



**НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ, БИОЛОГИИ,
ФАРМАКОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ**

материалы Международной конференции

NT + M&Ec`2021

(Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2021 года)

ВЕСЕННЯЯ СЕССИЯ

ISBN 978-5-6044060-1-4



9 785604 406014

Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + M&Ec`2021 (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2021 г.). 2021. Весенняя сессия. 321 с.

ISBN 978-5-6044060-1-4

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, К.М. Резников, 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, В.М. Липкин, С.С. Обернихин, М.А. Рагульская, В.П. Реутов, К.М. Резников, О.Б. Сазонова, С.Н. Самсонов, Е.М. Трошина, А. Шарова, 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 + M&Ec`2021 (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2021г.). 2021. Весенняя сессия. С. XX–XX. – ISBN 978-5-6044060-1-4.

Секция 1. ГЕНОМИКА. ГЕНЫ И БОЛЕЗНИ

- РОЛЬ VNTR ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 (IL1RN) И ИНТЕРЛЕЙКИНА 4 (IL4) В РАЗВИТИИ КАРИЕСА ЗУБОВ У ДЕТЕЙ 11
Удина И.Г., Васильев Ю.А., Волобуев В.В., Грачева А.С., Гуленко О.В.

Секция 2. МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

- ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ ПРИМЕНЕНИЯ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИХ ДАТЧИКОВ ДАВЛЕНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ 16
Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Герашенко С.И., Бростилова Т.Ю., Васильев Ю.А.

- УСТАНОВКА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО ДАТЧИКА СКОРОСТИ ЖИДКОСТНОГО ПОТОКА ДЛЯ СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ 22
Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Славкин И.Е., Костин Р.В., Шачнева Е.А.

- ПЕРСОНАЛЬНАЯ ЦИФРОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ КРАНИО-ОРБИТАЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ. 28
Еолчиан С.А., Чёлушкин Д.М., Новиков М.М., Черобыло С.А.

- ИНДЕНТИФИКАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ АВТОДИННЫМ МЕТОДОМ 34
Кортунов В.Н., Дмитриев А.К., Коновалов А.Н., Ульянов В.А.

- КОНЦЕПЦИЯ РАЗРАБОТКИ МЕДИЦИНСКОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗОВ 39
Дмитриева В.В., Поляков Е.В.

- ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИЗМЕРЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ ПОЛОСТИ РТА 44
Арутюнов А.В., Бадеева Е.А., Волобуев В.В., Мурашкина Т.И., Аюпова Ф.С., Гуленко О.В., Васильев Ю.А.

- ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ОБУЧЕНИЯ И РАСПОЗНАВАНИЯ ОБРАЗОВ В НЕИНВАЗИВНОЙ СЕНСОРНОЙ СИСТЕМЕ ДИАГНОСТИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЧЕЛОВЕКА С ЦЕЛЬЮ ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ ВРАЧЕБНЫХ РЕШЕНИЙ 47
Зайцева А.Ю., Котова И.Е., Мазинг М.С.

Секция 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

- РАЗВИТИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ 55
Яглова Н.В.

- ЭФФЕКТЫ БЕЛКА УВ-1 В «ХИМЕРНОЙ» МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА 59
Бобкова Н.В., Полтавцева Р.А., Жданова Д.Ю., Ковалев В.И., Чаплыгина А.В.

- ДИСРЕГУЛЯЦИОННОЕ ДЕЙСТВИЕ НА МОРФОГЕНЕЗ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КЛУБОЧКОВОЙ ЗОНЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ ЭНДОКРИННЫМ ДИСРАПТОРОМ ДДТ 63
Обернихин С.С., Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Назимова С.В., Яглов В.В.

- ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОФИЗИОЛОГИИ АДРЕНАЛОЦИТОВ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ДИХЛОРДИФЕНИЛТРИХЛОРЭТАНА 67
Цомартова Д.А., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В.

МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА В ПРЕПУБЕРТАТНОМ ПЕРИОДЕ У КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ДДТ Цомартова Д.А., Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В.	71
ОСТЕОХОНДРОЗ ПОЗВОНОЧНИКА - ФАКТОР ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА Черкасов А.Д.	75
КРИТЕРИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ ХОЛЕЦИСТЭКТОМИИ (ЛСХЭ) Васильков В.Г., Сафронов А.И., Осинькин Д.В.	84
Секция 4. БИОЛОГИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ	
ИЗМЕНЕНИЯ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ КРАТКО-ВРЕМЕННЫХ СДВИГАХ СООТНОШЕНИЯ ИЗОТОПОВ ВОДОРОДА Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П.	88
МЕХАНИЗМЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ Джимак С.С., Елкина А.А., Басов А.А.	91
ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ СНИЖЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В.	96
Секция 5. БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ	
ПРОТЕКТИВНЫЙ ФРАГМЕНТ RAGE ИНГИБИРУЕТ ОЛИГОМЕРИЗАЦИЮ БЕТА-АМИЛОИДА Волкова Т.Д., Аветисян А.В., Короев Д.О., Вольпина О.М.	100
УСТОЙЧИВОСТЬ К ПРОТЕОЛИЗУ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФРАГМЕНТОВ RAGE Вольпина О.М., Короев Д.О., Волкова Т.Д., Камынина А.В., Серебрякова М.В., Бобкова Н.В.	104
Секция 6. ОКСИД АЗОТА	
ОКСИД АЗОТА В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ И В МОЗГЕ В НОРМЕ И ПРИ ГИПОКСИИ/ИШЕМИИ Реутов В.П., Сорокина Е.Г.	109
МИМЕТИКИ НИТРОЗИЛЬНЫХ ФЕРРЕДОКСИНОВ – ИНГИБИТОРЫ ФОСФОДИЭСТЕРАЗ: СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И АКТИВНОСТЬ <i>IN VITRO</i> Санина Н.А.	136
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА (NO) И МЕХАНИЗМЫ ЕГО РЕАЛИЗАЦИИ Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Савлущинская Л.А., Кривошеева Л.В., Кирсанов К.И.	142
БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РАННИХ И ОТДАЛЕННЫХ ИСХОДОВ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У ДЕТЕЙ Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Карасева О.В., Лукьянов В.И., Реутов В.П., Афанасьева С.А., Рошаль Л.М., Пинелис В.Г.	154

Секция 7. ПРОБЛЕМЫ ФАРМАКОЛОГИИ

СОЗДАНИЕ РОССИЙСКИХ ОРИГИНАЛЬНЫХ АНТИАРИТМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ III КЛАССА: ОТ СУБСТАНЦИИ ДО ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ
Давыдова Н.К. 161

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕВЗЕИ И ШРОТА КЛЮКВЫ НА УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ
Халикова Д.А., Аньков С.В., Толстикова Т.Г. 164

Секция 8. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКТ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО И ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ: ТЕХНОЛОГИЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА
Кочеткова А.А., Петров Н.А., Воробьева В.М., Воробьева И.С., Бирюлина Н.А., Зорин С.Н., Мазо В.К. 169

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИДЕНТИФИКАЦИИ И ВЫЯВЛЕНИЮ ФАЛЬСИФИЦИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ
Абрамова Л.С., Козин А.В. 174

МИКРОСТРУКТУРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ ПРИЗНАКОВ МИОПАТИИ У БЫСТРОРАСТУЩИХ СВИНЕЙ
Насонова В.В., Семенова А.А., Кузнецова Т.Г., Некрасов Р.В. 179

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ МЯСОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ
Семенова А.А., Юшина Ю.К., Грудистова М.А., Зайко Е.В., Иванова О.Е. 184

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ МИКРОЦИСТИНА-LR
Гендриксон О.Д., Зверева Е.А., Максимова К.А., Бондаренко А.П., Еремин С.А. 189

МЕМБРАННЫЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СЫРЬЯ В МЯСОПРОДУКТАХ
Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Поправко Д.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. 194

ВОПРОСЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БЕЗОПАСНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
Багрянцева О.В., Шевелева С.А. 198

РАЗРАБОТКА СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ПИЩЕВОГО ПРОДУКТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ У СПОРТСМЕНОВ-ЮНИОРОВ
Кобелькова И.В., Коростелева М.М., Никитюк Д.Б., Выборная К.В., Раджабкадиев Р.М., Кобелькова М.С., Семенов М.М., Токаев Э.С. 205

КОМПЛЕКСНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИРОДНОГО ИНСЕКТНОГО СЫРЬЯ
Саванина Я.В. 211

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА IN VIVO КОМПЛЕКСОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С БИОПОЛИМЕРНЫМИ МАТРИЦАМИ
Петров Н.А., Сидорова Ю.С., Кочеткова А.А., Мазо В.К. 216

Секция 9. ИНФОРМАЦИОННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ СРЕДА

- ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНФОРМАЦИОННО-КОММУНИКАЦИОННЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ И ОБРАЗОВАТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ 223
Зобенко В.Я., Зобенко А.В., Васильев Ю.А.
- НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ СЕМЕЙ, ВОСПИТЫВАЮЩИХ ДЕТЕЙ 226
С АНОМАЛИЯМИ РАЗВИТИЯ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ, НА ЭТАПЕ
ДОХИРУРГИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ ПОМОЩИ
Васильев Ю.А., Шильцова Т.А., Пильщикова В.В., Ахеджак-Нагузе С.К.
- КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ОТКЛОНЕНИЙ ВЕРХНЕЙ ЗУБНОЙ ДУГИ 230
ОТ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ НОРМЫ
Аюпова Ф.С.
- ФОРМИРОВАНИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-УПРАВЛЕНЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ 234
ВЫПУСКНИКОВ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ИННОВАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
Ахеджак-Нагузе С.К.
- ПРИМЕНЕНИЕ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В РАБОТЕ ЦЕНТРА 239
СОДЕЙСТВИЯ ТРУДОУСТРОЙСТВУ ВЫПУСКНИКОВ ФГБОУ ВО КУБГМУ
МИНЗДРАВА РОССИИ
Алексеев С.Н., Гайворонская Т.В., Ахеджак-Нагузе С.К.

Секция 10. ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА И КОСМИЧЕСКАЯ ПОГОДА

- КОСМИЧЕСКАЯ ПОГОДА И СОЦИАЛЬНОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ: ГЕНОГЕОГРАФИЯ 243
ПАНДЕМИИ COVID-19
Рагульская М.В.

Секция 11. ГЕМОГЛОБИНЫ, КРОВЬ И ЖЕЛЕЗО

- ПАТОГЕНЕЗ COVID-19: РОЛЬ АЦИДОЗА 247
Нечипуренко Ю.Д., Семёнов Д.А., Лавриненко И.А., Лагуткин Д.А., Генералов Е.А.,
Зайцева А.Ю., Матвеева О.В., Егоров Е.Е.
- ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МЕТАЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЦЕНТРЫ В БЕЛКАХ: 256
ПОВРЕЖДЕНИЕ ИЛИ ЗАЩИТА?
Космачевская О.В., Новикова Н.Н., Топунов А.Ф.
- СВЯЗЫВАНИЕ МЕТАЛЛОВ ГЕМОГЛОБИНОМ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ 263
Топунов А.Ф., Космачевская О.В., Новикова Н.Н.
- ИЗОФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ 266
Юшков Б.Г., Бриллиант С.А.
- РОЛЬ ПРЕГНАН X РЕЦЕПТОРА В РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК 270
К НИТРОЗАТИВНОМУ И ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ
Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Ерохина П.Д., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.
- СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕМОПРОТЕИНОВ (P450 И КАТАЛАЗ), 274
УЧАСТВУЮЩИХ В БИОСИНТЕЗЕ ОКСИЛИПИНОВ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ
Горина С.С., Топоркова Я.Ю.

