Boutouyrie P., et al. *Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. Hypertension. 2002; 39(1):10–15. DOI: 10.1161/hy0102.099031*
4. Ткаченко Ю.В. и др. *Адаптация методики измерения пульсовой волны для скрининговых обследований в амбулаторной практике. Клиническая практика. 2019; 10(1): 48-56, DOI: 10.17816/clinpract 10148-56;*
5. Townsend R.R., et al.; *American Heart Association Council on Hypertension. Recommendations for Improving and Standardizing Vascular Research on Arterial Stiffness. A Scientific Statement from the American Heart Association. J Hypertension 2015 Sep, 66(3): 698-722;*
6. *Увеличение резистивности артерий как определяющий фактор развития изолированной систолической артериальной гипертензии/А.А.Соколов, М.В. Солдатенков //Артериальная гипертензия, Т.13 №1, 2007, - С.7-10*
7. *Методы и аппаратура для диагностики состояния сердечнососудистой системы по характеристикам пульсовой волны/ Усанов Д.А., Скрипаль А.В., Вагарин А.Ю., Рытик А.П. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2009. – 96 с.*
8. *vdd-pru.ru*
9. Ткаченко Ю.В. и др. *Адаптация методики измерения пульсовой волны для скрининговых обследований в амбулаторной практике. Клиническая практика. 2019; 10(1): 48-56, DOI: 10.17816/clinpract 10148-56*
10. *Парфёнов А.С. Экспресс-диагностика сердечно-сосудистых заболеваний. Мир измерений. 2008. №6:74-82*
11. *Васюк Ю.А., Баранов А.А. и др. Согласованное мнение российских экспертов по оценке артериальной жесткости в клинической практике. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2016. 15(2): 4-19*
12. *заявка US № 2015/0065828 A1, 2015*
13. *Van Bortel L.M., Laurent S., Boutouyrie P. et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity//Journal of hypertension.–2012.–V.30. – №. 3. – P. 445-448*



14. Allen J. *Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. Physiological measurement.* 2007. 28 (3): R1-R39); патент № US9687161 B2, 2017
15. [teatnail.ru](http://teatnail.ru)
16. *Оптоэлектронный датчик перемещений/А.В. Бадеев, Т.И. Мурашкина//Датчики и системы.-2003.-№5.- с.30 – 32*
17. Патент на изобретение 2431808 РФ *Оптоэлектронная система измерения уровня жидкости /Е.А.Бадеева, А.В.Бадеев, О.С. Граевский И др. //опубл. 20.10.2011. Бюл. № 29*
18. *Бадеев А.В. Оптоэлектронные датчики линейных перемещений для информационно-измерительных систем: Дис. ... канд. техн. наук: 05.11.16 / Бадеев Александр Валентинович– Пенза, 2006. - 23 с.*
19. *Якушенков Ю.Г. Теория и расчет оптико-электронных приборов: Учебник для вузов. - Изд. 2-е перераб. и доп. - М.: Советское радио, 1980, 392 с.*

**Сведения об авторах**

**Татьяна Ивановна Мурашкина**,  
д.т.н., профессор, главный научный сотрудник  
ООО «Специальные волоконно-оптические измерительные системы»  
Заречный, Россия  
**E-mail:** [timurashkina@mail.ru](mailto:timurashkina@mail.ru)

**Сергей Иванович Геращенко**,  
д.т.н., профессор, заведующий кафедрой «Медицинская кибернетика и информатика»,  
ФГБОУ ВО  
«Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия  
**E-mail:** [mpo@list.ru](mailto:mpo@list.ru)

**Елена Александровна Бадеева**,  
д.т.н., доцент,  
профессор кафедры «Радиотехника и радиоэлектронные устройства»,  
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия  
**E-mail:** [badeeva\\_elen@mail.ru](mailto:badeeva_elen@mail.ru)

**Александр Валентинович Бадеев**,  
к.т.н., старший научный сотрудник  
НТЦ «Нанотехнологии  
волоконно-оптических систем»,  
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия  
**E-mail:** [badeyev@mail.ru](mailto:badeyev@mail.ru)

**Михаил Сергеевич Геращенко**,  
ассистент кафедры  
«Медицинская кибернетика и информатика»  
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»  
Пенза, Россия  
**E-mail:** [yurii-59@mail.ru](mailto:yurii-59@mail.ru)

**Information about authors**

**Tatiana Ivanovna Murashkina**,  
Doctor of Technical Sciences, Professor, Chief Researcher  
LLC "Special fiber-optic measuring systems", Zarechny, Penza region, Russia  
**E-mail:** [timurashkina@mail.ru](mailto:timurashkina@mail.ru)

**Sergey Ivanovich Gerashchenko**,  
Doctor of Technical Sciences, Professor,  
Head of the Department of Medical Cybernetics and Computer Science,  
Penza State University  
Penza, Russia  
**E-mail:** [mpo@list.ru](mailto:mpo@list.ru)

**Elena Aleksandrovna Badeeva**,  
Doctor of Technical Sciences, Associate Professor,  
Professor of the Department of Radio Engineering and Radio Electronic Devices,  
Penza State University  
Penza, Russia  
**E-mail:** [badeeva\\_elen@mail.ru](mailto:badeeva_elen@mail.ru)

**Alexander Valentinovich Badeev**,  
Candidate of Technical Sciences,  
Senior researcher at the Scientific Research Center "Nanotechnology, of Fiber-optic systems", Penza State University,  
Penza, Russia  
**E-mail:** [badeyev@mail.ru](mailto:badeyev@mail.ru)

**Mikhail Sergeevich Gerashchenko**,  
Assistant of the Department of Medical Cybernetics and Computer Science,  
Penza State University,  
Penza, Russia  
**E-mail:** [yurii-59@mail.ru](mailto:yurii-59@mail.ru)

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛАЗЕРОИНДУЦИРОВАННОЙ КООГУЛЯЦИИ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ

*Для исследования процессов лазероиндуцированной коагуляции опухолевых тканей применительно к задаче лечения гепатоцеллюлярной карциномы предложена биомодель на основе яичного куриного белка. Показана возможность визуализации и формирования 3D-температурной области в объеме опухолевой ткани с помощью доставки лазерного излучения оптическими волокнами.*

**Ключевые слова:** лазер, оптическое волокно, печень, опухоль, биомодель, коагуляция, яичный белок

A K Dmitriev, V N Kortunov, V A Ulyanov  
IPT FRC "Crystallography and Photonics" RAS

## SIMULATION OF LASER-INDUCED COAGULATION OF TUMOR TISSUE

*To investigate the processes of laser-induced coagulation of tumor tissues in relation to the problem of treating hepatocellular carcinoma, a biomodel based on chicken egg protein is proposed. The possibility of effective formation of a 3D temperature region in the volume of tumor tissue by delivering laser radiation by optical fibers is shown.*

**Key words:** laser, optical fiber, liver, tumor, biotissues, biomodel, coagulation, egg protein

### Введение

Онкологические заболевания являются второй по значимости причиной смертности в Российской Федерации. На протяжении последних 10 лет ежегодно в РФ злокачественными опухолями заболевают 420–450 тысяч человек, что соответствует населению крупного областного центра РФ. Высокий показатель инвалидности по причине онкологических заболеваний занимает второе место после сердечно – сосудистых заболеваний [1]. Одной из радикальных мер по снижению онкозаболеваний является их выявление и лечение на ранних стадиях.

Лазерная локальная гипертермия давно и активно используется в противоопухолевой терапии [2]. Традиционное применение этого метода основано на том, что селективная гибель опухолевых клеток наблюдается в диапазоне умеренных температур 40—45°C. Это объясняется характерными особенностями микрофизиологии опухолей, в частности, наличием в них, в отличие от нормальных тканей, участков гипоксии и низкого внеклеточного рН, что делает опухоли более термочувствительными. Согласно современной точке зрения, традиционная гипертермия в первую очередь рассматривается как универсальный и наиболее эффективный модификатор радио- и химиотерапии, способный повысить их эффективность в 1,5—2,5 раза и только в случае невозможности применения этих классических методов традиционная гипертермия рассматривается как монотерапия [3]. При этом гипертермия в самостоятельном виде оказывает существенное противоопухолевое действие только в 12—13% случаев [4, 5].

Нами предлагается в качестве самостоятельного метода исследовать возможности нагрева опухолевой ткани до температуры коагуляции, составляющей 60–70°C в зависимости от типа ткани. В качестве объектов лазероиндуцированной коагуляции рассматриваются образования в объеме ткани - подповерхностные (от 3 до 6 см в глубину) и глубокие (более 6 см в глубину ткани) согласно принятой в гипертермической онкологии классификации [6].

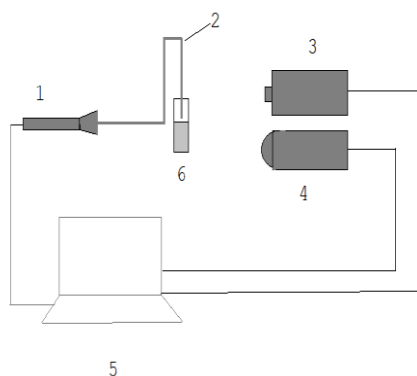
### Цель работы

Целью данной работы является выбор биомоделей для исследования процессов лазероиндуцированной коагуляции опухолевых тканей применительно к задаче

лечения гепатоцеллюлярной карциномы.

**Методы и материалы**

Для экспериментальной оценки выбора биомоделей использовалась установка, схема которой представлена на рис. 1. В качестве источника лазерного излучения использовался волоконный многомодовый лазер мощностью до 15 Вт с длиной волны 1,94 мкм. Для доставки излучения к биомодели использовалось оптическое волокно с диаметром сердечника 600 мкм. Для контроля и визуализации температурных полей использовался тепловизор A655sc (FLIR) с дополнительным объективом для увеличения. Съёмка и визуализация процесса лазероиндуцированной коагуляции осуществлялась скоростной камерой (Photron), скорость съёмки составляла 60 кадров в секунду. В качестве биомодели использовался куриный яичный белок, который помещался в прозрачную кювету. Лазерное излучение с помощью оптического волокна подводилось к кювете сверху (см. рис.1).



**Рис. 1.** Схема экспериментальной установки. 1- лазер; 2-оптическое волокно; 3-скоростная видеокамера; 4-тепловизор; 5 – компьютер; 6-биомодель.

**Полученные результаты**

Выбор биомоделей для исследования процессов лазероиндуцированной коагуляции опухолевых тканей излучением волоконных лазеров проводится применительно к задаче лечения гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). ГЦК является злокачественным поражением печени (печеночно-клеточный рак), которое диагностируется в 80% случаев всех видов заболеваний печени. Сложность этого заболевания заключается в его стремительном прогрессировании: при некоторых формах ГЦК от момента выявления яркой клинической картины до летального исхода проходит всего несколько месяцев. Такого рода опухоли формируются в объеме органа и на начальной стадии заболевания могут представлять собой сферические или эллипсоидные образования размером до 0,5- 1 см (рис. 2).



**Рис. 2.** Типичный вид ГЦК на начальной стадии.

При традиционной лазерной гипертермии в температурном диапазоне 40—45°С имеют место повреждения клеток, такие как деактивация ферментов, изменения в клеточных мембранах и зависимости от времени облучения - гибель клеток. При температуре коагуляции  $\geq 60-70^{\circ}\text{C}$  происходят необратимые процессы - денатурация белков, коагуляция, некроз ткани. Для обеспечения эффективности такой процедуры

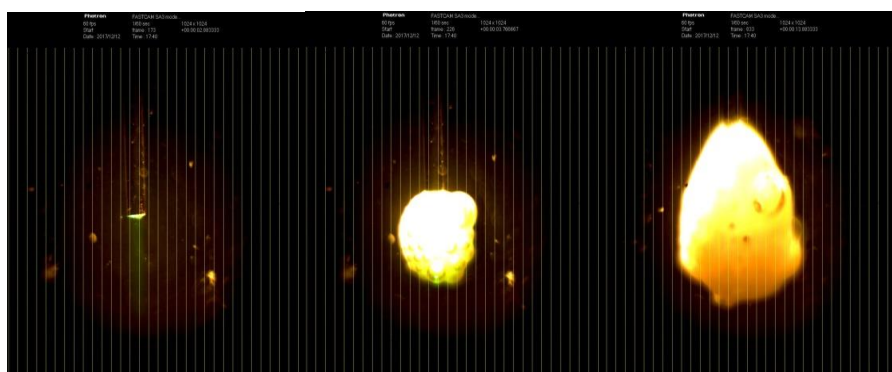
необходимо создать вокруг опухоли 3D-температурную область с границей между опухолевой и здоровой тканями 43-45°C (температура цитотоксического эффекта) или ≥60°C (температура коагуляции белков ткани). Лазероиндуцированная коагуляция опухолевой ткани представляется более эффективным подходом в связи с необратимой гибелью опухолевой ткани

Для определения оптимальных условий лазерного нагрева с управляемыми 3D-температурной областью и степенью травматичности окружающих опухоль здоровых тканей целесообразно экспериментально моделировать процесс лазерной коагуляции ГЦК. В процессе лазерной коагуляции биоткани происходит денатурация белков в результате необратимого нарушения пространственной структуры их молекул. Для визуализации процесса коагуляции и формообразования коагулируемого объема нами предложено использовать биомодели на основе куриного яичного белка и печени свиньи *in vitro*. Состав яичного белка и печени свиньи приведен в табл. 1. В качестве биомоделей они были выбраны вследствие достаточно схожего содержания воды, белков и температуры коагуляции. Содержание воды и других компонент в печени свиньи близки к характеристикам печени человека.

**Таблица 1. Состав яичного белка и печени свиньи [7, 8].**

Биоматериал	Состав		Темп. коагуляции °С
	Вода	Белки	
Яичный белок	86,5	12,5	61-65
Печень свиньи	71.3	18.8	60-70

Перспективным подходом для формирования 3D-температурной области в объеме опухолевой ткани является локальная доставка лазерного излучения с помощью оптических волокон, что позволяет управлять тепловыми полями в опухолевой ткани и на ее границах с минимальным повреждением здоровых тканей. Этот метод дает возможность подводить лазерное излучение к подповерхностным и глубоким образованиям ГЦК. На рис. 3 показано образование коагулята в яичном белке, при воздействии непрерывного лазерного излучения с длиной волны 1,94 мкм. Мощность излучения – 3,2 Вт, общее время облучения – 10 сек. Таким образом, данная биомодель позволяет визуализировать процесс лазероиндуцированной коагуляции и 3D-температурную область в объеме опухолевой ткани.



**Рис. 3. Коагулят, образованный при воздействии непрерывного лазерного излучения с длиной волны 1,94 мкм.**

Температура коагуляции яичного белка определялась следующим образом. Открытая поверхность жидкого яичного белка нагревалась излучением лазера с расстояния 1-3 мм от торца волокна. Т.к. при использовании длины волны 1,94 мкм преобладает поверхностное поглощение, то на поверхности образца образовывался коагулят круглой формы. Полученное с помощью тепловизора распределение температуры поверхности коагулята представлено на рис.4 и рис. 5. Используя график распределения температуры (см. рис.5) и, измерив продольные размеры образовавшегося коагулята (свернувшийся белок имеет четкие визуальные границы) с помощью микроскопа

можно определить температуру коагуляции. Температура коагуляции при мощности излучения 7 Вт и длительности импульса 200 мс составила 59 °С. Измеренная температура очень близка к температуре коагуляции ткани печени свиньи (см. таблицу).

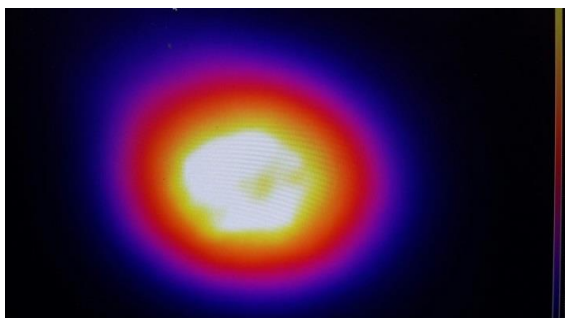


Рис. 4. Распределение температуры при нагреве для длины волны 1,94 мкм и импульса 200 мс.

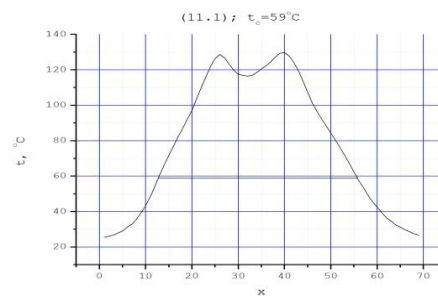


Рис. 5. График распределения температуры при нагреве для длины волны 1,94 мкм и импульса 200 мс.

### Выводы

Предложено исследовать возможности нагрева опухолевой ткани до температуры коагуляции, составляющей 60-70°С в зависимости от типа ткани. Для исследования процессов лазериндуцированной коагуляции опухолевой ткани применительно к задаче лечения гепатоцеллюлярной карциномы предложена биомодель на основе яичного куриного белка. Показана возможность визуализации и формирования 3D-температурной области в объеме опухолевой ткани с помощью доставки лазерного излучения оптическими волокнами. Данная биомодель позволит экспериментально моделировать процесс коагуляции для определения оптимальных условий лазерного нагрева опухолевой ткани и степени термической травматичности окружающих ее здоровых тканей.

**Работа выполнена при поддержке Министерства науки в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.**

### Заключение

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

Предложен подход, основанный на лазериндуцированной коагуляции опухолевых тканей излучением волоконных лазеров применительно к задаче лечения гепатоцеллюлярной карциномы.

Для визуализации процесса коагуляции и формообразования коагулируемого объема предложено использовать биомодели на основе куриного яичного белка.

Показана возможность эффективного формирования 3D-температурной области в объеме опухолевой ткани с помощью доставки излучения оптическими волокнами.

### Список литературы

1. В.И. Чиссов. *Онкология. Национальное руководство*. М., Геотар-Медиа, 544 с., (2017).
2. A.C. Steger, W. R. Lees, K. Walmsley, and S. G. Bown. *Interstitial laser hyperthermia: a new approach to local destruction of tumours*. *BMJ*, 1989, 299(6695), p. 362–365.
3. Фрадкин С.З. *Современное состояние гипертермической онкологии и тенденции ее развития*. *Медицинские новости*, 2004, № 3, с. 3–8.
4. Van der Zee J. *Heating the patient: a promising approach?* *Annals of Oncology*.— 2002.— V.13.— P.1173—1184.
5. Мардынский Ю.С., Курпешев О.К., Ткачев С.И. *V Российская онкологическая конференция*.— М., 2001 //http://www.rosoncweb.ru./library/5th-conf/47.html.
6. О.К. Курпешев, Я. Ван Дер Зее, М. Кавагано. *Гипертермия опухолей глубокой локализации*. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*, 2019, т. 64, № 4, с. 64–75.
7. <https://zverovod.info/kury/sostav-yaytsa.html>
8. <http://www.grsmu.by/files/file/university/cafedry/biologicheskoi-himii/files>



**Сведения об авторах**

**Александр Константинович Дмитриев,**  
н.с.  
Институт фотонных технологий  
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН  
Москва, Россия  
**E-mail:** [dmitriev\\_a62@mail.ru](mailto:dmitriev_a62@mail.ru)  
**Владимир Николаевич Кортунов,**  
н.с.  
Институт фотонных технологий  
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН  
Москва, Россия  
**E-mail:** [vnkor@yandex.ru](mailto:vnkor@yandex.ru)  
**Валерий Андреевич Ульянов,**  
к.т.н., в.н.с.  
Институт фотонных технологий  
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН  
Москва, Россия  
**E-mail:** [vaul595@mail.ru](mailto:vaul595@mail.ru)

**Information about authors**

**Alexander Konstantinovich Dmitriev,**  
researcher,  
IPT FRC “Crystallography and Photonics”  
RAS  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [dmitriev\\_a62@mail.ru](mailto:dmitriev_a62@mail.ru)  
**Vladimir Nikolaevich Kortunov,**  
researcher, IPT  
FRC “Crystallography and Photonics”  
RAS  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [vnkor@yandex.ru](mailto:vnkor@yandex.ru)  
**Valery Andreevich Ulyanov,**  
PhD, leading researcher,  
IPT FRC “Crystallography and Photonics”  
RAS  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [vaul595@mail.ru](mailto:vaul595@mail.ru)

УДК 004.81  
 ГРНТИ 28.23, 34.03.23, 27.35.43  
 DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.363-367

Г. Н. Болдырева  
 ФГБУН «Институт высшей нервной  
 деятельности и нейрофизиологии» РАН  
 ФГБНУ «НИИ Нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко»

## ПОЛУШАРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПАТТЕРНОВ ЭЭГ ПРИ ПОРАЖЕНИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ СТРУКТУР МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

*Обобщение результатов анализа электрической активности мозга пациентов с опухолевым поражением диэнцефальных и лимбических структур позволило пополнить набор диагностических ЭЭГ-признаков поражения регуляторных структур и расширить принятые в клинике возможности интерпретации межполушарной асимметрии ЭЭГ при церебральной патологии.*

**Ключевые слова:** опухоли мозга, таламо-гипоталамические структуры, гиппокамп, математический анализ ЭЭГ, альфа-активность, эпилептиформные знаки, эквивалентные дипольные источники.

G.N. Boldyreva  
 IHNA& NPh RAS, N.N.Burdenko NSPCN

## HEMISPHERIC FEATURES OF EEG PATHOLOGICAL PATTERNS IN CASE OF DAMAGE TO THE REGULATORY STRUCTURES OF THE HUMAN BRAIN.

*A generalization of the results of the analysis of the electrical activity of the brain of patients with tumor lesions of diencephalic and limbic structures made it possible to replenish the set of diagnostic EEG signs of damage to regulatory structures and expand the clinic's accepted interpretation of interhemispheric asymmetry of EEG in cerebral pathology.*

**Key words:** brain tumors, thalamo-hypothalamic structures, hippocampus, mathematical analysis of EEG, alpha activity, epileptiform signs, equivalent dipole sources.

### Введение

В последние годы в связи с широким использованием методов нейровизуализации (КТ, МРТ) задачи топической диагностики по данным электроэнцефалографического исследования отошли на второй план. Наибольшую актуальность приобрели проблемы, касающиеся определения степени нарушения целостной деятельности мозга. В этом плане перспективным представляется анализ нейродинамических перестроек при поражении структур, выполняющих регуляторную функцию в осуществлении интегративной деятельности мозга. К таким структурам в первую очередь относятся диэнцефальные и лимбические отделы. Следует подчеркнуть, что сведения об реорганизации электрической активности мозга при поражении этих структур относятся ко времени, когда методические возможности анализа ЭЭГ были крайне ограничены. Нам представлялось, что в поисках маркеров нарушения целостной деятельности мозга при поражении его регуляторных структур важным является рассмотрение особенностей межполушарной асимметрии патологических паттернов ЭЭГ с применением комплекса методов математического анализа ЭЭГ и привлечением данных нейровизуализации (МРТ). Надо отметить, что в последние десятилетия наблюдается тенденция к разграничению функций глубоких структур правого и левого полушарий; в частности, левый гиппокамп связывают с вербально опосредованной эпизодической памятью [1], тогда как правый - с обработкой зрительно-пространственной информации [2].

**Цель работы:** проанализировать особенности проявления межполушарной асимметрии патологических паттернов ЭЭГ при поражении таламо-гипоталамических и лимбических структур мозга на разных этапах развития патологического процесса.

### Материал и методы исследования

Обобщены данные анализа ЭЭГ 56 больных (от 17 до 49 лет, средний возраст 33 года) с очаговым поражением диэнцефальной области и 31 больного (от 31 до 67 лет, средний возраст 45 лет) с вовлечением в патологический процесс лимбических отделов мозга. Больные находились на лечении в ИНХ имени Н.Н. Бурденко и исследовались в

дооперационном периоде. Полученные данные рассматривались в сопоставлении с результатами проведенного в тех же методических условиях исследования ЭЭГ 27 здоровых людей, приблизительно той же возрастной группы. Для верификации топографии патологического очага привлекались результаты рентгено-контрастных методов исследования (КТ, МРТ), а также данные операции. Регистрация ЭЭГ проводилась на электроэнцефалографах (Нихон Коден, Япония) при расположении электродов по международной схеме 10-20%. Запись осуществлялась в состоянии относительного покоя (при закрытых глазах) и при афферентной стимуляции: ритмический свет, звуковая нагрузка (произвольное по команде исследователя сжимание и разжимание пальцев в кулак), повторное открывание-закрывание глаз. Спектрально-когерентный анализ ЭЭГ и топографическое картирование отдельных составляющих спектров мощности ЭЭГ осуществлялось по программе Нейрокартограф (МБН, Россия) в полосе от 0 до 35 Гц, с разрешающей способностью по частоте 0.4 Гц. Числовыми характеристиками спектров мощности были средняя частота ( $f_{cp}$ ) и эффективная частотная полоса ( $\Delta f_{эф}$ ), характеризующая степень синхронизации ЭЭГ. Для анализа спектров когерентности использовался параметр средний уровень когерентности ( $\Gamma$ ), который вычислялся как для всей анализируемой частотной полосы в целом, а также отдельных основных физиологических диапазонов ритмов: дельта, тета, альфа, бета. Эти предложенные нами [3] количественные характеристики спектров мощности и когерентности ЭЭГ подвергались статистической обработке с использованием критерия Стьюдента. Для определения зон генерации различных патологических паттернов ЭЭГ проводилась трёхмерная локализация их эквивалентных дипольных источников (ЭДИ) с использованием программы Brainloc (МБН, Россия).

#### Результаты и их обсуждение

В группу пациентов с поражением **диэнцефальных структур** были включены больные с опухолью гипофиза, III желудочка и краниофарингиомами. Перечисленные формы поражения рассматривались в качестве модели разных вариантов хронического воздействия патологического очага на таламо-гипоталамические отделы мозга человека. Было установлено, что для опухолей диэнцефальной локализации типичным является нарушение картины пространственной организации альфа-ритма в коре больших полушарий. Если в ЭЭГ здоровых людей альфа-ритм характеризуется максимальной представленностью в задних отделах полушарий и наличием амплитудного градиента в затылочно-лобном направлении, то при диэнцефальной патологии наиболее часто встречающейся формой пространственной реорганизации альфа-ритма является его генерализация по коре, со стиранием регионарных амплитудных различий. Можно полагать, что в основе формирования генерализованной альфа-активности лежит усиление синхронизирующих влияний на кору со стороны вовлеченных в патологический процесс диэнцефальных структур [4]. Генерализация по коре альфа-ритма, как правило, сопровождалась его замедлением до 8-9 Гц. и ослаблением реактивных перестроек на функциональные нагрузки. По мере развития патологического процесса в мозге эта форма активности сменялась генерализованным тета-ритмом. Наиболее отчетливо стирание регионарных особенностей ЭЭГ прослеживается при сопоставлении показателей средней частоты спектров мощности ( $f_{cp}$ ) ЭЭГ разных областей мозга. Следует отметить факт совпадения отмеченных особенностей спектральных характеристик ЭЭГ больных с поражением гипоталамических структур с наблюдаемыми нами ранее изменениями спектров мощности ЭЭГ здоровых людей в условиях снижения уровня бодрствования [5]. Это подчеркивает функциональную значимость данной спектральной характеристики ЭЭГ в идентификации уровня бодрствования, а также роль гипоталамических структур в формировании цикла сон-бодрствование.

Другой, менее распространенной формой изменения топографии альфа-ритма при дисфункции диэнцефальных структур является его большая стабильность и синхронизация не в затылочных, а в центрально-лобных областях. В основе формирования этого типа пространственной реорганизации ЭЭГ, по-видимому, наряду с нарастанием



синхронизирующих влияний диэнцефальных структур, лежит усиление активирующих влияний ретикулярных структур ствола, сопровождающееся снижением вольтажа биопотенциалов в затылочных отделах коры. Усиление синхронизации биопотенциалов в передних отделах мозга при поражении диэнцефальных структур проявлялось также в более частой, чем у здоровых людей, встречаемости роландического ритма. Причём, в отличие от нормы, этот паттерн ЭЭГ, также как и альфа-ритм, мог проявляться с признаками межполушарной асимметрии за счет его преобладания на стороне преимущественного роста опухоли.

Когерентный анализ, позволяющий оценить степень сочетанности ЭЭГ различных зон коры, подчеркивал увеличение пространственной синхронизации отдельных частотных составляющих альфа-диапазона, что является отражением формирования нетипичных для здорового мозга патологических связей на этих частотах. Использование программы Brainloc позволило установить, что эквивалентные дипольные источники (ЭДИ) измененного по диэнцефальному типу альфа-ритма локализовались преимущественно в области таламо-гипоталамических структур билатерально, или с преобладанием на стороне преимущественного поражения. Примечательно, что локализация ЭДИ «диэнцефального» альфа-ритма у исследованных больных была сходной с зоной генерации ЭДИ тета-ритма, наличие которого является классическим ЭЭГ-маркером дисфункции диэнцефальных отделов мозга.

В качестве модели вовлечения в патологический процесс **лимбических структур** рассматривались особенности реорганизации ЭЭГ больных с менингиомами медиобазальных отделов височной доли, вовлекающих в патологический процесс гиппокамп и соседние с ним образования мозга. Было установлено, что на начальных стадиях роста опухоли в височной области пораженного полушария (в зоне проекции опухоли) могло отмечаться усиление альфа-активности. Важно отметить, что наличие этого «височного альфа-ритма» могло сочетаться с редукцией альфа-ритма в задних отделах пораженного полушария, подчеркивая его независимость от последнего. Анализ реакций на функциональные нагрузки показал, что в условиях активации «височный» альфа-ритм проявлялся более отчётливо, чем в состоянии спокойного бодрствования. Использование когерентного анализа ЭЭГ, особенно в условиях функциональных нагрузок, помогает выявить этот паттерн, при его слабой выраженности в фоновой ЭЭГ. Отмеченные функциональные особенности «височной» альфа-активности позволяют рассматривать ее как возможное отражение реакции активации вовлечённого в патологический процесс гиппокампальных структур. Это предположение основано на том, что согласно экспериментальным данным, раздражение гиппокампа, в отличие от ретикулярной формации ствола, сопровождается не ослаблением, а усилением синхронизации биопотенциалов коры. Условно, эту разновидность альфа-активности, регистрирующуюся в пораженном полушарии и отражающую формирование нетипичной для здорового человека системы взаимодействия структур лимбической системы с корой, мы обозначили как «гиппокампальный» альфа-ритм [6]. В пользу участия гиппокампа в генерации этой патологической формы альфа-ритма дополнительно свидетельствуют литературные данные, указывающих на то, что генерация мозгом ритмических колебаний связана с циркуляцией электрического возбуждения в нейросетях, включающих гиппокамп [7,8].

Проведенная трехмерная локализация ЭДИ «гиппокампального» альфа-ритма показала, что основная масса его дипольных источников была сосредоточена в глубинных структурах пораженной височной доли, захватывая базальные отделы, прилежащие к средней линии. Частота «гиппокампального» альфа-ритма могла как совпадать, так и отличаться от частоты «затылочного» альфа-ритма. Возможность фильтрации сигнала в произвольном диапазоне частот в программе Brainloc подтвердила положение о независимом характере анализируемых форм альфа-активности. При этом важно подчеркнуть, что ЭДИ «гиппокампального» альфа-ритма, как правило, были приурочены к области нижнего рога бокового желудочка, медиальные стенки и дно которого составляют гиппокамп.

Временами эта атипичная форма альфа-активности могла иметь пароксизмальный

характер, проявляясь в виде групп экзальтированных заостренных колебаний, приобретающая вид эпилептиформных знаков ЭЭГ, являющихся наиболее типичной формой реагирования гиппокампальных структур на воздействие патологического процесса. Этот паттерн мог отмечаться диффузно с переменным преобладанием сторон, чему соответствовал полиморфный характер пароксизмальных приступов, доминирующий в клинической картине заболевания исследованных больных, или проявляться с устойчивыми признаками межполушарной асимметрии. При этом важно подчеркнуть, что его преобладание или избирательное проявление могло отмечаться не только в пораженном, но и в интактном полушарии. Анализ случаев с локализацией эпилептических изменений не на стороне расположения опухоли показал, что этот вариант межполушарной асимметрии у больных с правосторонней латерализацией поражения встречается в 3 раза чаще по сравнению с левосторонней. Это обеспечивало больший % случаев с преобладанием эпи-знаков, независимо от стороны поражения, в левой гемисфере. Отмеченные топографические особенности проявления пароксизмальной активности при разной латерализации опухоли находили подтверждение и в определении ЭДИ их генерации. Выявленные полушарные особенности локализации эпилептиформных знаков свидетельствуют о неидентичном характере включения в патологический процесс правого и левого гиппокампов и согласуются с данными о функциональной асимметрии структур гиппокампово-миндалевидного комплекса у животных [6] и человека [7].