СОДЕРЖАНИЕ

СТЕПЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК <i>IN VITRO</i> , КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПРЕДИКТОР НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИМИ И ЭКЗОГЕННЫМИ ФАКТОРАМИ Теуцкая Е.Е., Рябова И.С., Гусарик Л.Р.	279
АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Грачев Д.И., Топунов А.Ф., Мартусевич А.К., Рууге Э.К.	285
СВЯЗАННЫЕ С ГЕМОГЛОБИНОМ ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА ЗАЩИЩАЮТ ЕГО ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф.	291
ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С N-ЭТИЛТИОМОЧЕВИННЫМИ ЛИГАНДАМИ В МОДЕЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ Покидова О.В., Емельянова Н.С., Куликов А.В., Котельников А.И., Санина Н.А.	298
НЕСИМБИОТИЧЕСКИЙ ГЕМОГЛОБИРН – ТРИГГЕР ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ СЕМЯН Тифлова О.А., Дмитриев А.К.	302
ВЛИЯНИЕ ОБЕДНЕННОГО ДЕЙТЕРИЕМ ПИТЬЕВОГО РАЦИОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦНС ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ НОРМЫ И НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ С ГИПЕРКАПНИЕЙ Елкина А.А., Козин С.В., Кравцов А.А.	306
Секция 12. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ	
ВОЗМОЖНОСТИ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИИ В ОЦЕНКЕ КОЛЛАТЕРАЛЬНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА Сазонова О.Б., Огурцова А.А., Трошина Е.М., Машеров Е.Л.,	311
КОРКОВО-КОРКОВЫЕ ВЫЗВАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ В НЕЙРОХИРУРГИИ Огурцова А.А., Быканов А.Е., Маряшев С.А., Буклина С.Б., Жуков В.Ю., Пицхелаури Д.И.	317

Section 1. GENOMICS. GENES AND DISEASES

- ROLE OF VNTR POLYMORPHISMS OF THE GENES ANTAGONIST OF RECEPTOR OF INTERLEIKINE 1 (*IL1RN*) AND INTERLEIKINE 4 (*IL4*) IN CARIES DEVELOPMENT IN CHILDREN 11
 Udina I.G., Vasiliev Yu.A., Volobuyev V.V., Gracheva A.S., Gulenko O.V.

Section 2. MEDICAL PHYSICS

- PROBLEMATIC ISSUES OF THE USE OF FIBER-OPTIC PRESSURE SENSORS IN MEDICAL PRACTICE 16
 Badeeva E., Murashkina T., Gerashchenko S.I., Brostilova T.Y., Vasiliev Yu.A.

- INSTALLATION FOR RAPID RESEARCH OF A FIBER-OPTIC SENSOR LIQUID FLOW RATES FOR LIFE SUPPORT SYSTEMS 22
 Badeeva E., Murashkina T., Slavkin I.Ye., Kostin R.V., Shachneva E.A.

- PERSONAL DIGITAL MODEL FOR CRANIO-ORBITAL INJURIES DIAGNOSTICS AND RECONSTRUCTIVE SURGERY. 28
 Eolchyan S.A., Chelushkin D.M., Novikov M.M., Cherebylo S.A.

- IDENTIFICATION OF TUMOR TISSUES BY AUTODYNE METHOD 34
 Kortunov V.N., Dmitriev A.K., Konovalov A.N., Ulyanov V.A.

- THE MEDICAL INFORMATION SYSTEM CONCEPT FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA DIAGNOSING 39
 Dmitrieva V.V., Polyakov E.V.

- PROMISING POSSIBILITIES OF THE OPTICAL METHODUS IN THE DIAGNOSIS OF HERPES INFECTION OF THE MOUTH 44
 Arutyunov A.V., Badeeva E.A., Volobuev V.V., Murashkina T.I., Ayupova F.S., Gulenko O.V., Vasiliev Yu.A.

- APPLICATION OF TEACHING TECHNOLOGIES AND IMAGE RECOGNITION IN A NON-INVASIVE SENSOR SYSTEM FOR DIAGNOSTICS OF A HUMAN FUNCTIONAL STATE TO SUPPORT THE MAKING OF MEDICAL DECISIONS 47
 Zaitceva A.Yu., Kotova I.E., Mazing M.S.

Section 3. EXPERIMENTAL BIOLOGY AND CLINICAL MEDICINE

- DEVELOPMENT AND FUNCTION OF THE ADRENAL CORTEX| IN EXPOSED TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT ORGANISMS 55
 Yaglova N.V.

- THE EFFECT OF YB-1 PROTEIN IN CHIMERIC MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE 59
 Bobkova N.V., Poltavtseva R.A., Zhdanova D.Ju., Kovalev V.I., Chaplygina A.V.

- DEREGULATORY ACTION OF ENDOCRINE DISRUPTOR DDT ON MORPHOGENESIS AND FUNCTION OF ADRENAL ZONA GLOMERULOSA 63
 Obernikhin S.S., Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Nazimova S.V., Yaglov V.V.

- ALTERED CYTOPHYSIOLOGY OF EPINEPHRINE-PRODUCING CELLS IN RATS AFTER CHRONIC EXPOSURE TO LOW DOSES OF DDT 67
 Tsomartova D.A., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Yaglov V.V.

<p>MITOTIC ACTIVITY OF LYMPHOCYTES IN PREPUBERTAL RATS EXPOSED TO LOW DOSES OF DDT Tsomartova D.A., Timokhina E.P., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V.</p>	71
<p>OSTEOCHONDROSIS OF THE SPINE - A FACTOR OF PREMATURE AGING OF A PERSON Cherkasov A.</p>	75
<p>ANTIOXIDANT PROTECTION CRITERIA IN LAPAROSCOPIC CHOLECYSTECTOMY Vasilkov V.G., Safronov A.I., Osinkin D.V.</p>	84
Section 4. BIOLOGY OF STABLE ISOTOPES	
<p>CHANGES IN THYROID FUNCTION INDUCED BY SHIFTS OF HYDROGEN ISOTOPES RATIO Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Timokhina E.P.</p>	88
<p>MECHANISMS OF FRACTIONATION OF STABLE ISOTOPES IN LIVING SYSTEMS Dzhimak S.S., Elkina A.A., Basov A.A.</p>	91
<p>DYNAMIC MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE THYROID GLAND ASSOCIATED WITH DEPLETION OF DEUTERIUM BODY CONTENT Timokhina E.P., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V.</p>	96
Section 5. BIOORGANIC CHEMISTRY	
<p>PROTECTIVE RAGE FRAGMENT INHIBITS AMYLOID BETA OLIGOMERIZATION Volkova T.D., Avetisyan A.V., Koroev D.O., Volpina O.M.</p>	100
<p>RESISTANCE TO PROTEOLISYS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF RAGE FRAGMENTS Volpina O.M., Koroev D.O., Volkova T.D., Kamynina A.V., Serebryakova M.V., Bobkova N.V.</p>	104
Section 6. NITRIC OXIDE	
<p>NITRIC OXIDE IN BLOOD VESSELS AND BRAIN IN NORMAL AND IN HYPOXIA / ISCHEMIA Reutov V.P., Sorokina E.G.</p>	109
<p>NITROSYL FERREDOXINES MIMETICS AS PHOSPHODIESTERASE INHIBITORS: SYNTHESIS, STRUCTURE AND ACTIVITY <i>IN VITRO</i> Sanina N.A.</p>	136
<p>ANTITUMOR EFFECT OF NITRIC OXIDE (NO) DONORS AND MECHANISMS OF ITS IMPLEMENTATION Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Savluchinskaya L.A., Krivosheeva L.V., Kirsanov K.</p>	142
<p>BIOCHEMICAL PREDICTORS OF EARLY AND LONG-TERM OUTCOMES OF TRAUMATIC BRAIN INJURY IN CHILDREN Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Karaseva O.V., Lukianov V.I., Reutov V.P., Afanasieva S.A., Roshal L.M., Pinelis V.G.</p>	154

Section 7. PROBLEMS OF PHARMACOLOGY

DISCOVERY OF RUSSIAN ORIGINAL CLASS III ANTIARRHYTHMIC DRUGS: FROM ACTIVE INGREDIENT TO PHARMACEUTICAL FORM 161
Davydova N.

EFFECT OF RHAPONTICUM CARTHAMOIDES AND CRANBERRY MEAL EXTRACTS COMPOSITION ON GLUCOSE LEVEL 164
Khalikova D.A., Ankov S.V., Tolstikova T.G.

Section 8. PROBLEMS, METHODS AND PRODUCTS OF BIOTECHNOLOGY

SPECIALIZED FOOD PRODUCT WITH HYPOCHOLESTEROLEMIC AND HYPOGLYCEMIC EFFECT: TECHNOLOGY AND COMPOSITION CHARACTERIZATION 169
Kochetkova A.A., Petrov N.A., Vorobyeva V.M., Vorobyeva I.S., Biryulina N.A., Zorin S.N., Mazo V.K.

METHODOLOGICAL APPROACHES TO IDENTIFICATION AND DETECTION OF FALSE FOOD FISH PRODUCTS 174
Abramova L.S., Kozin A.V., Kachala V.V.

MICROSTRUCTURAL INDICATORS OF MUSCLE TISSUE WITH VARYING DEGREES OF SEVERITY OF MYOPATHY SIGNS IN FAST-GROWING PIGS 179
Nasonova V.V., Semenova A.A., Kuznetsova T.G., Nekrasov R.V.

STUDY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN MEAT PROCESSING ENTERPRISES 184
Semenova A.A., Yushina Yu.K., Grudistova M.A., Zaiko E.V., Ivanova O.E.

FLUORESCENT POLARIZATION IMMUNOASSAY OF MICROCYSTIN-LR 189
Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Maksimova K.A., Bondarenko A.P., Eremin S.A.

MEMBRANE TESTS FOR IDENTIFICATION OF RAW MATERIALS IN MEAT PRODUCTS 194
Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Popravko D.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

ISSUES OF ENSURING THE SAFE USE OF TECHNOLOGICAL MICROORGANISMS IN THE FOOD INDUSTRY 198
Bagryantseva O.V., Sheveleva S.A.

DEVELOPMENT OF A SPECIALIZED FOOD PRODUCT FOR THE PREVENTION OF IRON DEFICIENCY ANEMIA IN JUNIOR ATHLETES 205
Kobelkova I.V., Korosteleva M.M., Nikityuk D.B., Vibornaya K.V., Rajabkadiyev R.M., Kobelkova M.S., Semenov M.M., Tokayev E.S.

INTEGRATED USE OF NATURAL INSECT RAW MATERIALS IN MEAT PRODUCTS 211
Savanina Ya.V.

DEVELOPMENT AND IN VIVO EVALUATION OF COMPLEXES OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS WITH BIOPOLYMER MATRICES 216
Petrov N.A., Sidorova Yu.S., Kochetkova A.A., Mazo V.K.

Section 9. INFORMATION EDUCATIONAL ENVIRONMENT

EXPERIENCE IN USING INFORMATION AND COMMUNICATION TECHNOLOGIES IN CLINICAL PRACTICE AND EDUCATIONAL PROCESS 223
Zobenko V.Ya., Zobenko A.V., Vasiliev Yu.A.

<p>SOME PROBLEMS OF FAMILIES RAISING CHILDREN WITH MAXILLOFACIAL DEVELOPMENTAL ABNORMALITIES DURING PRE-SURGICAL REHABILITATION CARE Vasiliev Y.A., Shiltsova T.A., Pil'shikova V.V., Akhedzhak-Naguze S.K.</p>	226
<p>QUANTIFICATION OF DEVIATIONS OF THE UPPER DENTAL ARCH FROM THE INDIVIDUAL NORM Ayupova F.S.</p>	230
<p>FORMATION OF ORGANIZATIONAL AND MANAGEMENT ACTIVITIES OF GRADUATES OF A MEDICAL UNIVERSITY Akhedzhak-Naguze S.K.</p>	234
<p>APPLICATION OF INFORMATION TECHNOLOGIES IN THE WORK OF THE CENTER FOR PROMOTING EMPLOYMENT OF GRADUATES OF THE FSBEI VO KUBSMU OF THE MINISTRY OF HEALTH OF THE RUSSIAN FEDERATION Alekseenko S.N., Gaivoronskaya T.V., Akhedzhak-Naguze S.K.</p>	239
Section 10. HUMAN HEALTH AND SPACE WEATHER	
<p>SPACE WEATHER AND SOCIAL REGULATION: COVID-19 PANDEMIC GENO GEOGRAPHIC Ragul'skaya M.V.</p>	243
Section 11. HEMOGLOBINS, BLOOD AND IRON	
<p>PATHOGENESIS OF COVID-19: THE ROLE OF ACIDOSIS Nechipurenko Yu.D., Semyonov D.A., Lavrinenko I.A., Lagutkin D.A., Generalov E.A., Zaitceva A.Yu., Matveeva O.V., Yegorov Ye.E.</p>	247
<p>ADDITIONAL METAL-BINDING CENTERS IN PROTEINS: DAMAGE OR PROTECTION? Kosmachevskaya O.V., Novikova N.N., Topunov A.F.</p>	256
<p>METAL BINDING BY HEMOGLOBIN AT DIFFERENT CONDITIONS Topunov A.F., Kosmachevskaya O.V., Novikova N.N.</p>	263
<p>HEMOGLOBIN ISOFORMS AND ERYTHROCYTE HETEROGENEITY Yushkov B.G., Brilliant S.A.</p>	266
<p>ROLE OF PREGNAN-X-RECEPTOR IN CELL RESISTANCE TO NITROSATIVE AND OXIDATIVE STRESS. Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Shchulkin A.V., Erokhina P.D., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N.</p>	270
<p>COMPARATIVE ANALYSIS OF HEMOPROTEINS (CYTOCHROME P450 AND CATALASE) PARTICIPATING IN THE BIOSYNTHESIS OF OXYLIPINS IN PLANTS AND ANIMALS Gorina S.S. Toporkova Ya.Yu.</p>	274
<p>THE DEGREE OF OXIDATIVE DAMAGE TO DNA IN VITRO AS A MOLECULAR PREDICTOR OF DISORDERS CAUSED BY EPIGENETIC AND EXOGENOUS FACTORS Tekutskaya E.E., Raybova I.S., Gusaruk L.R.</p>	279

ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL PROPERTIES DINITROSYL IRON COMPLEXES UNDER CONDITIONS SIMULATING OXIDATIVE STRESS Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., Topunov A.F., Martusevich A.K., Ruuge E.K.	285
HEMOGLOBIN-BOUND DYNITROSIL IRON COMPLEXES PROTECT IT FROM OXIDATIVE MODIFICATION Nasybullina E.I., Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F.	291
STUDY OF THE TRANSFORMATION OF NITROSYL IRON COMPLEX WITH N-ETHYLTHIOUREA LIGANDS IN MODEL BIOLOGICAL SYSTEMS Pokidova O.V., Emel'yanova N.S., Kulikov A.V., Kotelnikov A.I., Sanina N.A.	298
NONSYMBIOTIC HEMOGLOBIN TRIGGERS PHOTOBIMODULATION OF SEEDS Tiflova O.A., Dmitriev A.K.	302
INFLUENCE OF DEUTERIUM-DEPLETED DRINKING DIET ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF ANIMALS UNDER RATE AND NORMOBARIC HYPOXIA WITH HYPERCAPNIA Elkina A.A., Kozin S.V., Kravtsov A.A.	306
Section 12. CLINICAL NEUROSCIENCE	
THE POSSIBILITIES OF ELECTROENCEPHALOGRAPHY IN ASSESSING THE COLLATERAL BLOOD CIRCULATION OF THE HUMAN BRAIN Sazonova O.B., Ogurtsova A.A., Troshina E.M., Masherov E.L.	311
CORTICAL-CORTEX EVOKED POTENTIALS IN NEUROSURGERY Ogurtsova A.A., Bykanov A.E., Maryashev S.A., Buklina S.B., Zhukov V.Yuro, Pitskhelauri D.I.	317

УДК 575.17:599.9
ГРНТИ 76.29.55
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.01

И.Г. Удина¹, Ю.А. Васильев², В.В. Волобуев²,
А.С. Грачева^{1,3}, О.В. Гуленко²

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

²Кубанский государственный медицинский университет

³НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР

РОЛЬ VNTR ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА 1 (IL1RN) И ИНТЕРЛЕЙКИНА 4 (IL4) В РАЗВИТИИ КАРИЕСА ЗУБОВ У ДЕТЕЙ

При изучении ассоциации VNTR полиморфизмов двух генов цитокинов – гена антагониста рецептора интерлейкина 1 (IL1RN) rs2234663 и интерлейкина 4 (IL4) rs8179190 с кариесом зубов у детей генотипы с двумя “длинными” аллелями L/L по IL1RN выявлены как обуславливающие устойчивость к высокоактивной форме кариеса, а генотипы A1/A2 P2/P2 и A2/A2 P2/P2 - чувствительность.

Ключевые слова: дети, кариес, Краснодарский край, IL1RN (rs2234663), IL4 (rs8179190), VNTR, цитокины.

I.G. Udina¹, Yu.A. Vasiliev², V.V. Volobuyev²,
A.S. Gracheva^{1,3}, O.V. Gulenko²

¹Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Kuban State Medical University, Krasnodar, 3500, Russia

³V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology

ROLE OF VNTR POLYMORPHISMS OF THE GENES ANTAGONIST OF RECEPTOR OF INTERLEIKINE 1 (IL1RN) AND INTERLEIKINE 4 (IL4) IN CARIES DEVELOPMENT IN CHILDREN

Association of VNTR polymorphisms of two cytokine genes – antagonist of receptor of interleikine 1 (IL1RN) rs2234663 and interleikine 4 (IL4) rs8179190 with dental caries was studied in three groups of children with DFC (decompensated form of caries) with average age 10.19±0.54, with SFC (subcompensated form of caries) (11.66±0.46) and with CFC (compensated form of caries) and healthy (12.08±0.38). The genotypes with two “long” alleles L/L by IL1RN were demonstrated mediating resistance to highly active form of caries, and genotypes: A1/A2 P2/P2 and A2/A2 P2/P2 - susceptibility.

Keywords: children, caries, Krasnodarskii krai, IL1RN (rs2234663), IL4 (rs8179190), VNTR, cytokine.

Введение

Кариес зубов является многофакторным заболеванием, которое ассоциируется с присутствием микроорганизмов, вызывающих кариозное поражение [1, 2].

Компоненты одного из основных возбудителей кариеса - *S. mutans* стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов таких, как IL-1 β моноцитами [3]; IL-1ra (IL1RN) ингибирует активность IL-1 β [4,5].

Описано вариабельное количество tandemных повторов (VNTR) с субъединицей в 86 bp (rs2234663), присутствующих в интроне 2 гена IL1RN. Среди шести выявленных аллелей присутствуют “короткие” (short-S) аллели с одним (VNTR/6) и двумя повторами (VNTR/2) и “длинные” (long - L аллели (VNTRL), содержащие от 3 до 6 повторов [6]. Провоспалительный иммунный ответ индивидуумов, гомозиготных по аллелю VNTR/2 гена IL1RN более продолжительный и сильный в сравнении с носителями других VNTR генотипов по гену IL1RN [6].

IL4 – интерлейкин 4 действует как противовоспалительный агент. Этот ген содержит tandemный повтор в 70-bp с вариабельным количеством tandemных повторов VNTR, который находится в интроне 3 и ассоциируется с продукцией IL-4 [7]. Обнаружены

два основных аллеля, обусловленные VNTR полиморфизмом *IL-4*: один с делецией 70-bp (с двумя повторами), а другой с инсерцией 70-bp (с тремя повторами), которые обозначают как *P1* и *P2*, соответственно [8]. *P2/P2* генотипы гена *IL4* ассоциированы с более низкими концентрациями *IL-4*, поэтому предположили, что аллель *P1* индуцирует более высокую экспрессию гена *IL4* по сравнению с *P2* аллелем [8].

Целью нашего исследования было изучение ассоциации VNTR полиморфизмов генов *IL1RN* и *IL4* с развитием кариеса у детей в Краснодарском крае.

На базе детской краевой клинической больницы и стоматологической поликлиники Кубанского Государственного медицинского университета (КубГМУ) изучены дети (N=159) школьного возраста, проживающие на территории Краснодарского края. Биологические образцы детей собраны у детей в виде соскобов буккального эпителия в ротовой полости. У всех детей проведено стоматологическое обследование в амбулаторных условиях в ходе профилактического осмотра или при поступлении в лечебно-профилактическое учреждение. Стоматологический осмотр проводили согласно рекомендациям ВОЗ. Дети подразделялись по возрасту в соответствии с периодами развития прикуса: 0-6 лет – временный прикус, 7-12 лет – смешанный и 13-17 лет – постоянный прикус. У всех детей была определена степень кариозного процесса, выявлены здоровые дети – не более 15% от выборки. Интенсивность кариозного процесса оценивали с использованием суммарного индекса «кпу/КПУ» (кариес/пломба/удаленный не по смене зуб); дети в выборках подразделялись на следующие группы: с компенсированной формой кариеса (КФК) – значения индекса от 0 до 3, с субкомпенсированной формой кариеса (СФК) – значения от 4 до 5, и декомпенсированной формой кариеса (ДФК) при значениях от 6 и выше [9]. Средний возраст детей в группах с КФК (и здоровых) составил $12,08 \pm 0,38$, с СФК - $11,66 \pm 0,46$ и с ДФК - $10,19 \pm 0,54$, что соответствует смешанному прикусу. Исследование одобрено этическим комитетом КубГМУ, что отражено в протоколе № 63 от 21 мая 2018 г.

Для исследования выбрали VNTR- маркер гена *IL1RN* (*rs2234663*) и VNTR- маркер гена *IL4* (*rs8179190*), которые изучали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР): условия описаны ранее [8] и [10].

Для статистической обработки данных использовали алгоритмы программы Statistica 6.0 и алгоритм WinPeri (для определения OR (odds ratio), определяли 95% интервал разброса величины OR CI (confidence interval) в случае величины вероятности $p < 0.05$ по точному тесту Фишера (two-tailed - для двух распределений). С помощью алгоритмов программы “Statistica” определяли частоты аллелей, равновесие Харди-Вайнберга, оценку ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности и выполняли сравнение выборок с использованием G-критерия.

Изучено распределение аллелей по VNTR *IL4* (*rs8179190*) и VNTR *IL1RN* (*rs2234663*) (см. табл.) для групп детей с различной степенью активности кариеса зубов - КФК, СФК и ДФК. Для VNTR *IL4* (*rs8179190*) и VNTR *IL1RN* (*rs2234663*) во всех трех группах с различной степенью активности кариеса выявлено равновесие Харди-Вайнберга, Установлены достоверные различия по присутствию генотипа *A1/A1* попарно между группами детей с КФК (и здоровых) и ДФК, а также с СФК и ДФК, причем генотип *A1/A1* (табл.), равно как генотип *L/L* выступают как генотипы, обуславливающий устойчивость к декомпенсированной форме кариеса. Установлены также достоверные различия по присутствию суммарной группы генотипов, гомозиготных по *P2* и содержащих хотя бы один аллель *A2*: *A1/A2 P2/P2* и *A2/A2 P2/P2* попарно между группами детей с ДФК и КФК (и здоровых) и с ДФК и СФК: $OR=3.26$, $p=0.031$; $CI_{95\%}$ 1.05-10.36 и $OR=3.59$, $p=0,048$; $CI_{95\%}$ 1.00-14.44, соответственно. Таким образом, эти генотипы выступают как генотипы риска по наибольшей активности кариеса (декомпенсированной формы).

Выводы. Генотипы, с двумя “длинными” аллелями *L/L* в генотипе (500 или 410bp) обуславливают устойчивость к ДФК, а составные двухлокусные генотипы по *rs8179190* и по *rs2234663 A1/A2 P2/P2* и *A2/A2 P2/P2* -чувствительность.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: группа детей с СФК аналогично группе с КФК (и здоровых) достоверно отличается от группы с ДФК по тому же спектру маркеров изученных генов цитокинов, что предполагает роль изученных маркеров в развитии кариеса с максимальной степенью активности процесса (декомпенсированной формы кариеса. Несомненно, можно сделать вывод о необходимости дальнейшего изучения VNTR *IL1RN* и *IL4* в связи с кариесом зубов на большей выборке детей с учетом возраста и уровня гигиены ротовой полости и наличия врожденных пороков развития для подтверждения и уточнения полученных выводов [11,12].

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственного задания «Генные исследования и генетический полиморфизм клетки, организма и популяции» № 0112-2019-0001 и гранта РФФИ № р_а 16-44-230636.