### **Заключение**

Проведенный анализ изменений электрической активности мозга при поражении лимбико-диэнцефальных структур выявил, наряду с разными формами проявления патологических паттернов, специфические черты нарушения пространственной организации основной составляющей ЭЭГ - альфа-ритма. При поражении диэнцефальных отделов это выражалось в генерализации альфа-ритма по коре или перемещение фокуса альфа-активности из затылочной в центрально-лобные области коры. При вовлечении в патологический процесс лимбических структур, на ранних стадиях роста опухоли, отмечалось усиление альфа-ритма в височной области пораженного полушария. Использование автоматических методов анализа существенным образом расширяет возможности выявления описанных атипичных форм альфа-активности, часто скрытых при визуальной оценке ЭЭГ. В идентификации этих патологических форм альфа-ритма особое место занимает поиск эквивалентных дипольных источников, позволивший обнаружить достаточно выраженную привязку локализации их ЭДИ к соответствующим анатомическим образованиям мозга. Важная роль в идентификации рассматриваемых атипичных форм альфа-активности принадлежит оценке их реагирования на функциональные нагрузки. В отличие от классического «затылочного» альфа-ритма с выраженной реакцией активации в ответ на афферентную стимуляцию, «диэнцефальному» альфа-ритму присуще ослабление этой реакции, а «гиппокампальный» альфа-ритм наоборот характеризуется более четкой выраженностью на фоне предъявления функциональных проб.

Выявленные нами при поражении регуляторных структур мозга атипичные формы альфа-активности позволяют расширить принятые в клинической электроэнцефалографии возможности интерпретации межполушарной асимметрии при церебральной патологии. Если асимметрия альфа-ритма по затылочным отделам обусловлена его редукцией в пораженном полушарии, то проявление межполушарной асимметрии по лобно-височным областям надо трактовать как следствие формирования автономных систем генерации альфа-активности в зоне проекции опухоли. В основе их создания лежит усиление взаимодействия вовлеченных в патологический процесс диэнцефальных (таламо-гипоталамических) и лимбических (гиппокампальных) отделов с корой, проявляющееся в ЭЭГ в форме «диэнцефального» и «гиппокампального» альфа-ритмов. Наряду с выявленными особенностями межполушарной асимметрии патологических форм альфа-активности, анализ эпилептических паттернов ЭЭГ также позволил уточнить специфику их топографии при разной латерализации поражения. Учет этих данных важен в разработке методов хирургического лечения эпилепсии, обусловленной

поражением медиобазальных отделов височной доли мозга человека. Полученные нами данные, наряду с результатами целого ряда экспериментальных и клинических исследований [9-12], свидетельствуют о важном вкладе в формирование межполушарной асимметрии ЭЭГ глубинных отделов мозга, в частности структур лимбико-диэнцефального комплекса..

В данной работе принципиально новыми представляются результаты, касающиеся трактовки межполушарной асимметрии патологических паттернов ЭЭГ (атипичных форм альфа-активности и эпилептиформных знаков) при разной латерализации поражения лимбико-диэнцефальных структур мозга человека.

**Работа поддержана средствами государственного бюджета по гос.заданию на 2019-2021 годы (АААА-А17-117092040004-0).**

### Список литературы

1. Bonner-Jackson A., Mahmoud S., Miller J. et al. Verbal and non-verbal memory and hippocampal volumes in a memory clinic population // *Alzheimers Res. Ther.* 2015. Vol. 7. № 1. P. 61.
2. Banks S.J., Jones-Gotman M., Ladowski D. et al. Sex differences in the medial temporal-lobe during encoding and recognition of pseudowords and abstract designs // *Neuroimage*. 2012. Vol. 59. № 2. P. 1888.
3. Русинов В.С., Гриндель О.М., Болдырева Г.Н., Вакар Е.М. Биопотенциалы мозга человека. Математический анализ // М.: Медицина, 1987, 254с.
4. Болдырева Г.Н. Атипичные формы церебральной альфа-активности при поражении регуляторных структур мозга человека // *Физиология человека*. 2018. Т. 44. № 3. С. 14.
5. Болдырева Г.Н., Жаворонкова Л.А. Характеристика межполушарных взаимоотношений ЭЭГ в оценке функционального состояния мозга человека // *Журн. высш. нерв. деят. им.И.П.Павлова*, 1989. Т. 39, вып. 2. С. 215-220.
6. Boldyreva Galina «The hippocampal alpha-rhythm” of the human brain // *EEG and Clin.Neurophysiol.*, 1997. V.103, №1. P.199.
7. Steriade M., Gloor P., Llinas R. et al. Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities: Report of the IFCN Committee on basic Mechanisms // *EEG and Clin.Neurophysiol.* 1990. Vol. 76. P. 481.
8. Иваницкий А.М. Синтез информации в ключевых отделах коры как основа субъективных переживаний // *Журн. высш. нерв. деят. им.И.П.Павлова*. 1997. Т. 47. № 2. С. 209.
9. Симонов П.В. Функциональная асимметрия лимбических структур мозга // *Журн. высш. нерв. деят. им.И.П.Павлова*. 1999. Т. 49. № 1. С. 22.
10. Raynal E., Schnider A., Manuel A.L. Early signal from the hippocampus for memory encoding // *Hippocampus*. 2020. Vol. 30. № 2. P. 114.
11. Bing Ni, Ruijie Wu, Tao Yu et al. Role of the Hippocampus in Distinct Memory Traces: Timing of Match and Mismatch Enhancement Revealed by Intracranial Recording // *Neurosci. Bull.* 2017. Vol. 33. № 6. P. 664
12. Астахова Е.А., Черенкова С.Э., Марченко Е.В. и др. Взаимоотношение биоэлектрической активности и структурных изменений в гиппокампе при височной фармакорезистентной эпилепсии // *Трансляционная медицина*. 2021. Т. 8. № 2. С.5.

#### Сведения об авторах

**Галина Николаевна Болдырева,**  
доктор биол. наук, проф.  
ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и  
нейрофизиологии РАН  
<http://www.ihna.ru>.  
ФГБНУ «НИИ Нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко»,  
Москва, Россия  
E- mail: [GBoldyreva@nsi.ru](mailto:GBoldyreva@nsi.ru)

#### Information about authors

**Galina Boldyreva,**  
DBS, professor  
IHNA & NPh RAS,  
N.N.Burdenko NSPCN  
Moscow, Russia  
E- mail: [GBoldyreva@nsi.ru](mailto:GBoldyreva@nsi.ru)

УДК 616.8  
ГРНТИ 76.29.51  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.368-375

О. Б. Сазонова, Е. М. Трошина  
ФГАУ “Национальный медицинский исследовательский центр  
нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко”  
Минздрава России

## ОТРАЖЕНИЕ В ЭЭГ НАРУШЕНИЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА У ДЕТЕЙ

*В работе рассматривается проблема оценки функционального состояния головного мозга у детей с нарушением мозговой гемодинамики по ишемическому типу, обусловленной разными причинами. Пациенты детского возраста обследовались до и после хирургического вмешательства, направленного на улучшение мозгового кровообращения. Детям с хронической церебральной ишемией, обусловленной интра- и экстракраниальной патологией магистральных артерий с НМК в анамнезе, проводилась оценка функционального состояния головного мозга по данным электроэнцефалографии. Данные ЭЭГ сопоставлялись с результатами нейропсихологического обследования.*

**Ключевые слова:** *Нарушения мозговой гемодинамики, хроническая ишемия мозга у детей, ЭЭГ.*

О. В. Sazonova, E. M. Troshina  
Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery,  
Ministry of Healthcare of the Russian Federation

## REFLECTION IN THE EEG OF DISORDERS OF CEREBRAL HEMODYNAMICS IN CHRONIC CEREBRAL ISCHEMIA IN CHILDREN

*The paper presents the results of a study of the bioelectrical activity of the brain in 77 patients aged 2 to 18 years old with chronic cerebral ischemia, due to pathology of the main arteries of the brain, observed and operated in the Institute of Neurosurgery of N.N. Burdenko from 2012. The study showed the role of EEG in assessing the functional state of the brain in children with chronic cerebrovascular insufficiency of various etiopathogenesis in children, depending on the age of the child. Comparison of EEG data in extra- and intracranial cerebral vascular pathology was performed. Revealed more pronounced changes with steno-occlusive disorders in the intracranial arteries. EEG is dominated by slow forms of activity or their combination with acute potentials. Extracranial pathology led to the predominance of signs of irritation in the bioelectric picture of the brain: accelerated, pointed alpha rhythm, acute potentials, frequent fluctuations. Detailed clinical and neurophysiological examination using EEG served as a rationale for diagnosis, determination of treatment tactics and indications and contraindications for surgical intervention.*

**Keywords:** *Disorders of cerebral hemodynamics, chronic cerebral ischemia in children, EEG.*

### Введение

Нарушение мозгового кровообращения (НМК) в детском возрасте является относительно редкой и мало изученной патологией. [1,2,3,4,5]. Согласно данным зарубежной литературы и медицинской статистики, заболеваемость инсультом у детей от 1 месяца до 18 лет составляет 7,8 случая на 100 тыс. населения в год. Официальная статистика заболеваемости детским инсультом в нашей стране отсутствует.

Детский инсульт считается гетерогенным по этиопатогенезу и клиническому течению [6,7]. Наиболее частыми причинами нарушения кровоснабжения головного мозга у детей являются аномалии развития сосудов, приводящие к гипоксии мозга и ишемическим нарушениям [8,9].

Одним из распространенных проявлений ангиодисплазий в детском возрасте является патологическая извитость внутренних сонных артерий (ВСА) [10,11]. Она встречается у 26,9% детей с неврологическим дефицитом и проявляется в виде хронической цереброваскулярной недостаточности (93,6%), преобладающих НМК (4,3%),

ишемического инсульта (2,1%). У 19,3% детей с патологической извитостью ВСА отмечаются эпилептические припадки [1,2,4, 7].

Частой причиной НМК у детей являются стеноз и окклюзия церебральных сосудов: посттромботические, воспалительные (васкулиты) или обусловленные диссекцией (расслоением) стенки артерий, кровоснабжающих мозг. Более редкой причиной НМК у детей является болезнь «мойя-мойя», характеризующаяся двусторонней окклюзией или прогрессирующим стенозом ВСА в интракраниальном отделе.

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные различным формам повреждений ЦНС у детей [6,8,9,12], до настоящего времени не существует единого комплекса эффективных диагностических и лечебных мероприятий при различной тяжести хронической церебральной ишемии, позволяющих снизить детскую инвалидность и смертность при данной патологии.

**Цель исследования:** оценить функциональное состояние головного мозга по данным ЭЭГ у детей с хронической церебральной ишемией, обусловленной интра- и экстракраниальной патологией магистральных артерий головы с клиническими признаками НМК и показать, как гемодинамический дефицит мозгового кровообращения влияет на биоэлектрическую активность головного мозга (БЭАМ).

### Материал и метод

Обследовано 77 детей в возрасте от 2 до 18 лет с хронической церебральной ишемией, обусловленной различными причинами. Из них 40 детей с экстракраниальной патологией - гемодинамической деформацией (извитостью) экстракраниального отдела внутренней сонной артерии (ВСА). У 37 пациентов была выявлена интракраниальная патология - стеноокклюзирующее поражение сосудов - посттромботические окклюзии средней мозговой артерии (СМА), супраклиноидного отдела ВСА, болезнь «мойя-мойя» и др.

Для оценки функционального состояния мозга выполнялась ЭЭГ на аналоговом электроэнцефалографе *Nihon Kohden* (19 каналов) и цифровом - *NicoletOne* (21 канал). Схема наложения электродов – международная (10-20%). Обследование проводилось до и после хирургического вмешательства, направленного на улучшение мозгового кровообращения- реконструктивные или реваскуляризирующие операции, в зависимости от вида заболевания.

### Результаты

При оценке функционального состояния головного мозга детей с хронической церебральной ишемией было выделено две группы больных в зависимости от локализации стено- окклюзирующего процесса: интракраниальная и экстракраниальная с НМК в анамнезе. В обеих группах проведено сравнение данных ЭЭГ и нейропсихологического обследования. Диагноз подтвержден результатами ангиографического исследования. Учитывалась сторонность процесса: одно- или двустороннее поражение, и возраст ребенка.

Таблица 1. Распределение пациентов по виду и расположению процесса.

Вид цереброваскулярной патологии	Двусторонняя патология	Односторонняя патология	Всего
Экстракраниальная (извитость ВСА)	32	8	40
Интракраниальная (болезнь моя-моя, аневризма, посттромботическая окклюзия и др.)	26	11	37
Итого	58	19	77

Таблица 2. Распределение пациентов цереброваскулярной патологией по виду и возрасту.

Вид цереброваскулярной патологии	Возрастной интервал, лет				Всего
	0 – 5	6 – 10	11 – 15	16 – 18	
экстракраниальная	4	19	12	5	40
интракраниальная	19	11	5	2	37
Итого	23	30	17	7	77

У всех детей с экстракраниальной патологией- гемодинамически значимой извитостью сонных артерий на шее (40 больных) на ЭЭГ до операции можно было видеть общие изменения БЭАМ, соответствующие возрасту пациентов, на фоне которых выявлялись признаки, свидетельствующие о раздражении коры, подкорковых и медиальных структур.

Обращало на себя внимание, что у детей 2 до 5 лет на фоне возрастных изменений ЭЭГ, отражающих незрелость коры, в задних отделах полушарий мозга регистрировался довольно устойчиво хорошо сформированный или экзальтированный альфа-ритм частотой 9-11 кол/сек, повышенной амплитуды, заостренный по форме, что не характерно для данной возрастной группы. Отмеченный факт был расценен нами как признак дисфункции (раздражения) стволовых структур, участвующих в регуляции БЭАМ, с усилением синхронизирующих влияний на кору (рисунок 1).

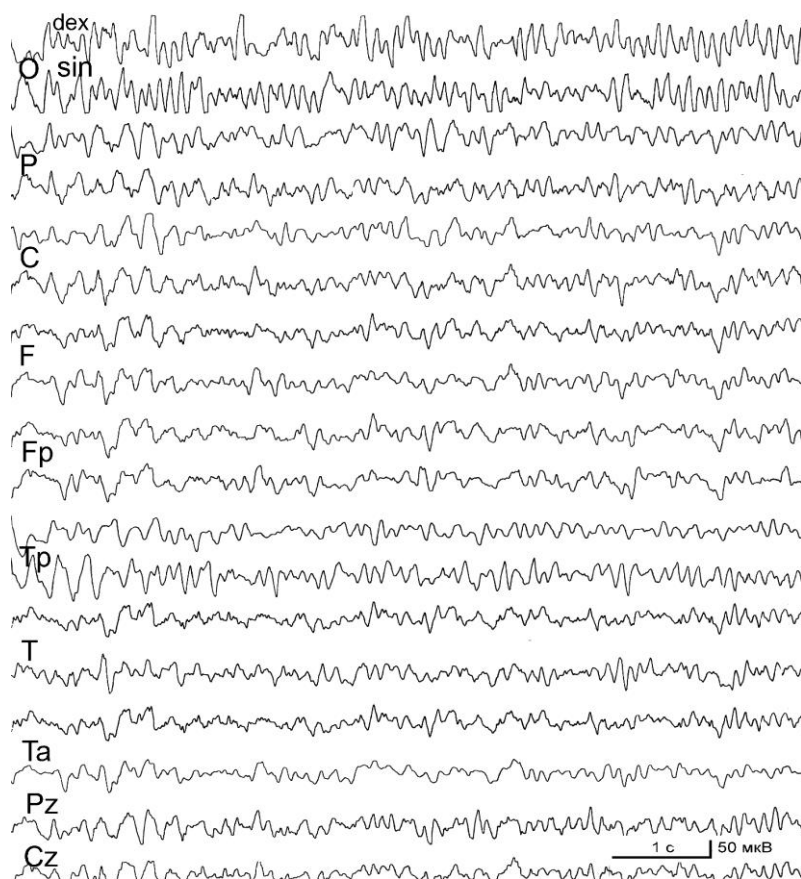


Рисунок 1. ЭЭГ (6-й Ч. 4 г.). Диагноз: двухсторонняя гемодинамически значимая S-образная извитость ВСА, больше справа.