Список литературы

- 1 *Ballantine J.L., Carlson J.C., Ferreira A.G. et al.* Exploring the genomic basis of early childhood caries: a pilot study // International Journal of Paediatric Dentistry. 2018. V. 28. P. 217–225. doi 10.1111/ipd.12344
- 2 *Удина И.Г., Гуленко О.В.* Молекулярно-генетические механизмы развития кариеса // Генетика. 2018. №4. С. 426-434. doi: 10.7868/S0016675818040045
- 3 *Arend W.P., Palmer G., Gabay C.* *IL-1, IL-18, and IL-33* families of cytokines // Immunol Rev. 2008. V. 223. P. 20-38.
- 4 *Kim C.H., Kang B.S., Lee T.K. et al.* IL-1 β regulates cellular proliferation, prostaglandin E2 synthesis, plasminogen activator activity, osteocalcin production, and bone resorptive activity of the mouse calvarial bone cells // Immunopharmacol Immunotoxicol. 2002. V. 24. P. 395-407.
- 5 *Dinareello C.A.* Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism // Blood. 1991. V. 77. P. 1627-1652.
- 6 *Tarlow J.K., Blakemore A.I., Lennard A. et al.* Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat // Hum Genet. 1993. V. 91. P. 403–404.
- 7 *Konwar R, Bid H.K.* Location of the 70bp VNTR polymorphic site is in third intron of IL-4 gene // Indian J. Clin. Biochem. 2008. V. 23. P. 204-205.
- 8 *Kalkan G., Yigit S., Karakus N. et al.* Association between interleukin 4 gene intron 3 VNTR polymorphism and recurrent aphthous stomatitis in a cohort of Turkish patients // Gene. 2013. V.527. P. 207-210.
- 9 *Виноградова Т.Ф.* Диспансеризация детей у стоматолога. М.: Медицина, 1988. 256 с.
- 10 *Nair R.R., Khanna A., Singh K.* Association of interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN) gene polymorphism with recurrent pregnancy loss risk in the North Indian Population and a meta-analysis // Mol. Biol. Rep. 2014. V. 41. P. 5719–5727. doi:10.1007/s11033-014-3443-8
- 11 *Гуленко О.В., Волобуев В.В., Васильев Ю.А. и др.* Сравнительный анализ стоматологической заболеваемости и антиоксидантной защиты ротовой жидкости у детей с врожденными расщелинами губы и/или неба и психоневрологическими расстройствами // Российский стоматологический журнал. 2018. Т. 22. № 4. С. 188-192.
- 12 *Удина И.Г., Учаева В.С., Волобуев В.В. и др.* Молекулярно-генетическое изучение ассоциации SNP A66G гена MTRR с кариесом зубов у детей с врожденными рас-

Таблица. Распределение полиморфных вариантов VNTR (rs2234663) гена *IL1RN* у детей в Краснодарском крае в зависимости от степени активности кариеса

Дети с ДФК							
VNTR	Генотип	N.O.	F.O.	Частота аллеля	N.E.	χ^2	Параметры гетерозиготности
rs2234663	<i>A1/A1</i>	21	0.5526	$P_{A1}=0.7236\pm$ 0.0513	19.91	1.5702 <i>d.f.</i> =3 <i>p</i> >0.05	He =0.4069± 0.0488, Ho = 0.3421± 0.0270, D= - 0.1591± 0.1478, td = 0.7106, <i>p</i> >0.05
	<i>A1/A2</i>	12	0.3158		14.47		
	<i>A2/A2</i>	4	0.1053	$P_{A2}=0.2632\pm$ 0.0505	2.63		
	<i>A1/A4</i>	1	0.0263	$P_{A4}=0.0132\pm$ 0.0131	0.72		
	<i>A2/A4</i>	0	0		0.26		
	<i>A4/A4</i>	0	0		0.01		
	Σ	38	1.0000		$n_e=1.6859\pm$ 0.0488		
Дети с СФК							
VNTR	Генотип	N.O.	F.O.	Частота аллеля	N.E.	χ^2	Параметры гетерозиготности
rs2234663	<i>A1/A1</i>	38	0.7755	$P_{A1}=0.8878\pm$ 0.0319	38.62	0.7833 <i>d.f.</i> =3 <i>p</i> >0.05	He = 0.2014± 0.0502, Ho =0.2245± 0.0596, D = 0.1148± 0.1667, td = 0.2966, <i>p</i> >0.05
	<i>A1/A2</i>	10	0.2041		8.88		
	<i>A2/A2</i>	0	0	$P_{A2}=0.1020\pm$ 0.0306	0.51		
	<i>A1/A4</i>	1	0.0204	$P_{A4}=0.0102\pm$ 0.0102	0.89		
	<i>A2/A4</i>	0	0		0.10		
	<i>A4/A4</i>	0	0		0.01		
	Σ	49	1.0000		$n_e=1.2522 \pm$ 0.0502		
Дети с КФК (и здоровые)							
VNTR	Генотип	N.O.	F.O.	Частота аллеля	N.E.	χ^2	Параметры гетерозиготности
rs2234663	<i>A1/A1</i>	55	0.7638	$P_{A1}=0.8681\pm$ 0.0282	54.25	2.0808 <i>d.f.</i> =3 <i>p</i> >0.05	He = 0.2337± 0.0433 Ho = 0.2083± 0.0479 D = - 0.1085± 0.1306 td = 0.3931, <i>p</i> >0.05
	<i>A1/A2</i>	12	0.1667		13.89		
	<i>A2/A2</i>	2	0.0278	$P_{A2}=0.1111\pm$ 0.0262	0.89		
	<i>A1/A4</i>	3	0.0417	$P_{A4}=0.0208\pm 0.011$ 9	2.60		
	<i>A2/A4</i>	0			0.33		
	<i>A4/A4</i>	0			0.04		
	Σ	72	1.0000		$n_e=1.3050\pm 0.0433$		
Сравнение детей с КФК (и здоровых) и СФК: по генотипам $G=0.6347$, <i>d.f.</i> =3; <i>p</i> >0.05; по доле генотипа <i>A1/A1</i> $G=0.0219$, <i>d.f.</i> =1, <i>p</i> >0.05							
Сравнение детей с КФК (и здоровых) и ДФК: по генотипам $G=6.2564$, <i>d.f.</i> =3; <i>p</i> >0.05; по доле генотипа <i>A1/A1</i> $G=4.9851$, <i>d.f.</i> =1, <i>p</i> <0.05; OR=0.38 , <i>p</i> =0.030, CI95%=0.15-0.96							
Сравнение детей с СФК и ДФК: по генотипам $G=4.8181$, <i>d.f.</i> =3; <i>p</i> >0.05; по доле генотипа <i>A1/A1</i> $G=4.7693$, <i>d.f.</i> =1, <i>p</i> <0.05; OR=0.36 , <i>p</i> =0.038, CI95%=0.13-0.99							

Сведения об авторах

Ирина Геннадьевна Удина

Д-р. биол. наук, руководитель группы популяционной иммуногенетики

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
Москва, Россия*

Эл. почта: irina_udina@mail.ru

Елена Александровна Бадеева

д-р. техн. наук, доцент

профессор кафедры бухгалтерский учет, налогообложение и аудит БУНиА

Пензенский государственный университет

Пенза, Россия

Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru

Юрий Анатольевич Васильев

ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения истории медицины

Кубанский государственный медицинский университет

Краснодар, Россия

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Владимир Викторович Волобуев

к.м.н., заведующий отделением, доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и ЧЛХ

Кубанский государственный медицинский университет

Краснодар, Россия

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Алеся Сергеевна Грачева

к.б.н., научный сотрудник

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского
ФНКЦ РР*

Москва, Россия

Эл. почта: irina_udina@mail.ru

Ольга Владимировна Гуленко

д-р мед. наук, доц. каф. хирург. стоматологии и ЧЛХ

Кубанский государственный медицинский университет

Краснодар, Россия

Эл. почта: corpus@ksma.ru

Information about authors

Irina Gennadyevna Udina

Doctor. Biol. Ph.D., Leader of the Population Immunogenetics Group

*Institute of Genetics by N.I. Vavilov RAS
Moscow, Russia*

E-mail: irina_udina@mail.ru

Elena Badeeva

doctor of technical Sciences, associate Professor

Professor of accounting, taxation and audit Department

Penza state University

Penza, Russia

E-mail: badeeva_elena@mail.ru

Yuri Vasilyev

Assistant Department of the Department of public health, public health and history of medicine

*Cuban State Medical University
Krasnodar, Russia*

E-mail: yurii-59@mail.ru

Vladimir Volobuev

Ph.D., Head of the Department, Assistant

Professor of Pediatric Dentistry, Orthodontics and CHH

*Cuban State Medical University
Krasnodar, Russia*

E-mail: yurii-59@mail.ru

Alesya Gracheva

Ph.D., Research Fellow

Vavilov Institute of General Genetics RAS

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology FRCC of Intensive Care Medicine and Rehabilitology

Moscow, Russia

E-mail: irina_udina@mail.ru

Olga Gulenko

Dr. Honey. Sciences, Doc. Caf. surgical dentistry and CHL

Cuban State Medical University

Krasnodar, Russia

E-mail: corpus@ksma.ru

ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ ПРИМЕНЕНИЯ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИХ ДАТЧИКОВ ДАВЛЕНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

Рассмотрены проблемные вопросы, возникающие при измерении низких давлений в медицинской практике, и связанные в связи с этим сложности проектирования средств измерений, в первую очередь, низкая чувствительность преобразования сигналов, ведущая к увеличению составляющих основной погрешности, габаритных размеров устройств, применению косвенных методов измерений, влекущих большие методические погрешности измерений и соблюдение правил асептики и антисептики. Предлагается перейти к передовым волоконно-оптическим датчикам давления и новым способам измерения низких давлений с их помощью.

Ключевые слова: низкое давление, волоконно-оптический датчик, диагностика, измерение, катетер, оптическое волокно, упругий элемент

E. Badeeva¹, T. Murashkina¹, S.I. Gerashchenko²,
T.Y. Brostilova², Yu.A. Vasiliev³
¹Special fiber-optic measuring system
²Penza State University
³Kuban state medical University

PROBLEMATIC ISSUES OF THE USE OF FIBER-OPTIC PRESSURE SENSORS IN MEDICAL PRACTICE

The problematic issues that arise when measuring low pressures in medical practice, and the associated difficulties in designing measuring instruments, first of all, the low sensitivity of signal conversion, leading to an increase in the components of the basic error, the overall dimensions of the devices, the use of indirect measurement methods that entail large methodological measurement errors, are considered. It is proposed to switch to advanced fiber-optic pressure sensors and new ways to measure low pressures with them.

Keywords: low pressure, fiber-optic sensor, diagnostics, measurement, catheter, optical fiber, elastic element

Введение

На разных стадиях диагностики физиологического и патофизиологического состояния организма человека необходимы соответствующие медицинские технические достоверные средства измерения давления, так как давление сред является наиболее показательным источником информации о состоянии здоровья пациента [1]. На рисунке 1 представлены некоторые органы и системы человека, где без измерения давления трудно адекватно оценить степень того или иного заболевания.

Измерение давления необходимо в ряде биомедицинских применений, включая сердечно-сосудистые, урологические диагностические процедуры, хирургические процедуры, мониторинг инвазивных методов лечения [2]. В реаниматологии необходимо измерять центральное венозное давление, давление в дыхательных путях; в абдоминальной хирургии - давление в брюшной полости; в нейрохирургии и неврологии - ликворное давление; в урологии - давление в почечных лоханках, мочеточниках, мочевом пузыре; в гастроэнтерологии - давление в пищеводе, желудке, панкреатическом протоке; в ортопедии - давление в суставной сумке; в офтальмологии - давление в слезном протоке, акушерство, гинекология, проктология и т.д.

Каждая часть тела может подвергаться изменению давления либо вследствие нормальных физиологических изменений, либо в результате патофизиологического процесса течения болезни, а также при выздоровлении и в период реабилитации.

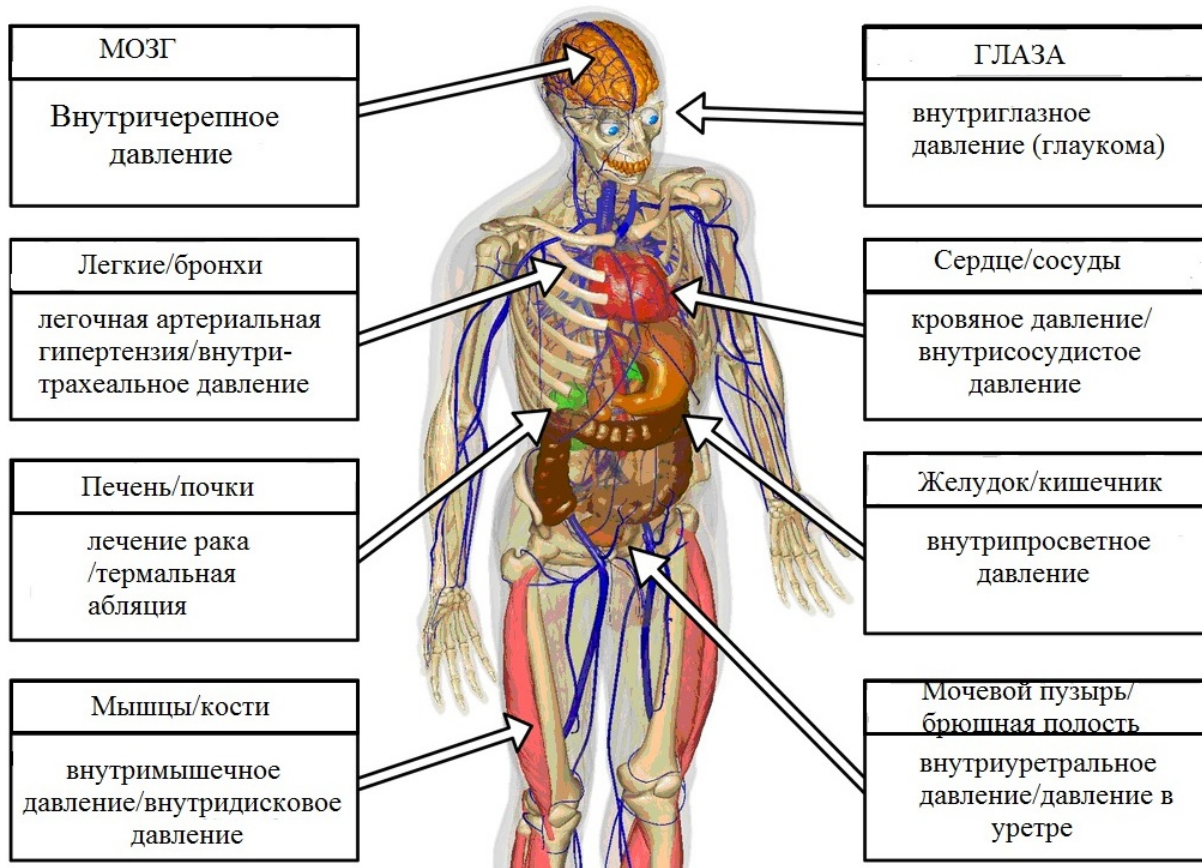


Рисунок 1 – Области тела человека, где необходимо измерять давление [1].

Клаузен и Глотт [3] рекомендовали разделить давление тела на три области: 1) области низкого давления (например, капилляры и мозг), 2) области среднего давления (например, сердце и легкие), 3) области высокого давления (например, суставы и изменения давления во время методов абляции). Нам такое деление представляется не совсем точным, так как у инженеров несколько иное представление о большом давлении: это $10 \dots 200 \text{ кгс/см}^2$. Такое деление может привести к неправильной постановке задачи измерений давления в медицинской практике, которая, в свою очередь, приведет к неверным техническим решения датчиков давления для медицины. Традиционное разделение между медициной и технологией является серьезной проблемой при разработке новых медицинских устройств. Клиницистам не хватает знаний о потенциале новых технологических решений, а инженеры не знают, какие медицинские приборы и какого применения необходимы и будут полезны в практическом здравоохранении.

Для разработчиков датчиков давления определяющими являются диапазон измеряемых давлений и чувствительность измерительного преобразователя датчика (определяющая разрешающую способность) [4]. Измерение должно быть точным в соответствующем диапазоне измерений для исследуемого органа или системы. Основная проблема, встающая перед инженерами-разработчиками датчиков давления, - это низкие значения давлений, подлежащих измерению (таблица 1).

Таблица – Диапазоны измерений давления в медицинской практике

Область медицины)	Часть тела	Минимальное давление, кПа	Максимальное давление, кПа	Разрешающая способность, кПа
Кардиология (измерение АД)	сердце, вены, артерии	-4 (-30 мм рт. ст.)	40 (300 мм рт. ст.)	13 (0,1 мм рт. ст.)
Урология (цистометрия)	мочевой пузырь, брюшная полость	0 (0 смН ₂ O)	25 (250 смН ₂ O)	0,05 (0,5 смН ₂ O)
Внутричерепное давление	голова	0	1 (7, 5 мм рт. ст.)	

Диапазоны давления в нормальных физиологических состояниях могут быть в случае:

- левожелудочкового давления 0...20 кПа (0...150 мм рт. ст.),
- внутричерепного давления 0...1 кПа (0...7, 5 мм рт. ст.).

При патологических или патофизиологических состояниях 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 [1].

Анализ медицинских датчиков давления показал практическое отсутствие таковых из-за трудности достижения достаточной чувствительности преобразования сигналов из-за низких значений давления (в среднем 60 мм рт. ст.). Для таких значений давления трудно подобрать упругий воспринимающий элемент (мембрану), имеющий малые габариты, стабильную упругость материала, из которого он изготовлен.

В современной клинической практике давление часто измеряется косвенно через водяной или воздушный столб и/или в месте, удаленном от интересующего объекта [5]. Достоверные измерения в реальном масштабе времени не обеспечиваются и точное давление внутри интересующего органа не выявляется. Кроме того, такие измерения ведут к дискомфорту пациента, риск инфекций и рефлекторная активность гладкой мускулатуры связаны с существующими методами, например, при измерении давления через уретру, влагалище и анальное отверстие.

В настоящее время точность измерения давления в различных органах человека достаточно низкая. Например, долгое время для измерения артериального давления в лечебных учреждениях применялся простой и отработанный метод Короткова, для реализации которого используются тонометры с фонендоскопом и стрелочным манометром. В то же время, анализ многочисленных результатов измерений показал, что погрешность существующих средств измерений для реализации этого метода очень большая (5...7) %, а с учетом погрешности взаимодействия средств измерений с объектом измерения (при наложении манжеты на руку пациента), методической и субъективной погрешностей измерения суммарная погрешность измерения составит (7...9) % [6]. Если же измерение артериального давления осуществляется в домашних условиях, то, чаще всего, используются электронные тонометры осцилляторного типа, основная погрешность которых (8...9) %, а с учетом того, что измерения осуществляются в автоматическом режиме неподготовленными пользователями суммарная погрешность измерения достигает (10...12) %. В абсолютных значениях это 20...40 мм рт. ст., при том, что на каждое повышение систолического давления на 2,6 кПа (20 мм рт. ст.) или диастолического давления на 1,3 кПа (10 мм рт. ст.), что является показанием приёма препаратов, и при этих параметрах смертность от ишемической болезни сердца и инсульта удваивается.

С клинической точки зрения идеальное измерение давления должно проводиться в течение более длительного периода времени с минимальным дискомфортом для пациента. Оценка физиологических процессов обычно требует нескольких дней записи, во время различных действий, обычно выполняемых человеком. Измерение эффективности лечения у отдельного пациента может потребовать нескольких недель измерения, в то время как профилактические меры могут длиться месяцами или даже годами.

Избежать дискомфорта можно, уменьшив габариты датчика давления. Чем меньше устройство, тем меньше риск повреждения тканей, вызывающих воспаление и боль. Кроме того, чтобы уменьшить риски для здоровья пациента, обусловленные внедрением в человеческое тело измерительных преобразователей, построенных на принципах, связанных тем или иным образом с изменением электрических параметров (тока или напряжения), и возможной неисправностью таких преобразователей, необходимо искать подходы, исключающее электрическое и электромагнитное воздействие датчика давления на тело человека. К таким средствам измерений относятся волоконно-оптические датчики давления [6 - 11]. Датчики на основе оптических волокон становятся отличной альтернативой электрическим датчикам на основе катетеров, проводников и МЭМС [1]. Для медицинских применений они имеют ряд преимуществ по сравнению с классическими методами измерения.

Цель работы – определение возможности измерения малых значений давлений в медицинской практике с помощью волоконно-оптических датчиков.

Материалы и методы

Авторы работы [4] провели многочисленные исследования в области проектирования микро-оптико-механических систем волоконно-оптических датчиков давления (ВОДД) в основном для изделий ракетно-космической техники. Необходимо эти разработки адаптировать к ВОДД медицинского назначения.

Определено что, если в ВОДД применяется стаканообразная или плоская мембрана, то при воздействии давления P на мембрану, она деформируется, принимая сферическое очертание. Для определения параметров мембраны необходимо воспользоваться известными формулами по определению микроперемещений центра мембраны w и максимальных напряжений σ_{max} , возникающих в материале мембраны под действием давления P [4]:

$$w_0 = \frac{3pR^4(1-\mu^2)}{16Eh^3}, \quad (1)$$

$$\sigma_{max} = \frac{3r^4P}{4h^2} \leq [\sigma], \quad (2)$$

где w – прогиб мембраны под действием давления, мкм; R_m , h - радиус и толщина мембраны, мм; E , - модуль упругости материала мембраны, Н/мм²; μ - коэффициент Пуассона материала мембраны; σ - допустимое максимальное напряжение, Н/мм²; $[\sigma]$ - допускаемое напряжение справочное, Н/мм².

Результаты исследований

Особенность исходных данных для расчета в том, что мембрана не может быть металлической, так как не обеспечит нужную чувствительность преобразования низких значений давления в преобразуемые физические величины.

Для расчетов взято усредненное значение $P_{max} = 60$ мм рт. ст. = 0,0815 кгс/см².

Из условия надежного функционирования микро-оптико-механической системы прогиб мембраны должен быть 20...50 мкм [4], но в виду особых требований по миниатюризации габаритных размеров датчика до 2...3 мм (для расположения их в стандартных катетерных трубках) ограничиваем прогиб значением $w=20$ мкм.

Выбираем материал мембраны – полимер (силиконовый, тефлоновый, полиэфирный, фенолформальдегидный, эпоксидный, кремний-органический, полиимидный и др.) у которых $[\sigma] = 1200 \text{ Н/мм}^2$. Радиус мембраны должен быть в диапазоне $R = 0,75 \dots 1 \text{ мм}$, толщину мембраны ограничиваем размерами: $0,2 \leq h \leq 0,4 \text{ мм}$

Предельные значения толщины мембраны h выбираются из двух условий: со стороны меньших значений - возможностями технологического оборудования в процессе изготовления мембраны и крепления ее в датчике, а со стороны больших значений - упругими свойствами мембраны).

По результатам расчета выбираются параметры мембраны: радиус, толщина, материал, исходя из максимального прогиба мембраны, который обеспечивает требуемую чувствительность преобразования оптического сигнала (таблица 1).

Таблица 1 - Результаты расчета конструктивных параметров мембраны

P , МПа (кгс/см ²)	E , МПа	R_M , мм	μ	w , мм	h , мм
0,008	4500	0,75	0,45	0,02	0,016
	4500	0,9	0,45		0,021
	4500	1,0	0,45		0,024
	3000	0,75	0,47		0,018
	3000	1,0	0,47		0,027

На рисунке 2 представлены графики расчетных зависимостей $W=f(P)$ при значениях $R_M=0,75 \text{ мм}$ и $h=0,02; 0,022; 0,025 \text{ мм}$ для случая, когда в ВОДД используются «кварц-кварцевые» оптические волокна с параметрами: диаметр оболочки $d_{OV} = 500 \text{ мкм}$, диаметр сердцевины $d_C = 200 \text{ мкм}$, апертурный угол $\Theta_{NA} = 12^\circ$.

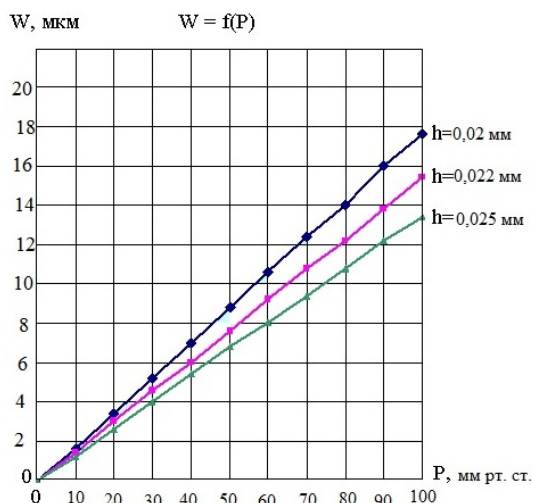


Рисунок 2 - Расчетные зависимости $W=f(P)$ при $R_M = 0,75 \text{ мм}$

В соответствии с проведенными расчетами начальное расстояние x_0 от оптических волокон до отражающей поверхности находится в диапазоне $750 \dots 850 \text{ мкм}$, толщина мембраны - в диапазоне $0,015 \dots 0,25 \text{ мм}$, радиус мембраны – в диапазоне $0,75 \dots 1,0 \text{ мм}$, максимальный прогиб мембраны определяется чувствительностью преобразования ВОП и находится в диапазоне $0,015 \dots 0,025 \text{ мм}$. Таким образом, путем математического моделирования определяются конструктивные параметры мембраны ВОДД, обеспечивающие повышение чувствительности преобразования оптических сигналов.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются:
- системный подход к оценке ситуации в области измерения давления в медицин-

ской практике, показавший отсутствие отечественных средств измерения давления необходимой точности и малых габаритов;

- выявленные диапазоны измерения давления в медицинской практике;
- найденные параметры мембраны из полимера, обеспечивающие необходимую чувствительность преобразования оптического сигнала в зоне измерения низких значений давления.