#### Изменения на ЭЭГ:

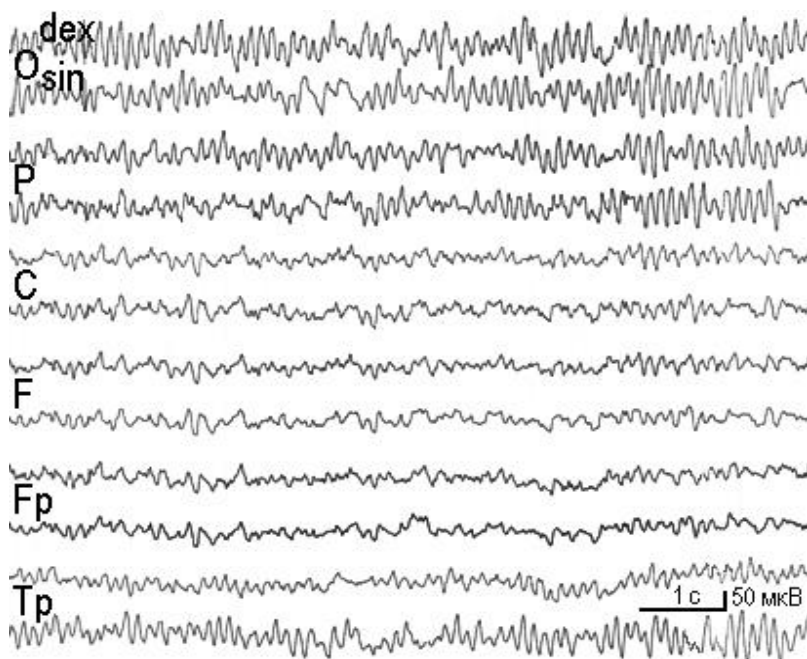
В задних отделах полушарий выявляется альфа-ритм, учащенный до 11 Гц, неравномерный по амплитуде, заостренный по форме, более дезорганизованный справа.

Негрубые эпилептиформные потенциалы регистрируются билатерально, в основном в затылочно-теменно-задневисочных областях с акцентом справа.

У детей в возрасте от 6 до 10 лет выявлялись признаки не вполне сформированной ЭЭГ в виде замедления альфа-ритма до 7 – 8 кол/сек, наличия диффузной полиморфной медленной активности, преимущественно тета-диапазона, соответственно возрасту. У пациентов в этой возрастной группе с двухсторонней извитостью ВСА выявлялись признаки раздражения коры в виде наличия групп заостренной альфа-активности нормальной частоты около 9 – 10 кол/сек или учащенных до 11 – 12 кол/сек, сочетающейся с острыми импульсами и эпилептиформными потенциалами,



преобладающими в затылочно-теменно-задневисочных областях, с акцентом на стороне более выраженной патологии. Признаки раздражения коры в виде наличия острых импульсов и негрубых эпилептиформных потенциалов определялись у всех исследованных пациентов, проявлялись с 2-х сторон, больше в задних отделах полушарий. Медленная активность регистрировалась диффузно в виде полиморфных колебаний дельта- и тета- диапазонов. Вместе с тем, у всех исследованных больных наблюдались признаки раздражения срединных образований мозга и диэнцефальных структур в виде наличия всплеск острых потенциалов и негрубых эпилептиформных компонентов, как в передних, так и в задних отделах мозга и колебаний тета- и альфа-диапазонов в лобно- центральных областях (рисунок 2).



#### Изменения на ЭЭГ:

В задних отделах полушарий представлен хорошо сформированный альфа-ритм, учащенный до 10-11 Гц, заостренный по форме, сочетающийся с негрубыми острыми потенциалами. Полиморфные медленные волны низкой амплитуды небольшого периода проявляются диффузно, преобладают в затылочной, теменной и височной областях, преимущественно слева.

Рисунок 2. ЭЭГ (6-й Б. 13 л.) Диагноз: двухстороннее петлеобразование ВСА на шее.

Четких очаговых изменений в коре больших полушарий не было отмечено ни у одного больного из группы больных с экстракраниальной патологией сосудов мозга. Патологические проявления на ЭЭГ наблюдались билатерально, преимущественно в виде признаков раздражения (острые импульсы и негрубые эпилептиформные потенциалы) или их сочетания с негрубой медленной активностью с преобладанием на стороне более выраженной ишемии, преимущественно в задних отделах полушарий (затылочно-теменно-задневисочная область).

Основной причиной интракраниального НМК у детей являются стено-окклюзирующие поражения сосудов мозга (диссекция артерий, кровоснабжающих головной мозг, кардиогенная эмболия, артериальная гипертензия, артерииты, болезнь «моя-моя» и др.).

У всех пациентов с интракраниальной патологией диффузные изменения на ЭЭГ зависели от возраста ребенка и состояния кровоснабжения мозга, т.е. выраженности ишемических нарушений и наличия в анамнезе периодов острого НМК. У всех пациентов с хроническим дефицитом кровоснабжения мозга наблюдалось снижение амплитуды биоэлектрических потенциалов диффузно, либо на стороне окклюзированного сосуда. В ЭЭГ доминировали полиморфные медленные волны, проявляющиеся билатерально, с преобладанием на стороне перенесенного ишемического инсульта в отдаленном периоде. Отмечались также признаки дисфункции стволовых структур. Типичных форм эпи-активности не было выявлено ни у одного больного. Регистрировались диффузные негрубые острые потенциалы, акцентированные на стороне поражения. Локальные изменения проявлялись в виде более выраженного снижения амплитуды биоэлектрических потенциалов, их

дезорганизации и преобладания медленных форм активности и острых потенциалов в задних отделах полушарий мозга, либо в лобных областях билатерально с акцентом на стороне более пострадавшего сосуда. У всех пациентов с болезнью «мойя-мойя» после длительной гипервентиляционной пробы выявлялось замедление корковой активности и удлинение периода ее восстановления до уровня фона. Данный феномен расценен как реакция на гипоксию в виде чрезмерной истощаемости биоэлектрических процессов мозга вследствие гемодинамического дефицита кровоснабжения.

На рисунках 3 и 4 представлены ЭЭГ пациентов разного возраста (5 лет и 13 лет) с множественными стенозами интракраниальных сосудов (болезнь мойя-мойя).

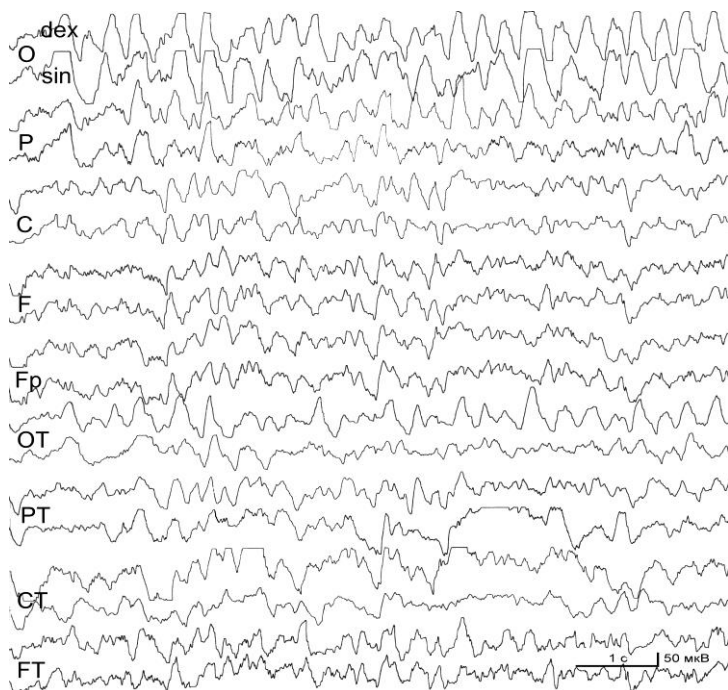
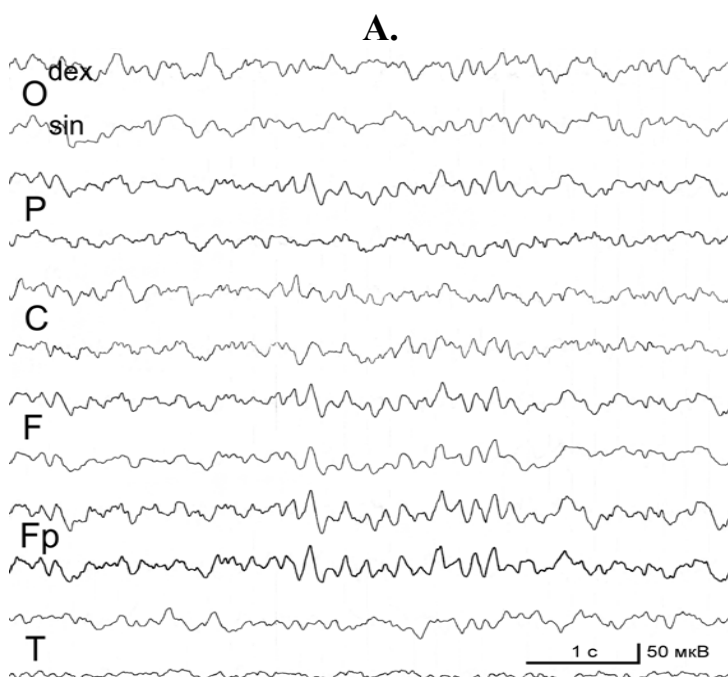


Рис.3. ЭЭГ (6-й М. 5 л.). Диагноз: ангиопатия сосудов мозга (синдром мойя-мойя) со стенозом внутренних сонных артерий, передних и средних мозговых артерий с двух сторон, а также задней мозговой артерии слева.



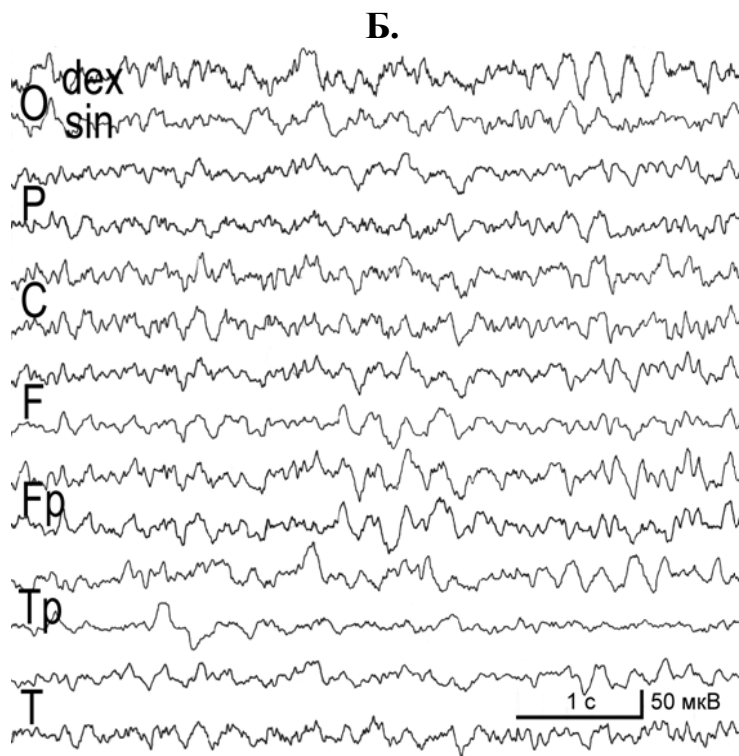
#### Изменения на ЭЭГ:

Выявляются черты не сформировавшейся БЭАМ (соответственно возрасту ребенка). ЭЭГ дезорганизована. Альфа-ритм, как основной, не выражен. Доминируют диффузные полиморфные медленные волны дельта-тетадиапазонов. Локальные изменения проявляются не отчетливо в виде относительного снижения амплитуды биопотенциалов и большей их дезорганизации слева и акцента медленных волн в левой теменно-височной области. Типичных форм эпи-активности не определяется. Отмечаются признаки раздражения коры, диэнцефальных и стволовых структур.

#### А. фоновая регистрация.

Выявляются диффузные изменения в виде дезорганизации и замедления корковой активности, признаков раздражения коры, подкорковых и диэнцефальных структур. Альфа-ритм представлен отдельными группами колебаний, замедленных до 8-7 кол/сек, во всех областях коры, более устойчивых в задних отделах полушарий мозга, больше справа. Доминируют полиморфные медленные волны невысокой амплитуды, преобладающие в задних отделах полушарий мозга билатерально. Эпилептиформной активности не определяется. Отмечается акцент раздражения и медленных колебаний в затыльно-теменно-височной областях справа.



**Б. во время гипервентиляции.**

При гипервентиляции (3 мин.) нарастает диффузная частая активность и острые импульсы, в большей степени выражены признаки раздражения подкорковых и диэнцефальных структур. Наросла медленная активность в задних отделах правого полушария (затылочно-теменно-височная область).

**Рисунок 4 (А, Б).** ЭЭГ (6-я В. 17 л.) Диагноз: стеноз ВСА, начальных сегментов ПМА и СМА с 2-х сторон; снижение кровотока по корковым отделам лобно-височно-теменных областей мозга с 2-х сторон; очаги ишемии в проекции валика мозолистого тела и теменной доли слева.

Все обследованные нами пациенты с хронической ишемией мозга были прооперированы [3]. После операции у больных с экстракраниальной патологией характер изменений на ЭЭГ сохранялся, как и до хирургического вмешательства. Однако наблюдалось нарастание признаков раздражения срединных структур и появление локальных изменений в виде акцента негрубой медленной активности на стороне операции. Вместе с тем, признаки раздражения (острые импульсы и эпилептиформные потенциалы) были более выражены на стороне контралатеральной операции. У всех пациентов с интракраниальной патологией в ЭЭГ доминировали полиморфные билатеральные медленные волны, преобладающие на стороне перенесенного инсульта. Отмечались диффузные негрубые острые потенциалы и признаки дисфункции стволовых структур. Локальные изменения проявлялись в виде снижения амплитуды, более выраженной дезорганизации и преобладания медленной активности и острых потенциалов в задних отделах полушарий, либо в лобных областях билатерально, с акцентом на стороне более пострадавшего сосуда. При сравнении данных ЭЭГ при интракраниальной и экстракраниальной патологии отмечено, что изменения в первом случае более выражены. При интракраниальной патологии чаще доминируют полиморфные медленные волны, при экстракраниальной – выявлялись преимущественно признаки раздражения.

Результаты ЭЭГ сопоставили с данными нейропсихологического исследования. Они показали высокую их согласованность как в группе детей с интракраниальной патологией, так и при экстракраниальной локализации процесса. ЭЭГ картина и структура нейропсихологического синдрома выявили диффузный характер патологических проявлений как в подкорковых и медиальных структурах, так и в коре без четкой локализации или латерализации процесса. При нейропсихологическом обследовании это проявилось, в первую очередь, в сочетанности нейропсихологических синдромов со стороны нескольких функциональных блоков мозга и мозаичности выявленных нарушений [3,13,14].

В группе детей с экстракраниальной патологией можно было говорить о более выраженном дефиците со стороны задних (височно-теменно-затылочных) отделов головного мозга. У 60% детей отмечались признаки несформированности тех или иных процессов переработки и хранения информации. Это проявлялось в речевой и

кинестетической сферах, что позволяет говорить о функциональном дефиците височных и теменных долей. Результаты ЭЭГ-обследования указывают на ту же зону функционального дефицита, более выраженного в задних отделах полушарий (затылочно-теменно-височная область) с акцентом на преимущественной стороне патологии.

В группе детей с интракраниальной патологией магистральных сосудов выявлялись более значительные изменения, как на ЭЭГ, так и при нейропсихологическом обследовании. При анализе ЭЭГ пациентов этой группы выявлялись признаки дисфункции стволовых структур, более выраженная дезорганизация и преобладание медленной активности и острых потенциалов либо в задних отделах полушарий, либо в лобных областях билатерально, с акцентом на стороне преимущественного поражения. При нейропсихологическом обследовании у пациентов с хроническим нарушением мозгового интракраниально отмечались задержка психоречевого развития, более грубо выраженная несформированность функций программирования, регуляции и контроля деятельности, а также выявлялись трудности переработки и хранения информации, что можно связать с незрелостью лобных и височно-теменно-затылочных отделов, преимущественно на стороне поражения. Наши данные согласуются с результатами других исследований, включавших в анализ более обширную выборку детей с патологией интракраниальных сосудов, перенесших НМК [13,14].

### Заключение

Таким образом, при сопоставлении результатов ЭЭГ и нейропсихологического исследования мы пришли к выводу о высокой согласованности полученных данных в группе детей с интракраниальной и экстракраниальной патологией церебральных сосудов. Выявлена специфика нарушений функционального состояния головного мозга у детей с экстра- и интракраниальной патологией. В группе детей с экстракраниальной патологией на первый план выходит незрелость процессов восприятия, переработки и хранения информации, функционально-анатомически соотносимая с гемодинамическим дефицитом височных, теменных и затылочных долей мозга, что полностью соответствовало данным ЭЭГ. У детей с интракраниальной патологией преобладает незрелость произвольной регуляции деятельности и более грубо выраженные трудности переработки и хранения информации, что соотносится с более грубыми диффузными изменениями на ЭЭГ, чертами несформированности кривой и появлением медленной активности и острых потенциалов в лобных долях мозга.