Литература

1 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;

2 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.

3 Clausen, I.; Glott, T. Development of Clinically Relevant Implantable Pressure Sensors: Perspectives and Challenges. Sensors 2014, 14, 17686–17702.

4 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.

5 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.

6 Волоконно-оптический датчик давления для гидроманжетного тонометра Бадеева Е.А., Геращенко С.И., Мурашкина Т.И., Янкина А.Н., Геращенко М.С. // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + M&Eс`2019 (Гурзуф, с 01 по 11 июня 2019 г.). 2019. Весенняя сессия. С. 21–25.

7 Волоконно-оптический датчик силы (давления) мышц языка/ Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Ю.А. Васильев, Д.И. Серебряков, Т.Ю. Бростилова, Н.А. Хасаншина, Л.Ф. Терещенко // Модели, системы и сети в экономике, технике, природе и обществе. 2019. № 3. С. 83–93.

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 Волоконно-оптические датчики давления аттенюаторного типа для летательных аппаратов / Е.А. Бадеева, В.А. Мещеряков, Т.И. Мурашкина и [др.] // Датчики и системы. 2003. № 4. С. 11–14.

10 Конструирование волоконно-оптических датчиков давления отражательного типа / Е.А. Бадеева, В.А. Мещеряков // Надежность и качество: Тр. Международ. симп. 2005. С. 377–380.

11 Разработка теории распределения светового потока в оптической системе волоконно-оптических преобразователей физических величин отражательного типа: Монография / Е.А. Бадеева, Л.Н. Коломиец, Н.П. Кривулин и [др.] // Под общ. ред. проф. Мурашкиной Т.И.-ИИЦ ПГУ, 2008. 102 с.

Сведения об авторах

Елена Александровна Бадеева

*д-р. техн. наук, доцент
профессор кафедры бухгалтерский учет, налогообложение и аудит БУНиА
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия
Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru*

Information about authors

Elena Alexandrovna Badeeva

*doctor of technical Sciences, associate Professor
Professor of accounting, taxation and audit
Department
Penza state University
Penza, Russia
E-mail: badeeva_elena@mail.ru*

Татьяна Ивановна Мурашкина
д-р. техн. наук, профессор
профессор кафедры приборостроения
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Юрий Анатольевич Васильев
ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохра-
нения и истории медицины
Кубанский государственный медицинский университет
Краснодар, Россия

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Сергей Иванович Геращенко
д-р техн. наук, проф., зав. Каф.
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия

Эл. почта: mpo@list.ru

Бростилова Татьяна Юрьевна
к-т техн. наук, доцент, доц. каф. «Электроэнергети-
ка и электротехника»
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия

Эл. почта: tat-krupkina@yandex.ru

Tatyana Ivanovna Murashkina
doctor of technical Sciences, Professor
Professor of instrument engineering Department
Penza state University
Penza, Russia

E-mail: timurashkina@mail.ru

Yuri Anatolyevich Vasiliev
assistant of the Department of public health, pub-
lic health and history of medicine
Kuban state medical University
Krasnodar, Russia

E-mail: yurii-59@mail.ru

Sergey Ivanovich Gerashchenko
Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of
the Department
Penza, Russia

E-mail: mpo@list.ru

Tatiana Y. Brostilova
Candidate of Technical Sciences, Associate Pro-
fessor, Associate Professor of the Department
Penza State University
Penza, Russia

E-mail: tat-krupkina@yandex.ru

УДК 62.93, 62-791.2
ГРНТИ 59.14, 59.31
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.03

**Е.А. Бадеева¹, Т.И. Мурашкина¹,
И.Е. Славкин², Р.В. Костин², Е.А. Шачнева³**
¹ООО «Специальные волоконно-оптические
измерительные системы»
²ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»
³ФГБОУ ВО НИУ «Высшая школа экономики»

УСТАНОВКА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО ДАТЧИКА СКОРОСТИ ЖИДКОСТНОГО ПОТОКА ДЛЯ СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

В статье предложены структурная схема и упрощенная конструкция устройства для воспроизведения и измерения параметров жидкостных потоков (скорости, расхода, объема), осуществляемых при юстировке и настройке оптической системы, экспресс-градуировке и экспресс-исследованиях волоконно-оптических датчиков параметров жидкостных потоков (ВОДПЖП). Предложен вариант крепления ВОДПЖП на участке трубопровода в системе жизнеобеспечения.

Ключевые слова: волоконно-оптический датчик, экспресс-исследование, жидкостный поток, скорость, установка, структурная схема, конструкция, система жизнеобеспечения

**E. Badeeva¹, T. Murashkina¹, I.Ye. Slavkin²,
R.V. Kostin², E.A. Shachneva³**
¹Special fiber-optic measuring system
²Penza State University
³Higher School of Economics

INSTALLATION FOR RAPID RESEARCH OF A FIBER-OPTIC SENSOR LIQUID FLOW RATES FOR LIFE SUPPORT SYSTEMS

The article proposes a block diagram and a simplified design of a device for reproducing and measuring the parameters of liquid flows (velocity, flow, volume), carried out during the ad-

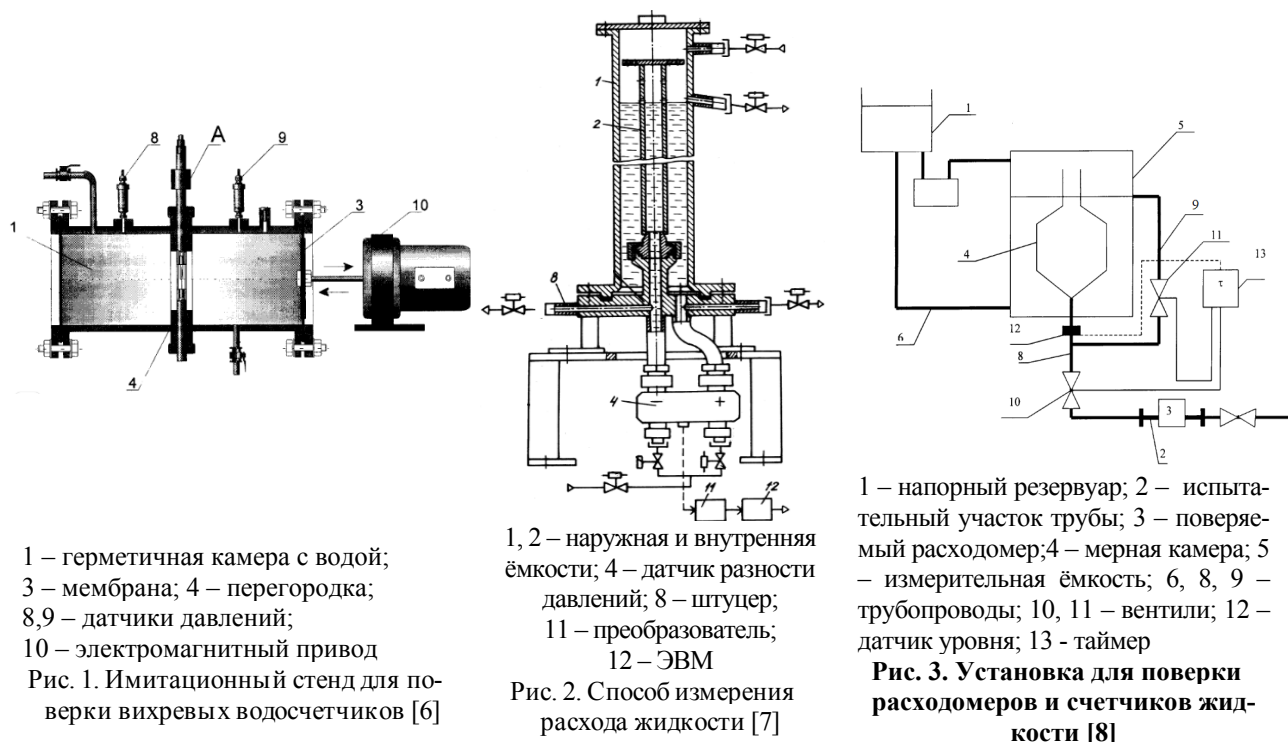
justment and adjustment of the optical system, express calibration and express studies of fiber-optic sensors of liquid flow parameters (FOSLFP). A variant of installing a FOSLFP on the pipeline section in the life support system is proposed.

Keywords: fiber-optic sensor, express study, liquid flow, speed, installation, block diagram, design, life support system

Введение

Практически все системы жизнеобеспечения (СЖО) тем или иным образом связаны с необходимостью измерения параметров жидкостных сред [1]. В работах [2-5] для обеспечения безопасности пациентов предложены волоконно-оптические средства измерений параметров жидкостных сред. В начале процесса проектирования волоконно-оптических датчиков скорости жидкостных потоков (ВОДСЖП) встает задача оценки чувствительности преобразования оптических сигналов, первоначального экспресс-определения вида функции преобразования ВОДСЖП. Основными недостатками известных способов и средств для воспроизведения и измерения расхода жидкости являются: сложность технической реализации, неоправданно высокая сложность проведения экспериментов, а также во многих случаях отсутствует возможность построения функции преобразования проектируемого датчика (таблица 1) [6-8].

Таблица 1. Известные технические решения устройств воспроизведения параметров жидкостного потока



Цель работы

Разработка простой установки воспроизведения параметров (скорости, расхода, объема, давления) различных типов жидкостей для экспресс-исследования, экспресс-градуирования ВОДСЖП жидкостных сред для систем жизнеобеспечения.

Методы и подходы

Авторы предлагают новую установку для измерения и воспроизведения параметров жидкостного потока, реализующую предложенный в работе [9] способ воспроизведения скорости жидкостного потока, основанную на использовании элементов волоконной оптики. Эта установка может быть использована для юстировки, градуировки,

экспресс-анализа, определения функции преобразования ВОДСЖП с сильфонным волоконно-оптическим преобразователем углового микроперемещения отражательного типа [10], погружной элемент которого соприкасается с жидкостным потоком [11] в живом сечении (плоскость, расположенная перпендикулярно скорости движения жидкости в средней точке потока) [12].

Результаты

На рисунке 1 приведена структурная схема, а на рисунке 2 – упрощенная конструкция установки.

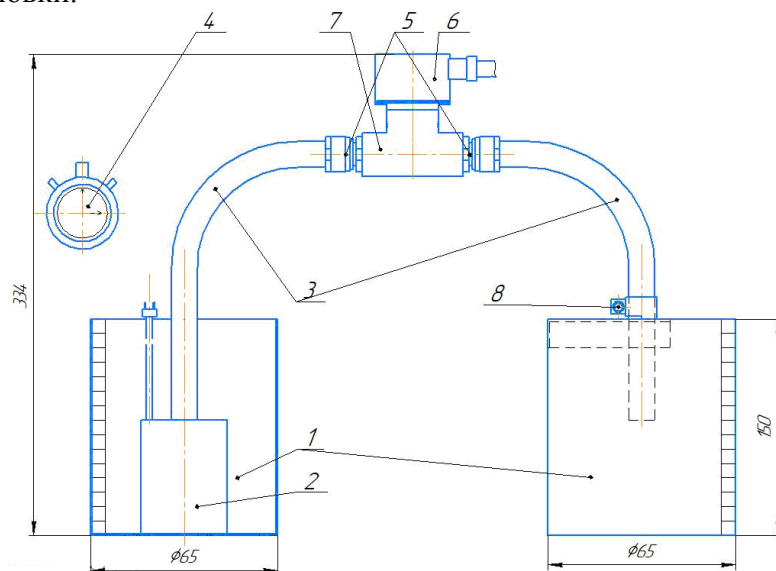


Рисунок 1. Конструкция установки

Установка включает следующие элементы: две прозрачные мерные емкости 1, отградуированные по высоте в значениях уровня жидкости с помощью шкалы длины, насос 2, трубопровод 3 с элементами стыковки с исследуемым датчиком 6, таймер 4, соединенный с пусковым устройством насоса.

На дно первой емкости 1 с жидкостью объемом V_1 помещают насос 2 (в частности используется погружной насос перекачки жидкости типа БелАК БАК.17538 [13], к которому присоединяют левую трубку 3, правую трубку 3 закрепляют на второй емкости 1 с помощью крепежного элемента 8. К концам труб прикрепляют фитинги 5.

Метод установки датчика 6 важен для получения точных и достоверных значений выходного сигнала датчика, поэтому для крепления в измерительной установке или непосредственно на трубопроводе на датчике предусмотрена резьба, размер которой может быть изменен в зависимости от диаметра трубопровода или по требованию заказчика, а также с помощью обжимных фитингов 5 (рисунок 2).

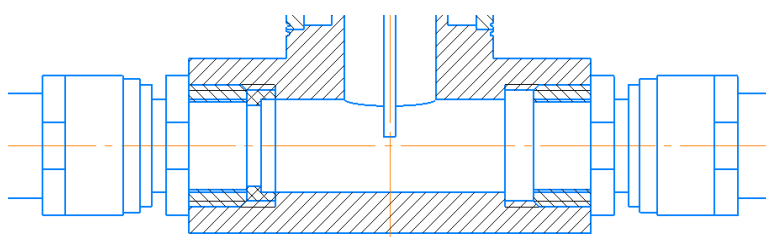


Рисунок 2. Элементы крепления датчика на трубопроводе

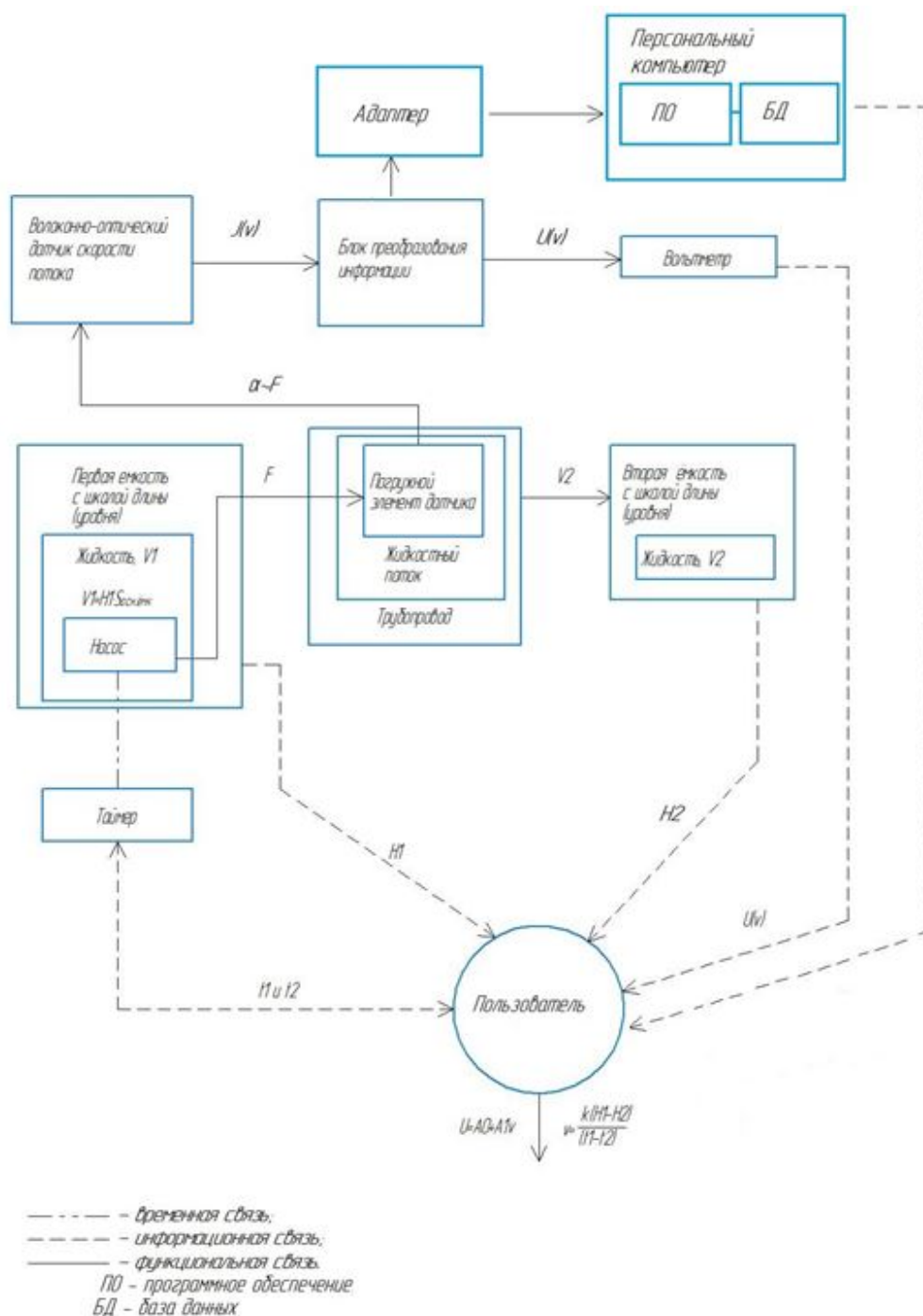


Рисунок 3. Структурная схема установки воспроизведения скорости жидкостного потока

Фитинги 5 обеспечивают быстрое и герметичное соединение датчика на трубопроводе. Сужающее устройство 7, например, диафрагма в виде колец с переменным с определенным шагом внутренним диаметром, позволяет изменять диаметр трубы в измеряемом участке. Оно укладывается в резьбу датчика 6 и затягивается штуцером 5. По закону Бернулли расход в трубопроводе является величиной постоянной, т.е. при изменении диаметра на измеряемом участке расход будет одинаков, а изменится давление и, как следствие, скорость потока.

Также в измерительную установку входят следующие компоненты для фиксации и отображения информации: волоконно-оптический датчик скорости жидкостных потоков, погружной элемент которого располагают на пути жидкостного потока, блок преобразования информации (БПИ), вольтметр, адаптер БПИ, персональный компьютер (ПК) с соответствующим программным обеспечением (ПО) и базой данных (БД) (рисунок 3).

Принцип действия установки основан на том, что через трубу известного поперечного сечения пропускают жидкостный поток, параметры которого определяют по изменению уровня жидкости в емкостях на входе или выходе трубопровода за фиксированный период времени [3]. При включении насоса 2, таймер 4 начинает отсчет времени с момента времени $t_1=0$, при выключении прекращает работу в момент времени t_2 , соответственно время работы определится как $\Delta t = t_2 - t_1$. Перед началом измерений фиксируется уровень H_1 жидкости в первой емкости. В конце измерений в момент времени t_2 во второй емкости фиксируется уровень H_2 . Скорость потока в трубопроводе рассчитывается по формуле: $v_{ном} = \frac{H_2 - H_1}{t_2 - t_1}$. Поток давит на погружной элемент с силой F , под дей-

ствием которой он отклоняется на угол α , что вызывает изменение оптических сигналов волоконно-оптического преобразователя угловых микроперемещений отражательного типа [10]. Электрический сигнал с выхода датчика поступает на вход на БПИ [13], который состоит из сумматора, делителя и вычислительного устройства. Сигнал с выхода БПИ подается или на вольтметр, или на адаптер БПИ, где сигнал окончательно оцифровывается и передается на ПК.

Информация с выхода вольтметра, ПК, таймера, градуировочных шкал двух емкостей поступает к экспериментатору, который в соответствии с программой исследований делает соответствующие выводы о ходе эксперимента.

С помощью специально разработанных программ в среде LabVIEW полученные результаты с датчика отображаются в наглядном для пользователя виде и записываются в базу данных.

Выводы. Предложенная конструкция установки для воспроизведения и измерения параметров жидкостных потоков (скорости, объема, расхода) обладает высокой технологичностью, имеет малые габаритные размеры, небольшую стоимость (зависит от необходимой мощности насоса), эти преимущества позволяют использовать установку для быстрой проверки датчика (например, на первых этапах проектирования). Устройство измерения параметров жидкостных потоков можно использовать в условиях воздействия радиации, электромагнитных помех.

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

- конструкция установки для воспроизведения и измерения параметров жидкостных потоков (скорости, объема, расхода);
- способ установки ВОДПЖС на трубопроводе системы жизнеобеспечения.

Литература

- 1 Серебряков В.Н. Основы проектирования систем жизнеобеспечения экипажа космических летательных аппаратов. – М.: Машиностроение, 1983. – 160 с.
- 2 Измерение расхода жидкости в системах жизнеобеспечения космонавтов/ Т.И. Мурашкина, Е.А. Бадеева, Е.А. Шачнева и др. / Медицинская техника. – 2015. – № 5. – С. 31–34.
- 3 Метрологическое обеспечение испытаний волоконно-оптических преобразователей угловых перемещений/ Т.И. Мурашкина, Е.А. Бадеева, Е.А. Шачнева и др. // Биотехносфера. – 2016. – №1 (43). – С. 21–25.

4 Методика моделирования волоконно-оптических датчиков расхода и параметров жидкостных потоков системы жизнеобеспечения космонавтов/ Т. И. Мурашкина, Е. А. Бадеева, Е. А. Шачнева и др.// Медицинская техника. – 2018. – №5. – С. 31-34.

5 Technological characteristics of assembly procedure for fiber-optic sensors of fluid media parameters / T.I.Murashkina, N.A.Khasanshina, E.A.Shachneva, E.A. Polyakova // Journal of Physics: Conference Series (JPCS): Vol. 1515 (2020) – 052060.

6 Патент на изобретение РФ 2282 830 Имитационный стенд для поверки вихревых водосчетчиков/М.С. Лурье, С.М. Плотников, В.Н. Волынкин, М.Ю. Елизарьева, О.М. Лурье// Опубликовано: 2006.08.27

7 Патент на изобретение РФ 2505788 способ измерения расхода жидкости/А.С. Новиков, И.Н. Смирнов, А.А. Яковлев//Опубликовано 27.01.2014.

8 Патент на изобретение РФ 2246704 Установка для поверки расходомеров и счетчиков жидкости/ В.Г. Тонконог, В.В. Глухов, А.Г. Коченков // Опубликовано: 20.02.2005.

9 Способ измерения параметров жидкостных потоков/ Т.И.Мурашкина, Е.А. Бадеева, Е.А. Шачнева и др.// Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии : материалы Межд. Конф. IT + M&Ec`2015 - 2015. Весенняя сессия. Под редакцией Е.Л. Глориозова. - М: Изд-во ООО «Институт новых информационных технологий» - С. 183-190.

10 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.

11 Патент на изобретение РФ 2741276 Волоконно-оптический датчик параметров жидкостных и воздушных потоков/ Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Д.И. Серебряков, Е.А. Шачнева, Н.А. Хасаншина// Опубликовано: 2021.01.22, бюл.3.

12 Рабинович, Е.З.; Евгеньев, А.Е. Гидравлика - М.: Недра; 1987 - 224 с.

13 <https://www.kuvalda.ru>.

14 Принципы построения, модели и конструкции волоконно-оптических датчиков давления отражательного типа /Бадеева Е.А., Мурашкина Т. И., Бростилова Т.Ю. // Модели, системы, сети в экономике, технике, природе и обществе. 2018. - №2 (24). – С. 96-106.