### Список литературы

1. Делягин В.М., Зотова Н.С., Мельникова М.Б., Коновалов Б.Ю., Уразбагамбетов А.У. Нарушения мозгового кровообращения у детей и подростков // Педиатрия. 2011. Т.2. С. 12-15.
2. Хачатрян В.А. Цереброваскулярная патология у детей // СПб: Изд-во «Десятка». 2006. 278 с.
3. Шевченко Е.В., Усачев Д.Ю., Белоусова О.Б., Лукишин В.А., Львова О.А. Детский инсульт. Реваскуляризирующие и реконструктивные операции у детей с цереброваскулярной патологией // Издательство П.А.Алексеева. Москва. 2017. 167 с.
4. Roach, E.S., Lo W.D., Heyer G.L. Pediatric Stroke and Cerebrovascular disorders // NewYork: Demos Medical Publishing. 2012. 352 p.
5. Bowers K.J. de Veber G.A., Ferriero D.M. // Cerebrovascular Disease in Children: Recent Advances in Diagnosis and Management // Journal of Child Neurology. 2011. No. 26 (9). P.1074-1100.
6. Masri A., Al-Ammouri I. Clinical presentation, etiology, and outcome of stroke in children: hospital-based study // Brain Dev. 2016. No. 38(2). P. 204-208.
7. Хоф В.Ю. Современные подходы к диагностике и лечению гипоксически-ишемических заболеваний у детей // Центральный научный вестник. 2016. Т.1. № 17 (17). С. 25-27
8. Дадаева Х.Х. Возрастные особенности распределения индекса и амплитуды биопотенциалов электроэнцефалограммы у детей и подростков в условиях

- нормоксии и гипоксии // Ж. Фундаментальные исследования. 2012. №10. С.40-45
9. Казанчян П.О., Валиков Е.А., Лобов М.А. Врожденные деформации сонных артерий у детей // Российский педиатрический журнал. 2008. №6, С. 17-21.
  10. Смирнова Ю.В., Граф Е.В. Роль патологической извитости внутренних сонных артерий в детской ангиологии // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 2. С. 99
  11. Morais N.M., Ranzan J., Riesgo R.S Predictors of Epilepsy in Children With Cerebrovascular Disease // J. Child Neurol. 2013. No 28(11). P. 1387-1391.
  12. O'Keeffe F., Liégeois F., Eve M., Ganesan V., King J., Murphy T. Neuropsychological and neurobehavioral outcome following childhood arterial ischemic stroke: attention deficits, emotional dysregulation, and executive dysfunction // Child neuropsychology. 2014. No 20(5). P. 557-582.
  13. Шевченко У.В., Нагорская И.А., Сазонова О.Б., Усачев Д.Ю., Лукишин В.А., Лаптева К.Н. Нейрофункциональное состояние головного мозга у детей с Хронической церебральной ишемией // Сибирское медицинское обозрение. 2018. № 5(113). С. 31-40

**Сведения об авторах**

**Ольга Борисовна Сазонова,**

к.м.н. в.н.с., доцент

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко»

Минздрава России

Москва, Россия, **E-mail:** OSazonova@nsi.ru

**Елена Михайловна Трошина,**

к.б.н., заведующий лабораторией

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко»

Минздрава России

Москва, Россия

**E-mail:** ETroshina@nsi.ru

**Information about authors**

**Olga Borisovna Sazonova,**

PhD, Leading Researcher, Associate Professor

Burdenko National Medical

Research Center of Neurosurgery, Ministry of

Healthcare of the Russian Federation,

Moscow, Russia, **E-mail:** OSazonova@nsi.ru

**Elena Mikhailovna Troshina,**

Ph.D., Head Dep. Clinical Neurophysiology

Burdenko National Medical

Research Center of Neurosurgery, Ministry of

Healthcare of the Russian Federation,

Moscow, Russia  
**E-mail:** ETroshina@nsi.ru

УДК 616.8

ГРНТИ 76.29.51

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.375-382

<sup>1</sup>Е. М. Трошина, <sup>1</sup>О. Б. Сазонова, <sup>1</sup>Е. Л. Машеров,

<sup>1</sup>О. А. Кроткова, <sup>1</sup>М. Ю. Каверина, <sup>2</sup>А. Ю. Кулева,

<sup>1</sup>А. В. Суханова

<sup>1</sup>ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии

имени академика Н.Н. Бурденко»

Минздрава России

<sup>2</sup>ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

**ЭЛЕКТРОГРАФИЧЕСКИЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ МОТОРНОЙ ПРОГРАММЫ ПРИ РЕАЛЬНОМ И ВООБРАЖАЕМОМ ДВИЖЕНИИ**

Проводилось исследование особенностей формирования медленных потенциалов мозга, предшествующих совершению заданного движения и аналогичной активности, возникающей при воображаемом движении (без моторного компонента). В исследовании была использована модифицированная методика регистрации «потенциала готовности» (ПГ) с использованием звукового стимула в качестве «стартового» сигнала для совершения реального движения (сжатие эспандера) и воображаемого движения. Регистрировали медленный негативный потенциал (МНП), который по амплитудно-временным параметрам и пространственной представленности, соответствует

классическому ПГ и рассматривается в качестве электрографического эквивалента процесса формирования моторной программы. Оценивалось физиологическое сходство/различие МНП потенциалов, зарегистрированных при реально совершаемом и воображаемом движении.

**Ключевые слова:** медленный негативный потенциал, потенциал готовности, программа подготовки движения, реально совершаемое и воображаемое движение

<sup>1</sup>Е. М. Troshina, <sup>1</sup>О. В. Sazonova, <sup>1</sup>Е. Л. Masherov, <sup>1</sup>О. А. Krotkova,  
<sup>1</sup>М. У. Kaverina, <sup>2</sup>А. У. Kuleva, <sup>1</sup>А. В. Sukhanova

<sup>1</sup>Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery,  
Ministry of Healthcare of the Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology

## ELECTROGRAPHIC EQUIVALENTS OF THE MOTOR PROGRAM FORMATION PROCESS IN REAL AND IMAGINARY MOTION

*A study was conducted on the features of the formation of slow brain potentials preceding the performance of a given movement and similar activity that occurs during an imaginary movement (without a motor component). The study used a modified technique for registering the "readiness potential" (RP) using a sound stimulus as a starting signal for making a real movement (compression of the expander) and an imaginary movement. A slow negative potential (SNP) was recorded, which, in terms of amplitude-time parameters and spatial representation, corresponds to the classical RP and is considered as an electrographic equivalent of the motor program formation process. The physiological similarity/difference of the SNP potentials recorded during a real and imaginary movement was evaluated.*

**Keywords:** slow negative potential, readiness potential, movement preparation program, real and imaginary movement

### Введение

Электрофизиологические исследования произвольной двигательной активности чаще всего основываются на анализе генерализованных и длительных изменений биоэлектрической активности мозга по данным суммарной ЭЭГ [1,2,3,4,5], сопоставлении их с параметрами фМРТ [6,7,8] и электромиографической (ЭМГ) активностью [9] при выполнении двигательной задачи. Для изучения процессов подготовки к реализации произвольного движения исследуется медленный негативный потенциал, формирующийся за несколько секунд до начала выполнения произвольного движения, являющийся электрографическим коррелятом формирования моторной программы. Это так называемый «потенциал готовности» (ПГ), который относится к классу связанных с событиями потенциалов (ССП) мозга (Е-волна, компонент Р300, негативность рассогласования и другие) [10,11,12,13,14,15,16,17], которые образуют достаточно широкий класс потенциалов, связанных с процессами обработки и анализа информации, с распознаванием, запоминанием стимула и принятием решения о его значимости.

В основе методики ПГ лежит регистрация биоэлектрической активности мозга и выделение медленной активности, предшествующей реализации произвольного движения, т.е. движение совершается без какого-либо внешнего сигнального стимула.

В нашей ранее опубликованной статье [16], на основании исследования проведенного на группе здоровых испытуемых, было показано, что при совершении движения по внешнему сигнальному стимулу формируется медленный негативный потенциал (МНП), предшествующий двигательной реакции, по физиологическому смыслу идентичный ПГ, который может рассматриваться как электрографический эквивалент процесса формирования моторной программы.

Реализации воображаемому (или мысленно представляемому) движению также предшествует формирование «преддвигательной программы», что сопровождается возникновением медленного негативного потенциала [17].

**Целью** данной работы было выявить особенности формирования МНП при реально совершаемом движении и при воображаемом движении, а также оценить физиологическое сходство/различие этих электрографических феноменов.

### Материал и методика исследования

Были проанализированы МПН 20-ти здоровых испытуемых (добровольцы в возрасте 22 – 30 лет, правши), полученные в двух сериях исследований: реализация движения (сжатие эспандера) по звуковому сигналу (серия 1) и воображаемом (мысленно представляемом) движения также по звуковому сигналу (серия 2). У всех испытуемых пробы проводились для правой руки. Биоэлектрическую активность мозга регистрировали от лобных и центральных областей, расположение активных скальповых электродов C3, C4, F3, F4, Cz, Fz (схема наложения электродов 10/20 %), референтных электродов - на мочках ушей A1, A2, четные отведения справа, нечетные - слева. ЭЭГ записывалась при максимальном расширении диапазона медленных частот (до 0,01 Гц) и ограничении пропускания частых ритмов (25 Гц). Для выделения МНП при реальном движении участки ЭЭГ суммировались и усреднялись относительно момента замыкания контакта эспандера, а при воображаемом движении опорным стимулом для усреднения являлся звуковой сигнал. Анализируемая эпоха анализа 5 с, количество усредненных эпох – 40, звуковой сигнал подавался с временным интервалом 6 с. Для контроля мышечной активности регистрировалась электромиограмма (ЭМГ) от *m. extensor carpi radialis longus*.

Для унификации точки отсчета при оценке временных параметров ответа был выбран момент подачи звукового стимула. Оценивалась длительность МНП (в мсек) от начала его подъема до точки с максимальной амплитудой и амплитуда потенциала (в мкВ) от начала подъема негативной фазы волны до ее максимума. Амплитудно-временные параметры МНП анализировались в контралатеральном и ипсилатеральном полушарии по отношению к «работающей» руке.

### Результаты исследования

При реально выполняемом движении (сжатие эспандера по звуковому сигналу) (серия 1) в лобных и центральных областях мозга регистрировался МНП с временными параметрами в диапазоне 1349 – 782,5 мс и амплитудой 9,2 – 2,4 мкВ. Средние по группе испытуемых значения временных и амплитудных параметров МНП представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Значения длительности и амплитуды МНП при реальном движении в контралатеральном и ипсилатеральном полушарии (средние значения по группе здоровых испытуемых).**

Отведения ЭЭГ	отведения контралатерального полушария			отведения ипсилатерального полушария		
	F3-A1	C3-A1	Cz-A1	F4-A2	C4-A2	Fz-A2
длительность МНП (мс)	<b>1084,8</b>	<b>1046,4</b>	<b>1052,8</b>	1120,6	1124,7	1068,1
амплитуда МНП (мкВ)	<b>5,4</b>	<b>5,8</b>	<b>4,1</b>	4,6	5,4	3,9

Преобладание по амплитуде и меньшая длительность потенциала отмечалась в полушарии контралатеральном по отношению к «работающей» руке, в основном в центральном отведении.

Было отмечено, что начало формирования МНП предшествовало звуковому сигналу. Это подтверждает наше ранее сделанное предположение [16], что подготовка к реализации движения начинается не с момента получения звукового сигнала, а в более ранний период, т.е. в период ожидания внешнего стимула. Длительность интервала (Т1) от момента начала нарастания восходящего фронта потенциала до звукового сигнала у разных испытуемых была в диапазоне 354 – 132 мс.

Проанализировано соотношение длительности интервала Т1 и длительности МНП. Отмечено, что данные временные параметры изменяются, практически во всех

случаях, однонаправленно – меньшая длительность интервала T1 сочеталась с меньшей длительностью МНП. Также отмечена корреляция длительности нарастания ЭМГ-активности до момента замыкания контакта эспандера (ЭМГ-пик) и временными значениями МНП (таблица 2).

**Таблица 2.** Сопоставление длительности МНП, ЭМГ-активности до момента замыкания контакта эспандера и интервала (T) от момента начала нарастания восходящего фронта потенциала до звукового сигнала.

	длительность МНП (мс)	длительность интервала T1 (мс)	длительность ЭМГ (мс)
большие временные значения (6 человек)	1349 – 1095,5	354 – 224,5	365,5 – 227,7
меньшие временные значения (14 человек)	986 – 782,5	219 – 132	208 – 137,5

Полученные нами корреляции могут быть обусловлены разной значимостью для испытуемых «стартового» сигнала в период его ожидания, индивидуальными особенностями формирования программы подготовки к реализации заданного движения. Для большей части испытуемых (70%) отмечалась стабильность значений исследуемых временных параметров. По-видимому, это объясняется тем, что простое и многократно повторяющееся движение (ритмичное сжатие эспандера) становится «привычным» мономорфным действием и обеспечивается достаточной стабильностью процесса формирования моторной программы и активацией определенных структурно-функциональными связями мозга участвующих в его реализации.

При воображаемом движении (серия 2) отмечено формирование МНП в лобной и центральной областях мозга с меньшей длительностью и преобладанием по амплитуде в полушарии ипсилатеральном по отношению к «работающей» руке, в отдельных наблюдениях – в лобно-сагиттальном отведении. Негативное отклонение медленного потенциала начиналось после звукового сигнала с некоторым интервалом (T2), который, по-видимому, можно рассматривать как электрографический эквивалент времени реакции. Интервал T2 имел достаточно большой разброс временных значений (118,4 – 1362,7 мс), длительность МНП также определялась в широком временном диапазоне (118,4 – 1362,7 мс).

По результатам опроса испытуемых о тактике мысленного представления движения была выделена группа 1 из 14 человек, у которых достаточно отчетливо формировался образ реализуемого движения на основе сочетания в разных вариантах ощущений нескольких модальностей (кинестетической, тактильной, зрительной) и вербальной команды. В отдельных случаях (4 человека) отмечалось появление после «стартового» сигнала низкоамплитудной ЭМГ-активности – включение моторного компонента.

В отчетах четырех испытуемых было отмечено, что воображаемое движение сопровождалось кинестетическими ощущениями или зрительным представлением «совершаемого движения», однако, нечетко выраженными. Еще два человека затруднились дать отчет о том, были ли у них в процессе представления движения какие-либо ощущения. Эти 6 испытуемых были объединены в общую группу 2 на основании того, что у них отсутствовал четкий образ воображаемого движения.

При сопоставлении длительности интервала T2 с временными и амплитудными параметрами МНП полученными в группе 1 и в группе 2 выявлялись определенные корреляции: меньшая длительность интервала T2 (короткое время реакции) сочеталась с меньшей длительностью МНП при больших значениях его амплитуды.

**Таблица 3.** Сопоставление длительности и амплитуды МНП с временными значениями интервала (T2) от звукового сигнала до момента нарастания восходящего фронта потенциала.

	длительность МНП (мс)	амплитуда МНП (мкВ)	длительность интервала T2 (мс)
1-я группа испытуемых (14 человек)	742,4 – 1386,8	6,2 – 19,4	118,4 – 712,6
2-я группа испытуемых (6 человек)	1426,4 – 1896,7	1,6 – 4,2	924,6 – 1362,7



Широкий диапазон значений исследуемых временных параметров (длительность МНП и интервала T2) в обеих группах испытуемых, по-видимому, является свидетельством того, что тактика представления и четкость формирования образа движения отличаются разнообразием у разных испытуемых, основываясь на активации ощущений разных модальностей, в отдельных случаях в качестве дополнительного фактора «включалась» вербальная команда и моторный компонент и, следовательно, процесс воображения движения реализуется активацией большего количества разнообразных структурно-функциональных связей мозга.

Для оценки пространственной представленности максимума активности по областям головного мозга в процессе выполнения реальной двигательной задачи и при воображаемом движении проводилось топографическое картирование полной мощности МНП в пределах исследуемого временного интервала. Полная мощность МНП является обобщенной амплитудной характеристикой, представляющей собой средний квадрат амплитуды ответа на заданном временном отрезке и численно равной суммарной мощности по всем представленным в ответе частотным диапазонам. Для оценки мощности сигнала использовалось быстрое преобразование Фурье, реализованное в программе «МБН-Нейрокартограф», суммировалась мощность в полосе 1-35 Гц, усредняясь делением на ширину полосы.

При топографическом картировании МНП получены карты полной мощности индивидуально для каждого испытуемого при реально выполняемом и воображаемом движении. Отмечалась разная степень выраженности максимальной мощности МНП у разных испытуемых, однако, представленность по отведениям у большинства испытуемых была идентичной. Примеры карт полной мощности МНП представлены на рисунке 1.

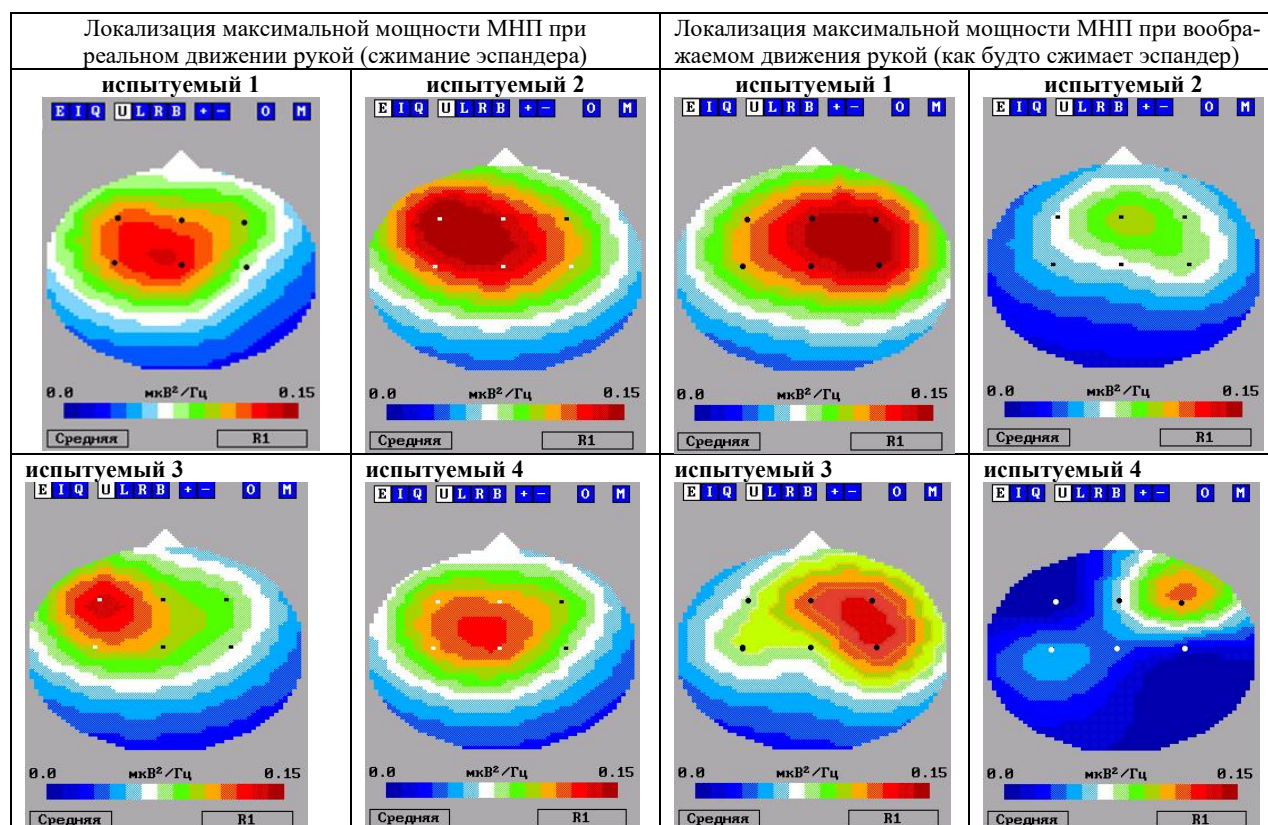


Рисунок. 1. Примеры карт полной мощности медленного негативного потенциала (МНП) при реально совершаемом движении рукой (сжатие эспандера) и при воображаемом движении рукой (как будто сжимает эспандер). Топографическое картирование по программе «МБН-Нейрокартограф», цветовая шкала внизу каждой карты – мощностные параметры активности: синий цвет – отсутствие активности, красный цвет – максимальная мощность активности.

При реально выполняемом движении максимальная мощность МНП определялась в полушарии контралатеральной по отношению к «работающей» руке в отведениях: центральном (преимущественно) – в проекции сенсомоторной коры, в лобном и лобно-

сагиттальном.

При воображаемом движении - в лобном и лобно-сагиттальном отведениях ипсилатерального полушария. При «включении» моторного компонента (появление ЭМГ-активности) отмечается зона активации в центральном отведении контралатерального полушария (на рисунке 1 испытуемый 3 и испытуемый 4).

Результаты топографического картирования мощности МНП при реально выполняемом и воображаемом движении согласуются с литературными данными, полученными на основе анализа ЭЭГ и фМРТ-ответов мозга здорового человека при выполнении и представлении двигательных нагрузок [7] и при сопоставлении фМРТ-реакций мозга при активных и воображаемых движениях рукой [8]. Результаты фМРТ исследования показана активация значительно большего количества и вариабельность локализации корковых зон при воображаемых движениях.

### **Заключение**

В результате проведенного исследования показано, что МНП регистрирующийся при выполнении двигательной задачи по «стартовому» (звуковом) сигналу, является электрографическим коррелятом моторной программы. Начало формирования медленного потенциала предшествует звуковому сигналу, что свидетельствует о подготовке к реализации движения в период ожидания внешнего стимула. Выявленные корреляции амплитудно-временных параметров МНП и временных значений интервала между началом медленного потенциала и звуковым сигналом, по-видимому, обусловлены индивидуальными особенностями формирования программы подготовки к реализации заданного движения. Отмечается преобладание по амплитуде и меньшая длительность МНП в полушарии контралатеральном по отношению к «работающей» руке, в основном в центральном отведении, что совпадает с данными топографического картирования - максимальные значения мощности МНП определяются в проекции сенсомоторной коры и в лобной области полушария контралатерального по отношению к «работающей» руке, а также в лобно-сагиттальной области. Отмеченная в подавляющем большинстве наблюдений стабильность значений исследуемых временных параметров свидетельствует о том, что подготовка к реализации простого многократно повторяющегося движения (ритмичное сжатие эспандера) обеспечивается достаточной стабильностью процесса формирования моторной программы с активацией лишь определенных структурно-функциональными связями мозга.

При воображаемом движении после «стартового» (звукового) сигнала отмечено появление МНП, который является электрографическим эквивалентом подготовки к «реализации» представляемого движения (без моторного компонента). Показано, что временные параметры МНП коррелируют с длительностью интервала от звукового сигнала до начала негативного отклонения медленного потенциала, который, по-видимому, можно рассматривать как электрографический эквивалент времени реакции. Также выявляется корреляция амплитудно-временные параметры МНП с тактикой воображения движения и четкостью формирования образа движения на основе активации ощущений разных модальностей, а в качестве дополнительного фактора, способствующего четкости образа воображаемого движения можно рассматривать появление ЭМГ-активности. Меньшая длительность и преобладание по амплитуде МНП выявляется в лобной и центральной областях полушария ипсилатерального по отношению к «работающей» руке, в отдельных наблюдениях в лобно-сагиттальном отведении. Это совпадает с локализацией максимальной мощности потенциала по данным топографического картирования, а появление ЭМГ-активности при «реализации» воображаемого движения сопровождается зоной активации в сенсомоторной области контралатерального полушария. Можно полагать, что процесс воображения движения сопровождается активацией большего числа различных структурно-функциональных связей мозга, включая активацию структур контралатерального полушария .

*Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ 19-29-01002 мк.*



## Список литературы

1. Кирой В. Н., Владимирский Б. М., Асланян Е. В., Бахтин О. М., Миняева Н. Р. Электрографические корреляты реальных и мысленных движений: спектральный анализ // *Ж. Высшей нервной деятельности*, 2010, т.60, №5, с. 525–533
2. Lew E., Chavarriaga R., Silvoni S., Millán J. del R. Detection of self-paced reaching movement intention from EEG signals. *Frontiers in Neuroengineering*. 2012. vol. 5. no.13. P.1-17. DOI: 10.3389/fnint.2012.00059.
3. Асланян Е. В., Кирой В. Н., Лазуренко Д. М., Бахтин О. М., Миняева Н. Р. Спектральные характеристики ЭЭГ в динамике произвольной двигательной активности // *Журнал высшей нервной деятельности*. 2014. Т. 64. №2. С.147–158. DOI: 10.7868/S0044467714020038.
4. Paek A.Y., Agashe H.F., Contreras-Vidal J.L. Decoding repetitive finger movements with brain activity acquired via non-invasive electroencephalography // *Frontiers in Neuroengineering*, 2014. 7:3. DOI:10.3389/fneng.2014.00003
5. Васильев А.Н., Либукрина С.П., Калан А.Я. Латерализация паттернов ЭЭГ у человека при представлении движения руками в интерфейсе мозг-компьютер // *Ж. Высшей нервной деятельности*. 2016. Т.66. №3. С. 302-312
6. Berman V. D., Horovitz S. G., Venkataraman G., Hallett M. Selfmodulation of primary motor cortex activity with motor and motor imagery tasks using real-time fMRI-based neurofeedback. *Neuroimage*. 2012. 59(2): 917–925.
7. Болдырева Г.Н., Шарова Е.В., Жаворонкова Л.А., Челябинка М.В., Дубровская Л.П., Смирнова О.А., Фадеева Л.М., Пронин И.Н., Корниенко В.Н. Структурно-функциональные особенности мозга при выполнении и представлении двигательных нагрузок у здоровых людей (ЭЭГ и фМРТ исследования) // *Ж. Физиология высшей нервной (психической) деятельности человека*. 2013. Т.63. №3. С. 316-327
8. Болдырева Г.Н., Шарова Е.В., Жаворонкова Л.А., Челябинка М.В., Дубровская Л.П., Смирнов А.С., Трошина Е.М., Пронин И.Н., Корниенко В.Н. Сопоставление фМРТ-реакций мозга здоровых людей при активных, пассивных и воображаемых движениях рукой // *Ж. Медицинская визуализация*. 2015. №5. С. 100-112
9. Хорева В.С., Максименко В.А., Пищик Е.Н., Руннова А.Е., Куркин С.А., Храмов А.Е. Анализ двигательной активности с использованием сигналов электромиограмм // *Информационно управляющие системы*. 2019. №3. С. 114-120. DOI: 10.31799/1684-8853-2019-3-114-120.
10. Иванова М. П. Кортиковые механизмы произвольных движений у человека. Отделение физиологии, ВНИИ физической культуры. Наука. 1991. 189 с.
11. Shibasaki H., Hallett M. What is the Bereitschaftspotential? *Clinical Neurophysiology*. 2006. vol. 117. P. 2341–2356. DOI: 10.1016/j.clinph.2006.04.025
12. Savić A., Lontis R., Jiang N., Popović M., Farina D., Dremstrup K., Mrachacz-Kersting N. Movement related cortical potentials and sensory motor rhythms during self initiated and cued movements. *Replace, Repair, Restore, Relieve—Bridging Clinical and Engineering Solutions in Neurorehabilitation*. – Springer International Publishing. 2014. P. 701–707. DOI: 10.1007/978-3-319-08072-7\_98
13. Brunia C.H.M., van Boxtel G.J.M., Bocker K.B.E. Negative slow waves as indices of anticipation: the Bereitschaftspotential, the Contingent negative variation, and the stimulus-preceding negativity. *The Oxford Handbook of Event-Related Potential Components*. Oxford Library of Psychology. Steven J. Luck, Emily S. Kappenman. Oxford University Press, 2011. P. 189–208. DOI:10.1093/oxfordhb/9780195374148.013.0108
14. Лазуренко Д.М., Кирой В.Н., Асланян Е.В., Шепелев И.Е., Бахтин О.М., Миняева Н.Р. Электрографические характеристики связанных с движением потенциалов // *Журнал высшей нервной деятельности*. 2017. 67. №4. С. 430-444 DOI: 10.7868/S0044467717040050
15. Трошина Е.М., Сазонова О.Б., Кроткова О.А., Шарова Е.В., Каверина М.Ю., Болдырева Г.Н., Жаворонкова Л.А. Связанные с движением потенциалы мозга человека как электрографический коррелят подготовки и реализации произвольного

двигательного акта // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2020. №5. С. 57-62. DOI: 10.17513/mjprfi.13068

16. Трошина Е.М., Сазонова О.Б., Кроткова О.А., Шарова Е.В., Каверна М.Ю., Суханова А.В. Исследование медленных преддвигательных потенциалов мозга человека (модификация методики регистрации потенциала готовности) // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2021. №10. С. 61-66. DOI:10.17513/mjprfi.13293
17. Трошина Е.М., Машеров Е.Л., Сазонова О.Б., Кулева А.Ю., Каверина М.Ю., Кроткова О.А., Шарова Е.В. Анализ изменений нейрофизиологических показателей, сопутствующих мысленному представлению движения // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*, 2022, №4, с.10-17, DOI: 10.17513/mjprfi.13372

**Сведения об авторах**

**Елена Михайловна Трошина,**

к.б.н., заведующий лабораторией

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко»

Минздрава России

Москва, Россия

**E-mail:** ETroshina@nsi.ru

**Ольга Борисовна Сазонова,**

к.м.н. в.н.с., доцент

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко»

Минздрава России

Москва, Россия,

**E-mail:** OSazonova@nsi.ru

**Евгений Леонидович Машеров,**

к.т.н., с.н.с.

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии

имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России

Москва, Россия

**E-mail:** EMasherow@nsi.ru

**Ольга Андреевна Кроткова,**

к.психол.н., с.н.с.<sup>1</sup>

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии

имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России

Москва, Россия

**E-mail:** OKrotkova@nsi.ru

**Мария Юрьевна Каверина,**

м.н.с

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии

имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России

Москва, Россия

**E-mail:** MKaverina@nsi.ru

**Арина Юрьевна Кулева,**

аспирант

ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Москва, Россия

**E-mail:** kylaria@mail.ru

**Анастасия Владимировна Суханова,**

медицинский психолог

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии

имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России

Москва, Россия

**E-mail:** nastya-kvardakova@mail.ru

**Information about authors**

**Elena Mikhailovna Troshina,**

Ph.D., Head Dep. Clinical Neurophysiology

Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of

Healthcare of the Russian Federation,

Moscow, Russia

**E-mail:** ETroshina@nsi.ru

**Olga Borisovna Sazonova,**

PhD, Leading Researcher, Associate Professor

Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery, Ministry of

Healthcare of the Russian Federation,

Moscow, Russia,

**E-mail:** OSazonova@nsi.ru

**Evgeny Leonidovich Masherov,**

PhD,

Senior Research Scientist,

Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery

Moscow, Russia

**E-mail:** EMasherow@nsi.ru

**Olga Andreevna Krotkova,**

PhD,

Senior Research Scientist,

Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery

Moscow, Russia

**E-mail:** OKrotkova@nsi.ru

**Maria Yurievna Kaverina,**

Research Scientist,

Burdenko National

Medical Research Center of Neurosurgery

Moscow, Russia

**E-mail:** MKaverina@nsi.ru

**Arina Yurievna Kuleva,**

Postgraduate,

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology

Moscow, Russia

**E-mail:** kylaria@mail.ru

**Anastasia Vladimirovna Sukhanova,**

Medical Psychologist,

Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery

Moscow, Russia

**E-mail:** nastya-kvardakova@mail.ru

УДК 616.858-008.6  
ГРНТИ 76.29.51  
DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.383-384

Н. Д. Чанов, И. С. Антонов, А. В. Ли  
Сибирский государственный медицинский университет

## **СРАВНЕНИЕ АМПЛИТУДЫ ТРЕМОРА У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА**

*В данной статье проводится сравнительная характеристика тремора, как моторного симптома при Болезни Паркинсона, у пациентов разных полов с помощью неинвазивного прибора, что позволяет объективно оценить амплитуду тремора и определить наличие статистически значимой разницы между полами.*

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, тремор, половые различия.

N. D. Chanov, I. S. Antonov, A. V. Li  
The Siberian State Medical University

## **COMPARISON OF TREMOR AMPLITUDE IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE BY SEX**

*In this article, a comparative characterization of tremor as a motor symptom in Parkinson's Disease is carried out in patients of different sexes using a non-invasive device, which allows you to objectively assess the amplitude of tremor and determine the presence of a statistically significant difference between the sexes.*

**Keywords:** Parkinson's disease, tremors, sex differences.

### **Введение**

Тремор является симптомом многих заболеваний нервной системы и в среднем встречается с одинаковой частотой у людей обоих полов. Будучи проявлением в нарушении моторной функции, тремор влияет на качество жизни пациента, включая самообслуживание и социальную адаптацию. Согласно литературным данным, болезнь Паркинсона (как одна из частых причин тремора рук) несколько чаще встречается у мужчин. В связи с этим, остается неясным, каковы особенности тремора у пациентов разных полов.

### **Цель работы**

Определить наличие и величину разницы в амплитуде тремора между пациентами обоих полов.

**Материалы и методы** Для измерения и последующего сравнения амплитуд тремора у разных пациентов нами было использовано неинвазивное устройство, созданное Будановым В.М. в МГУ имени М.В. Ломоносова (Научно-исследовательский институт механики, Россия), с участием 16 пациентов с болезнью Паркинсона, средний возраст составил 66,3 [26;80] лет. Из них 9 женщин, 7 - мужчин. Все пациенты были информированы о методе проведения исследования и добровольно подписали информированное согласие в письменном виде согласно протоколу научно-исследовательской работы «Диагностика, лечение и реабилитация пациентов с нейродегенеративными заболеваниями», проводимой на кафедре неврологии и нейрохирургии ФГБОУ ВО СибГМУ (Томск). Методика проведения исследования прибором заключалась в том, что мы укладывали неинвазивный прибор на дистальной фаланге указательного пальца для измерения тремора сидя, в покое, и определяли среднюю величину амплитуды тремора, которая была измерена в условных единицах (у.е.), заданных программой данного устройства. Полученные результаты рассматривали с учетом пола пациента. Анализ проводился с использованием программы для статистической обработки Jamovi.

### **Полученные результаты**

Статистическая обработка данных показала, что медианное значение амплитуды тремора среди женщин составило 46 у.е. (SD=37). Медианное значение амплитуды

тремора среди мужчин составило 25,0 у.е. (SD=36,8). Был проведен анализ гипотезы о том, что уровень амплитуды между двумя группами пациентов отличается с использованием U-критерия Манна-Уитни,  $U=26,0$  у.е., ( $p=0,595$ ).

### Выводы

Согласно анализу данных, полученных с использованием неинвазивного устройства для измерения тремора, статистически значимой разницы в величине амплитуды тремора среди данной выборки нет.

### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: инструментально подтвержденное отсутствие отличия амплитуды тремора у пациентов с болезнью Паркинсона различных полов, не смотря на более частое развитие БП у мужчин.

### Список литературы

1. Zagni, E., Simoni, L., & Colombo, D. Sex and Gender Differences in Central Nervous System-Related Disorders. // *Neuroscience Journal*. 2016. V. 2016. P. 1–13.
2. Fullard, M. E., Thibault, D. P., Todaro, V., Foster, S., Katz, L., Morgan, R., Kern, D. S., Schwalb, J. M., Urrea Mendoza, E., Dahodwala, N., Shulman, L., & Willis, A. W. Sex disparities in health and health care utilization after Parkinson diagnosis: Rethinking PD associated disability. // *Parkinsonism and Related Disorders*. 2018. No. 48. P. 45–50.
3. Hallett M. Parkinson's disease tremor: pathophysiology. // *Parkinsonism Relat Disord*. 2012. No. 18 (1). P. 85-86.

#### Сведения об авторах

**Никита Дмитриевич Чанов,**

студент

Сибирский государственный медицинский университет  
Томск, Россия

E-mail: antiarahis@gmail.com

**Иван Сергеевич Антонов,**

студент

Сибирский государственный медицинский университет  
Томск, Россия

E-mail: ant97\_12@mail.ru

**Александра Владимировна Ли,**

студент

Сибирский государственный медицинский университет  
Томск, Россия

E-mail: alexlili0902@gmail.com

#### Information about authors

**Nikita Dmitrievich Chanov,**

student,

The Siberian State Medical University  
Tomsk, Russia

E-mail: antiarahis@gmail.com

**Ivan Sergeevich Antonov,**

student,

The Siberian State Medical University  
Tomsk, Russia

E-mail: ant97\_12@mail.ru

**Alexandra Vladimirovna Li,**

student,

The Siberian State Medical University  
Tomsk, Russia

E-mail: alexlili0902@gmail.com

УДК 576.385.3

ГРНТИ 34.19.27

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.384-389

В. И. Ковалев, Д. Ю. Жданова, Н. В. Бобкова,

А. В. Чаплыгина

ИБК РАН

### ВЛИЯНИЕ ВЕЩЕСТВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ТЕРМОЛИПОФУСЦИНА

В статье обсуждается один из пигментов старения и патологических процессов, в том числе и нейродегенеративных – липофусцин, а также модель для его ускоренного получения и способы деградации. Представлены оригинальные эксперименты по влиянию веществ разной химической природы на образование липофусцина из митохондрий печени крысы.

**Ключевые слова:** митохондрии, липофусцин, антиоксиданты, старение, флуоресценция.

**INFLUENCE OF SUBSTANCES ON FORMATION OF THERMOLIPOFUSCIN**

*The paper discusses one of the pigments of aging and pathological processes, including neurodegenerative ones - lipofuscin, as well as a model for its accelerated production and degradation methods. Original experiments on the effect of substances of different chemical nature on the formation of lipofuscin from rat liver mitochondria are presented.*

**Keywords:** mitochondria, lipofuscin, antioxidants, aging, fluorescence.

**Ведение**

Одним из маркеров старения считается накопление «внутриклеточного мусора» в виде гранул липофусцина (ЛФ), так называемого «пигмента старения» [1, с. 611-619]. Первое описание пигмента было дано очень давно, еще в 1842 году «жировые гранулы» обнаружили в перикарионе стареющих нейронов. Наиболее подверженными накоплению липофусцина являются долгоживущие неделяющиеся специализированные клетки: нейроны, кардиомиоциты и др. (нейролипофусцин, кардиолипофусцин и т.д.) [2, с. 265-276]. В результате чрезмерного накопления клеточных повреждений и внутриклеточного мусора при недостаточной активности лизосом и протеаз (а также при патологических процессах) именно митохондрии в первую очередь деградируют в гранулы липофусцина [3, с. 934-939]. В состав митолипофусцина, помимо денатурированных белков, могут входить окисленные липиды и другие вещества [4, с. 1122-1134].

Деградированные белки в ЛФ сшиты в виде оснований Шиффа как внутри-, так и межмолекулярными ковалентными связями. ЛФ устойчив к деградации протеолитическими клеточными системами. В качестве основной характеристикой ЛФ - является характерная полоса флуоресценции в районе 460 нм при возбуждении в ближнем УФ [3, с. 934-939].

Наиболее подвержен накоплению липофусцина именно мозг. Количество липофусцина также увеличивается при различных патологиях – болезнь Альцгеймера, Паркинсона, нейрональный цероидный липофусциноз, макулярная дегенерация и др. При этом количество липофусцина обратно пропорционально процессу нейрогенеза и может уменьшаться, например, при индуцируемом нейрогенезе в зубчатой фасции гиппокампа на фоне приема природного антиоксиданта гидрокситирозола [5, с. 4512-4526]; или увеличиваться при снижении нейрогенеза, вызванного ранней потерей зубов у мышей [6, с. 517-524]. Поиск веществ, способных различными способами уменьшать количество образующегося липофусцина – является важной практической и фундаментальной задачей.

Антиоксиданты могут остановить или замедлить образование липофусцина. Однако во многих случаях гранулы липофусцина стареющего организма занимают до 70% объема клетки, что приводит к недостаточности клеточных действий. В таких случаях необходимо удалить накопленный липофусцин из цитоплазмы.

**Цель работы**

Целью нашей работы является поиск веществ, способных разрушить или предотвратить образование термолипифусцина в модельной системе изолированных митохондриях.

**Материалы и методы**

*Уход за животными.*

Крысы Вистар (300–400 г) были получены из Питомника лабораторных животных Института биофизики клетки (г. Пущино).

*Выделение митохондрий печени крысы.*

Митохондрии из печени крысы выделяли в среде, содержащей 300 мМ NaCl (рН 7,5) при 2 °С по стандартной методике с некоторыми модификациями [3, с. 934-939].

Все митохондриальные фракции выравняли по содержанию белка инкубационным буфером (10 мМ Трис-фосфат, рН 7,3) до конечной концентрации 0,2 мг/мл. Концентрацию митохондриального белка определяли спектроскопическим методом.

#### *Термо - образование липофусцина.*

Для активации образования липофусцина в гомогенатах *in vitro* использовали продолжительный умеренный нагрев, в результате чего образовался термолипофусцин. Для этого гомогенаты, разведенные в 10 мМ Трис-фосфатном буфере (рН 7,3), помещали в стерильные герметичные пробирки и нагревали в течение 3 ч при 50°C в термощейкере ТС-100 ("Вектор Бест", Россия). Полученный липофусцин детектировали по появлению характерной полосы флуоресценции в области 460 нм с возбуждением на 360 нм. Интенсивность флуоресценции эндогенных пиридиновых нуклеотидов была пренебрежимо мала (поскольку они окислялись при замораживании-оттаивании митохондрий).

Разрушение полученных ЛФ тестируемыми соединениями регистрировали по исчезновению полосы флуоресценции при 460 нм. Все полученные образцы были обработаны SDS – детергентом, переводящим мутную митохондриальную взвесь в прозрачный раствор. Спектры флуоресценции всех образцов регистрировали на модернизированном спектрофлуориметре *Carry ECLIPSE* (США) при 20 °С.

#### *Анализ данных.*

Средние значения и стандартные отклонения были получены, по крайней мере, из трех партий митохондрий, выделенных из десяти разных крыс *Wistar*. Обработку данных проводили с помощью *Sigma Plot 12.5*. Значения в таблице усреднены по всем экспериментам. Для анализа достоверности наблюдаемых различий использовали непараметрические критерии Вилкоксона и Манна-Уитни. Статистически значимые различия считали при  $p < 0,05$ .

### **Полученные результаты**

Одним из важных свойств ЛФ является его интенсивная флуоресценция в синей области при возбуждении в ближней УФ области. В наших экспериментах мы наблюдали появление интенсивной флуоресценции ЛФ после длительного умеренного нагревания (3 часа при 50°C) суспензии митохондрий из печени крысы.

Температура 50°C комфортна и условна для ускорения колебаний в белках и липидах и для увеличения скорости всех реакций. Эта температура делает белки и липиды более доступными для окисления АФК. Важно, что 49°C всего лишь на 10 градусов выше нормальной температуры крысы. Повышение температуры до этого значения *in vitro* ускоряет процесс образования липофусцина. С другой стороны, эта температура не приводит к сильной денатурации и агрегации белков. Следует отметить, что небольшое количество ЛФ присутствует в митохондриях, выделенных от старых или немолодых крыс, даже до нагревания.

К суспензии митохондрий добавляли тестируемые вещества и инкубировали при 50 °С в течение 3 часов. В этих условиях в формирующихся ЛФ происходила частичная денатурация белков, их агрегация и ковалентное сшивание, в том числе по основаниям Шиффа. Во втором случае образцы нагревали при 50 °С в течение 3 часов, после нагрева к образцам добавляли испытуемые вещества, и образцы инкубировали в течение часа при комнатной температуре.

Проверялась эффективность некоторых веществ в отношении образования липофусцина. Эти вещества можно разделить на несколько групп: респираторные яды (азид натрия, ротенон), антиоксиданты (аскорбиновая кислота, хлорид железа ( $FeCl_3$ ), убихинон 2), прооксиданты (восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), окисленный глутатион), спирты (этанол, диметилэтанолламин (ДМАЭ)), энтеросорбенты (этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (ЭГТА) и этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)), а также глюкоза (основной энергетический субстрат) и L-аргинин (низкомолекулярный шаперон). Данные по всем веществам внесены в Таблицу 1.

В результате опытов было установлено, что респираторные яды усиливают образование липофусцина при добавлении их перед нагреванием. Ингибирование митохондриальной дыхательной цепи резко снижает образование электрохимического градиента на внутренней митохондриальной мембране. В результате происходит снижение продукции АТФ, так как в АТФ-синтазе отсутствуют протоны.

Процесс образования ЛФ зависит от перекисного окисления липидов и поэтому в принципе может быть остановлен антиоксидантами. Показано, что аскорбиновая кислота, выполняя биологические функции восстановителя и кофермента некоторых метаболических процессов, является антиоксидантом, обладает наибольшей анти-ЛФ активностью. Ингибирует образование ЛФ на 36% при инкубации в концентрации 100 мМ с суспензией митохондрий. В то же время концентрация аскорбиновой кислоты 5 мкМ была недостаточной для воздействия на образование липофусцина. FeCl<sub>3</sub> обладает сильными антиоксидантными свойствами, образуя перекись водорода из перекисных радикалов. Добавление FeCl<sub>3</sub> в концентрации 5 мкМ снижало образование липофусцина на 12%. Показано, что убихинон 2 оказывает слабое действие на снижение образования липофусцина (10% по сравнению с контролем).

Поддержание оптимального для клетки соотношения восстановленного глутатиона к окисленному - GSH/GSSG является важным условием ее жизнеспособности. Добавление окисленного глутатиона вызывает резкое увеличение образования липофусцина на 22% в первой и на 24% во второй группе. Интересным результатом является то, что добавление НАДН показало снижение количества липофусцина на 10% в первой группе и на 21% во второй группе относительно контроля.

Добавление этанола уменьшало количество липофусцина на 17%. Добавление диметиламиноэтанола снижало образование липофусцина на 24%. Молекулы спирта, адсорбируясь на гидрофобных участках белка, должны ослаблять гидрофобное взаимодействие.

Добавление в среду ЭГТА и ЭДТА уменьшало образование липофусцина на 13% и 24% соответственно. Эти вещества являются хелаторами ионов металлов, таких как Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> и др.

Низкомолекулярный шаперон L-аргинин может способствовать приобретению белками нативных структур, а также препятствовать агрегации денатурированных белковых молекул и накоплению агрегированных форм белков. Однако, L-аргинин увеличивал образование липофусцина на 26%.

Добавление глюкозы также увеличивало образование липофусцина (что коррелирует с ранним опытом использования сахарозы). 100 мМ глюкозы увеличивают образование липофусцина на 15%, а 10 мМ — на 13%.

*Таблица 1. Образование термолипофусцина (в %) в суспензии изолированных митохондрий при инкубации в течение 3 часов при 50 °С. За 100% взято количество липофусцина, которое образовалось без добавления веществ. \* - p<0,05*

	Вещество	До нагрева	После нагрева
1	натрий Азид 5 мкМ	111±4 *	98±5
2	Ротенон 5 мкМ	109±4 *	107±5
3	аскорбиновая кислота 100 мМ	64±5 *	108±5
4	FeCl <sub>3</sub> 5 мкМ	88±4 *	109±7
5	Глюкоза 100 мМ	115±10 *	103±6
6	Глюкоза 10 мМ	113±6 *	108±3
7	Глюкоза 1 мМ	109±2 *	105±6
8	L-аргинин 10 мМ	126±17 *	107±10

	Вещество	До нагрева	После нагрева
9	НАДН 5 мкМ	90±10 *	78±5 *
10	Окисленный глутатион 200 мкМ	122±13 *	124±12 *
11	Убихинон 2 5 мкМ	90±5 *	99±5
12	Этанол 5%	83±7 *	100±4
13	ДМАЭ 5%	76±6 *	107±7
14	ЭГТА 30 мкМ	87±10 *	104±6
15	ЭДТА 30 мкМ	76±9 *	108±10

### Выводы

Таким образом, предлагаемый метод позволяет получить термо-ЛФ в суспензии митохондрий при длительном умеренном нагревании и испытать ряд соединений в качестве активаторов, ингибиторов и расщепителей этого ЛФ. Это создает возможность изучения механизмов действия антиоксидантов и восстановителей, связанных с профилактикой образования ЛФ. Кроме того, этот метод быстро позволяет найти подходящую концентрацию агента в экспериментальных условиях. Очень важным остается исследовать влияние различных активных веществ на процесс прямого (неферментативного) расщепления ЛФ *in vitro*.

### Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: разработана удачная простая модель ускоренного накопления липофусцина, которую можно использовать для скрининга веществ, влияющих на данный «пигмент старения»; показано положительное влияние различных веществ в качестве профилактики уменьшения уровня липофусцина в данной модели, наибольшую эффективность показала аскорбиновая кислота, неожиданным фактом стала способность НАДН не только предотвращать накопление пигмента, но и разрушать уже образованный липофусцин.

*Исследование было поддержано Российским Научным Фондом (№ 18-15-00392).*

### Список литературы

1. Brunk U.T., Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. // *Free Radic. Biol. Med. United States*, 2002. Vol. 33, № 5. P. 611–619.
2. Terman A., Brunk U.T. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. // *APMIS. Denmark*, 1998. Vol. 106, № 2. P. 265–276.
3. Frolova M.S. et al. Degradation of mitochondria to lipofuscin upon heating and illumination // *Biophysics (Oxf)*. 2015. Vol. 60, № 6. P. 934–939.
4. Warburton S. et al. Examining the proteins of functional retinal lipofuscin using proteomic analysis as a guide for understanding its origin. // *Mol. Vis. United States*, 2005. Vol. 11. P. 1122–1134.
5. D'Andrea G. et al. Hydroxytyrosol stimulates neurogenesis in aged dentate gyrus by enhancing stem and progenitor cell proliferation and neuron survival. // *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. United States*, 2020. Vol. 34, № 3. P. 4512–4526.
6. Katano M. et al. Tooth loss early in life induces hippocampal morphology remodeling in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. // *Int. J. Med. Sci.* 2020. Vol. 17, № 4. P. 517–524.



**Сведения об авторах**

**Владимир Игоревич Ковалев**

*мл. науч. сотр.,*

ИБК РАН

Москва, Россия

*E-mail: ladiko@post.com*

**Дарья Юрьевна Жданова,**

*мл. науч. сотр.,*

ИБК РАН

Москва, Россия

*E-mail: darya.zhdanova.1991@mail.ru*

**Наталья Викторовна Бобкова,**

*к.б.н., заведующий лаборатории клеточных механизмов патологии памяти,*

ИБК РАН

Москва, Россия

*E-mail: nbobkova@mail.ru*

**Алина Вадимовна Чаплыгина,**

*мл. науч. сотр.,*

ИБК РАН

Москва, Россия

*E-mail: shadowhao@yandex.ru*

**Information about authors**

**Vladimir Igorevich Kovalev,**

*junior scientific collaborator,*

ICB RAS

Moscow, Russia

*Email: ladiko@post.com*

**Daria Yurievna Zhdanova,**

*junior scientific collaborator,*

ICB RAS

Moscow, Russia

*E-mail: darya.zhdanova.1991@mail.ru*

**Natalya Viktorovna Bobkova,**

*Ph.D., Head of the Laboratory of Cellular Mechanisms of Memory Pathology,*

ICB RAS

Moscow, Russia

*E-mail: nbobkova@mail.ru*

**Alina Vadimovna Chaplygina,**

*junior scientific collaborator,*

ICB RAS

Moscow, Russia

*E-mail: shadowhao@yandex.ru*

УДК 576.385.3

ГРНТИ 34.19.27

DOI 10.47501/978-5-6044060-2-1.389-393

**А. В. Чаплыгина В. И. Ковалев, Д. Ю. Жданова,  
Н. В. Бобкова,**

Институт биофизики клетки Российской академии наук –  
обособленное подразделение Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки «Федеральный  
исследовательский центр  
«Пушкинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук»

**ХИМИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ СТАРЫХ ПЕРВИЧНЫХ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КУЛЬТУР**

*В статье обсуждается использование прямой химической трансформации глиальных клеток в нейроны для решения проблем нейродегенеративных заболеваний. Представлены оригинальные экспериментальные данные по успешному применению конверсионного коктейля для астроцит-нейрональной конверсии в первичной клеточной культуре гиппокампа мышей 5xFAD.*

**Ключевые слова:** *болезнь Альцгеймера, 5XFAD, астроцитарная конверсия, конверсионный коктейль.*

**A. V. Chaplygina V. I. Kovalev, D. Y. Zhdanova, N. V. Bobkova,**  
ICB RAS

**CHEMICAL CONVERSION OF PRIMARY NEURONAL CULTURES**

*The paper discusses the use of direct chemical transformation of glial cells into neurons to solve the problems of neurodegenerative diseases. Original experimental data on the successful use of a conversion cocktail for astrocyte-neuronal conversion in a primary cell culture of the 5xFAD mouse hippocampus are presented.*

**Keywords:** *Alzheimer's disease, 5XFAD, astrocytic conversion, conversion cocktail.*

**Введение.**

Главной причиной нейродегенеративных заболеваний считается гибель нейронов, поэтому основное внимание исследователей, как правило, уделяется поиску причин потери клеток и способам предотвращения их утраты. К сожалению, таргетная антиамилоидная терапия на клинической стадии заболевания, когда уже погибли многие

нейроны, не дает позитивных результатов, поскольку не влияет на восстановление нейрональной плотности. В последнее время для восстановления функций мозга рассматривается подход заместительной клеточной терапии с использованием эндогенных источников клеток. Он заключается в использовании эндогенных клеток глии для замены нейронов и состоит в прямом преобразовании не-нейрональных клеток в нейрональные, путем введения различных нейрогенных факторов. Прямое преобразование глиальных клеток в нейроны внутри головного или спинного мозга без трансплантации клеток позволяет избежать проблем образования опухолей, aberrантной дифференцировки и иммунологического отторжения, которые часто связаны с трансплантацией стволовых клеток [1, с. 728–738].

Большинство экспериментов по перепрограммированию реактивных астроцитов в функциональные нейроны проводятся с помощью экспрессии нейрального фактора транскрипции, NEUROD1, или других факторов транскрипции, таких как нейрогенин 2 (NGN2), ASCL1 и SOX2, которые способны перепрограммировать глиальные клетки в нейроны как *in vitro*, так и *in vivo* [2, с. 225; 3; 4, с. 188–202]. Данные исследования конверсии глии в нейроны проводятся с помощью вирус-опосредованной экспрессии факторов транскрипции, которая требует использования вирусов и сложных внутримозговых или внутриспинальных инъекций. Поэтому особый интерес представляет перепрограммирование малыми молекулами или химическое перепрограммирование, позволяющее осуществлять превращение клеток без вирусов. На данный момент существуют химические конверсионные коктейли, состоящие из нескольких веществ, необходимых для превращения астроцитов в нейроны [5, с. 735–747; 6, с. 488–501]. Потенциально таким образом полученные нейроны способны интегрироваться в функциональные цепи вместо дегенерированных нейронов при патологиях.

#### **Цель работы.**

Наше исследование посвящено изучению прямой химической конверсии первичных нейрональных культур трансгенных 5XFAD мышей при помощи химического коктейля, состоящего из молекул DAPT, CHIR99021, SB431542 и LDN193189, которые способны стимулировать эндогенный нейрогенез и астроглиальную нейрональную конверсию в модели нейродегенерации альцгеймерского типа.

#### **Материалы и методы.**

Работа проводилась на первичной клеточной культуре гиппокампа трансгенных мышей линии 5XFAD. Трансгенные животные линии 5XFAD (Tg) характеризуются ранним выраженным амилоидогенезом в головном мозге, поскольку в своем геноме несут шведскую (K670N/M671L), флоридскую (I716V) и лондонскую (V717I) мутации белка предшественника бета-амилоида APP человека APP (695), а также M146L и L286V мутации в гене пресенилина 1. После генотипирования и формирования групп 5XFAD животных для разведения, осуществляли генотипирование мышат (возрастом 0-1 день) для дальнейшего получения первичной культуры клеток гиппокампа Tg мышей стандартным методом.

Способности клеток к дифференцировке исследовали с применением химического «конверсионного коктейля», содержащего SB431542 – блокатор TGF- $\beta$  рецепторов; LDN193189 – блокатор BMP рецепторов; CHIR99021 – блокатор GSK3; DAPT – ингибитор  $\gamma$ -секретазы, тормозящий Notch-сигнальный путь. Концентрация соединений, входящих в состав конверсионного коктейля, в лунках на протяжении всего эксперимента составляла SB431542 (5  $\mu$ M), LDN193189 (0,25  $\mu$ M), CHIR99021 (1,5  $\mu$ M) и DAPT (5  $\mu$ M). Данные соединения вносили в культуральную среду согласно существующему протоколу [6, с. 488–501].

По окончании экспериментов клеточные культуры фиксировали в течение 10 минут 4% параформальдегидом. Затем увеличивали проницаемость мембран с помощью 0,2% раствора Triton X-100 и в течение часа при комнатной температуре блокировали неспецифическое связывание с антигенами в растворе PBST (PBS+0.1% Tween 20) + 1% BSA с применением 10% сыворотки осла нормализованной (Abscam, ab7475) и 5% сыворотки козла нормализованной (Invitrogen, 31872). Культуры оставляли на ночь при

4°C для инкубирования с первичными антителами Anti-MAP2 antibody – маркерами нейронов (Abcam, ab32454, 1:100), и Anti-GFAP antibody - маркерами астроцитов (Abcam, ab4674, 1:1000). После инкубации окрашивали вторичными антителами с флуоресцентными метками: AlexaFluor 594 (Abcam, ab150076, 1:200), AlexaFluor 488 (Abcam, ab150169, 1:2000), в течение 2 часов при комнатной температуре.

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения *Sigma Plot 12.5*. Статистическая обработка данных проведена с оценкой достоверности по двухстороннему t- критерию Стьюдента, а также с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

### Полученные результаты

Следует отметить, что основные работы по перепрограммированию клеток успешно проводились другими исследователями на более простых моделях содержащих культуру чистых изолированных астроцитов [6], и менее успешно при экспериментах *in vivo*, когда химический коктейль вводится напрямую в мозг мышей. В нашем исследовании также было отмечено, что химическая конверсия, применяемая при перепрограммировании астроцитарной культуры не дает позитивных результатов на смешанных первичных культурах, содержащих как астроциты, так и нейроны. Ранние наши эксперименты были посвящены химической конверсии первичных культур, находящихся на более ранних стадиях жизни (2-3 недели) и потерпели неудачу. Только когда мы стали использовать куда более старые культуры (6 недель), характеризующиеся, как известно, выраженным увеличением астроцитарной плотности, нам удалось подобрать условия, при которых возможна прямая химическая конверсия глиальных клеток в нейроны. Результаты экспериментов представлены на рис. 1, на котором даны репрезентативные микрофотографии иммунопозитивности к GFAP и MAP2 в старой трансгенной культуре до (А) и через 12 часов после введения в среду их культивирования «конверсионного коктейля» (Б).

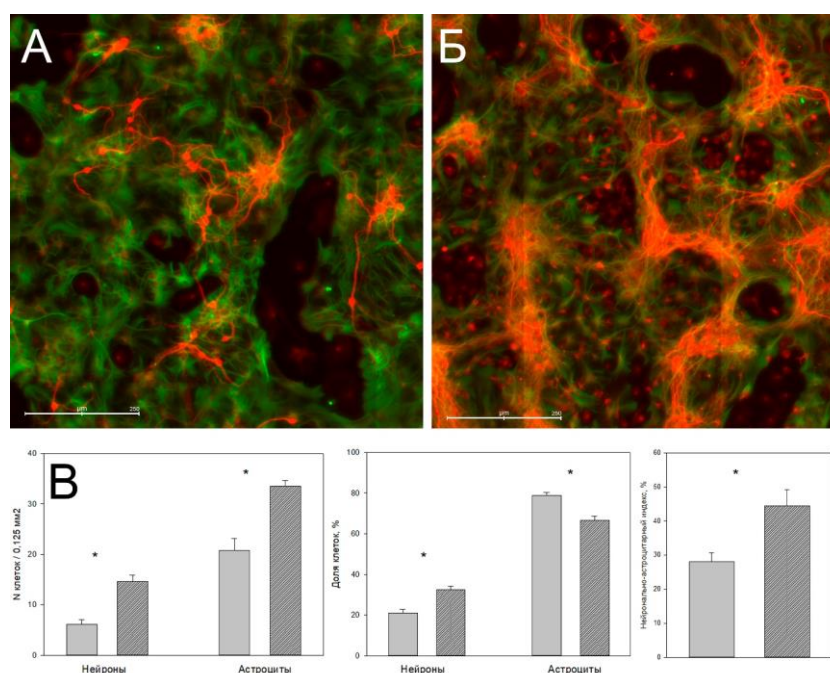


Рис. 1. Конверсионный коктейль увеличивает нейрональную плотность в старой трансгенной культуре (6 недель) при краткосрочном введении (12 часов).

Панорамный снимок трансгенной культуры. Зеленым – астроциты, красным – нейроны. Шкала – 250μm. А – трансгенная культура до введения коктейля. Б – трансгенная культура через 12 часов.

В – Увеличение количества нейронов, астроцитов и общего количества клеток в культуре под действием конверсионного коктейля. Увеличение нейрональной плотности под действием конверсионного коктейля. Увеличение нейронально-астроцитарного индекса (отношение нейронов к астроцитам) под действием коктейля.

Видно отчетливое возрастание иммунореактивности к нейрональному маркеру в трансгенной культуре. Статистический анализ полученных данных подсчета

нейрональной и астроцитарной плотностей, процентной доли нейронов и астроцитов, а также нейроастроцитарного индекса до и после воздействия «коктейля» представлены на рис. 1В. Под влиянием конверсионного коктейля достоверно возростали и нейро-нальная, и астроцитарная плотности, однако, если до воздействия коктейлем соотношение долей нейронов и астроцитов составляло  $21,1 \pm 1,6\%$  и  $78,8 \pm 1,6\%$  соответственно, то после воздействия коктейля это соотношение стало  $32,49 \pm 1,7\%$  и  $66,5 \pm 2,1\%$ , соответственно. Отмечен достоверный рост нейро-астроцитарного индекса, и мы с уверенностью можем утверждать, что это произошло за счет трансформации астроцитов в нейроны.

### Выводы

Химическая экзогенная трансформация, успешно применяющаяся на ряде моделей, при попытках перейти к более сложным моделям может потерпеть неудачу. При этом разработанный конверсионный коктейль из четырёх небольших молекул показал эффективность по перепрограммированию астроцитов в нейроны на первичной культуре гиппокампа мышей 5xFAD только в условиях старой (6 недель) культуры с повышенной астроцитарной плотностью. У молодых культур (2-3 недели) конверсионный коктейль активность не показал. Таким образом, в условиях более сложных моделей важным моментом является подбор условий для успешного использования конверсионного коктейля.

### Заключение

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

Впервые была проведена прямая трансформация астроцитов в нейроны с использованием конверсионного коктейля, содержащего четыре простых химических молекулы на первичной культуре гиппокампа мышей 5xFAD (модели болезни Альцгеймера). Важным фактором успешной трансформации глиальных клеток стал возраст первичной культуры. Конверсионный коктейль увеличивает нейрональную плотность только в старой трансгенной культуре.

*Исследование было поддержано Российским Научным Фондом (№ 18-15-00392).*

### Список литературы

1. Li H., Chen G. *In Vivo Reprogramming for CNS Repair: Regenerating Neurons from Endogenous Glial Cells // Neuron. 2016. Vol. 91, № 4. P. 728–738.*
2. Liu F. et al. *Neurog2 directly converts astrocytes into functional neurons in midbrain and spinal cord // Cell Death Dis. 2021. Vol. 12, № 3. P. 225.*
3. Heinrich C. et al. *Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. // PLoS Biol. 2010. Vol. 8, № 5. P. e1000373.*
4. Guo Z. et al. *In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. // Cell Stem Cell. 2014. Vol. 14, № 2. P. 188–202.*
5. Zhang L. et al. *Small Molecules Efficiently Reprogram Human Astroglial Cells into Functional Neurons. // Cell Stem Cell. 2015. Vol. 17, № 6. P. 735–747.*
6. Yin J.-C. et al. *Chemical Conversion of Human Fetal Astrocytes into Neurons through Modulation of Multiple Signaling Pathways. // Stem cell reports. 2019. Vol. 12, № 3. P. 488–501.*

### Сведения об авторах

**Алина Вадимовна Чаплыгина,**

мл. науч. сотр.,

ИБК РАН

Москва, Россия

**E-mail:** shadowhao@yandex.ru

**Владимир Игоревич Ковалев**

мл. науч. сотр.,

ИБК РАН

Москва, Россия

**E-mail:** ladiko@post.com

### Information about authors

**Alina Vadimovna Chaplygina,**

junior scientific collaborator,

ICB RAS

Moscow, Russia

**E-mail:** shadowhao@yandex.ru

**Vladimir Igorevich Kovalev,**

junior scientific collaborator,

ICB RAS

Moscow, Russia

**Email:** ladiko@post.com

**Дарья Юрьевна Жданова,**  
мл. науч. сотр.,  
ИБК РАН  
Москва, Россия  
**E-mail:** [darya.zhdanova.1991@mail.ru](mailto:darya.zhdanova.1991@mail.ru)

**Наталья Викторовна Бобкова,**  
к.б.н., заведующий лаборатории клеточных механизмов патологии памяти,  
ИБК РАН  
Москва, Россия  
**E-mail:** [nbobkova@mail.ru](mailto:nbobkova@mail.ru)

**Daria Yurievna Zhdanova,**  
junior scientific collaborator,  
ICB RAS  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [darya.zhdanova.1991@mail.ru](mailto:darya.zhdanova.1991@mail.ru)  
**Natalya Viktorovna Bobkova,**  
Ph.D., Head of the Laboratory of Cellular Mechanisms of Memory Pathology,  
ICB RAS  
Moscow, Russia  
**E-mail:** [nbobkova@mail.ru](mailto:nbobkova@mail.ru)