Сведения об авторах

Елена Александровна Бадеева

д-р. техн. наук, доцент
профессор кафедры бухгалтерский учет, налогообложение и аудит БУНиА

Пензенский государственный университет
Пенза, Россия

Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru

Татьяна Ивановна Мурашкина

д-р. техн. наук, профессор
профессор кафедры приборостроения
Пензенский государственный университет

Пенза, Россия

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Илья Евгеньевич Славкин

аспирант кафедры «Приборостроение»
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия

Эл. почта: ilya-slavkin@yandex.ru

Роман Викторович Костин

студент кафедры «Приборостроение»
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия

Эл. почта: roman_kostin_2017@mail.ru

Information about authors

Elena Alexandrovna Badeeva

doctor of technical Sciences, associate Professor
Professor of accounting, taxation and audit
Department

Penza state University
Penza, Russia

E-mail: badeeva_elena@mail.ru

Tatyana Ivanovna Murashkina

doctor of technical Sciences, Professor
Professor of instrument engineering Department
Penza state University

Penza, Russia

E-mail: timurashkina@mail.ru

Ilya Yevgenyevich Slavkin

Post-graduate student
Penza State University
Penza, Russia

E-mail: ilya-slavkin@yandex.ru

Roman Viktorovich Kostin

student
Penza State University
Penza, Russia

E-mail: roman_kostin_2017@mail.ru

Елена Андреевна Шачнева
Аналитик
Высшая школа экономики
Москва, Россия
Эл. почта: e_shachneva@mail.ru

Elena Andreevna Shachneva
Analyst
Higher School of Economics
Moscow, Russia
E-mail: e_shachneva@mail.ru

УДК 617-089.844
ГРНТИ 59.14, 59.31
DOI: 10.47501/978-5-6044060-0-7.04

**С.А. Еолчиян¹, Д.М. Чёлушкин¹,
М.М. Новиков², С.А. Черобыло²**

¹Национальный медицинский исследовательский центр нейро-хирургии имени академика Н. Н. Бурденко
²Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН – филиал ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

ПЕРСОНАЛЬНАЯ ЦИФРОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ КРАНИО-ОРБИТАЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ.

В статье рассматриваются вопросы формирования персонализированных цифровых моделей фрагментов лицевого скелета по данным компьютерной томографии пациента. Точные индивидуальные трехмерные модели, хирургические шаблоны и пресс-формы имплантатов, полученные с применением компьютерного моделирования и лазерной стереолитографии использовались для подготовки и выполнения реконструктивных вмешательств у 191 пациента со сложными кранио-орбитальными дефектами и деформациями. В ходе исследований была отработана специальная методика (“виртуальный карандаш”), позволяющая редактировать полутоновые изображения неповрежденных и поврежденных тонких стенок орбиты. Это позволило избежать дальнейших ошибок обработки данных при преобразовании файлов DICOM в трехмерную модель и получить реальную геометрию и правильные размеры дефектов поврежденной области. Таким образом, стало возможным проведение дооперационного планирования, моделирования отдельных этапов хирургического вмешательства, изготовления индивидуальных имплантатов для реконструкции черепа, орбиты и прилежащих отделов лицевого скелета. Как показывает наш опыт, системы автоматизированного проектирования и аддитивные технологии позволяют оптимизировать хирургическое лечение и повысить его точность и эффективность.

Ключевые слова: аддитивные технологии, лазерная стереолитография, компьютерная томография, кранио-орбитальный дефект, реконструктивная хирургия.

PERSONAL DIGITAL MODEL FOR CRANIO-ORBITAL INJURIES DIAGNOSTICS AND RECONSTRUCTIVE SURGERY.

**S.A. Eolchiyan¹, D.M. Chelushkin¹,
M.M. Novikov², S.A. Cherebylo²**

¹National Medical Research Center for Neurosurgery named after Academician N. N. Burdenko

²Institute on Laser and Information Technologies of RAS

– Branch of Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” of RAS

The paper deals with the formation of personalized digital models of facial skeletal fragments based on computed tomography data of the patient. Precise individual three-dimensional models, surgical templates, and implant molds obtained using computer modeling and laser stereolithography were used to prepare and perform reconstructive procedures in 191 patients with complex cranio-orbital defects and deformities. During the research, a special technique (“virtual pencil”) was developed, which allows you to edit halftone images of intact

and damaged thin walls of the orbit. This allowed us to avoid further data processing errors when converting DICOM files into a three-dimensional model and to obtain the real geometry and correct dimensions of the defects of the damaged area. Thus, it became possible to carry out preoperative planning, modeling of individual stages of surgical intervention, manufacturing of individual implants for the reconstruction of the skull, orbit and adjacent parts of the facial skeleton. Our experience shows that computer-aided design systems and additive technologies allow us to optimize surgical treatment and increase its accuracy and efficiency.

Keywords: *additive technology, laser stereolithography, computed tomography, cranio-orbital defect, reconstructive surgery.*

Введение

В клинической практике при травме черепа и лицевого скелета часто отмечают случаи изолированных и сочетанных повреждений костных структур орбиты. Реконструктивная хирургия кранио-орбитальных повреждений (КОП) остается до настоящего времени актуальной мультидисциплинарной проблемой. Восстановление анатомии и функций поврежденных структур требует точной трехмерной реконструкции зоны повреждения [1]. Возрастающие требования к качеству жизни пациентов заставляют хирурга искать новые инструменты, повышающие точность дооперационного планирования и выполнения хирургического вмешательства [2].

В основе диагностики и планирования хирургического лечения, пострадавших с КОП лежит спиральная компьютерная томография (КТ) высокого разрешения, которая является наиболее информативным методом. Полученная с использованием КТ-данных пациента точная трёхмерная реконструкция (персональная цифровая модель) улучшает пространственную визуализацию зоны повреждения [3]. Она также необходима для изготовления пластиковой копии зоны дефекта, проектирования и интраоперационного моделирования имплантата из различных биосовместимых материалов [4, 5].

Современные спиральные томографы высокого разрешения позволяют получить серию рентгеновских снимков (срезов) в аксиальной плоскости с заданного шага 0.2 – 0.5мм. Пространственное разрешение на томографических изображениях равняется одному пикселю, пределы которого для стандартных КТ обследований ограничено 0.2 мм. Используемые в настоящее время программные системы обработки КТ данных не могут правильно распознать тонкостенные (менее 0.1-0.3 мм) структуры орбиты как костную ткань и преобразовать их в трехмерную модель [6, 7]. Нижняя, медиальная и, частично, верхняя стенки орбиты на томограммах имеют прерывистое изображение, что может стать причиной диагностических ошибок [8]. Такие ошибки при построении трехмерной модели дают ложные отверстия диаметром до десяти и более миллиметров, в зависимости от возможностей и настроек томографа и установки порога отсека мягких тканей. Увидеть истинные границы переломов и дефекта стенок орбиты возможно, лишь убрав эти ложные пропуски.

В настоящей работе представлено описание разработанной методики получения персональной цифровой модели с использованием отредактированных двухмерных изображений тонкостенных структур орбиты на поврежденной и интактной стороне. Это позволило получать цифровую модель с корректным отображением всей области повреждения, проводить дооперационное планирование, создавать точные имплантаты для устранения дефектов свода черепа, прилегающих отделов орбиты и лицевого скелета.

Материалы и методы

Всего с 2002 по 2018 гг. у 191 пациента с травматическими дефектами и деформациями кранио-орбитальной области в НМИЦ нейрохирургии первым автором были выполнены реконструктивные вмешательства с использованием компьютерного моделирования и лазерной стереолитографии. Восстановление тонкостенных структур ор-

биты (нижняя и медиальная стенки) выполнено у 149 из них. Возраст пациентов варьировал от 5 до 51 года.

В ходе исследования был определён алгоритм взаимодействия хирурга и технического специалиста по созданию персональной цифровой модели черепа, орбиты и прилегающих отделов лицевого скелета и подготовке к операции. После верификации диагноза на основании данных объективного осмотра и КТ исследования хирургом определялись показания к реконструктивному вмешательству. Для создания максимально информативной цифровой модели техническим специалистом вначале проводилось последовательное редактирование каждого среза КТ с изображением тонкостенных структур орбиты. С помощью "виртуального карандаша" в различных проекциях (аксиальной, сагиттальной и коронарной) обводились (прорисовывались) границы костных структур, формирующих медиальную, нижнюю и верхнюю стенки с увеличением их толщины на интактной и поврежденной стороне. В области истинного дефекта границы раздела темно- и светло-серого оттенков отсутствуют. Затем КТ данные обрабатывались с помощью программы Mimics фирмы Materialise (Бельгия) для преобразования в трехмерную компьютерную модель в STL формате, который используется на установках лазерной стереолитографии.

Шаблоны имплантатов для устранения дефектов получали на основе «зеркального» отображения интактной стороны на поврежденную зону и проведения булевых операций с моделью. Следующий этап – изготовление пластиковой копии индивидуальной цифровой модели черепа пациента с точным воспроизведением имеющихся дефектов и деформаций, а также шаблонов и пресс-форм высокоточных имплантатов для их устранения с помощью лазерной стереолитографии. Пластиковые модели и пресс-формы имплантатов стерилизовались и использовались во время операции.

Полученные результаты

Редактирование DICOM файлов позволило избежать ошибок при построении трехмерной модели, приводящих к формированию ложных отверстий, и визуализировать истинные границы дефектов стенок орбиты на персональной цифровой модели (рис 1).

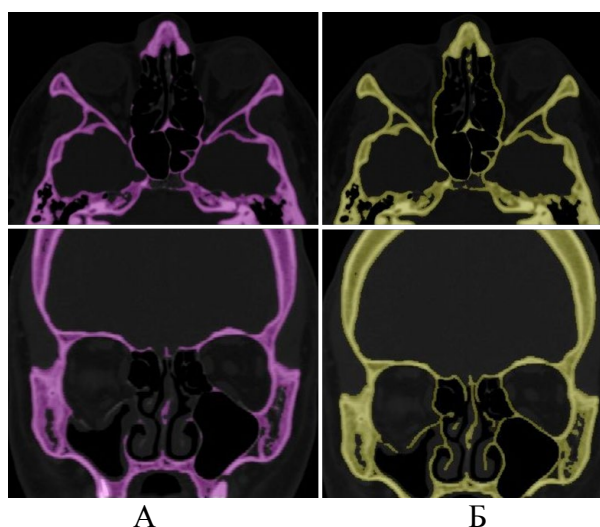


Рисунок 1. Срезы КТ исследования (аксиальные и сагиттальные)

А - до редактирования стенок орбиты

Б – после редактирования стенок орбиты

Рисунок 2 показывает различие между трехмерными компьютерными моделями, созданными до и после редактирования данных КТ исследования с прорисовкой стенок орбиты.

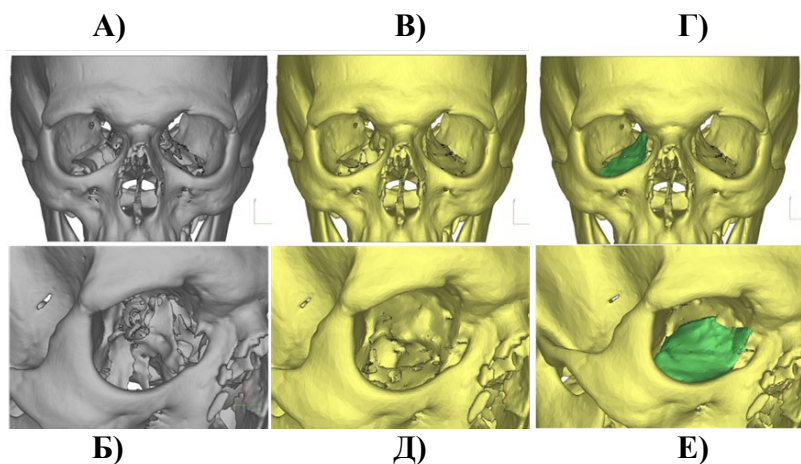


Рисунок 2. Трехмерные компьютерные модели, создаваемые по данным КТ исследования: А, Б – до редактирования стенок орбиты; В, Д – после редактирования с прорисовкой стенок орбиты; Г, Е – зеркальное отображение intactной нижней стенки орбиты на поврежденную сторону.

На рисунке 3 представлена стереолитографическая модель черепа высокой степени точности, изготовленная с использованием цифровой модели, полученной по редактированным КТ изображениям.

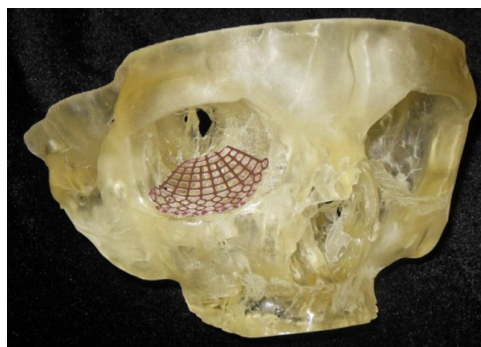


Рисунок 3. Стереолитографическая модель, изготовленная с использованием цифровой модели, полученной по редактированным КТ изображениям.

Смоделированный до операции сетчатый титановый имплантат установлен в области дефекта нижней стенки правой орбиты.

В ходе операции во всех случаях была подтверждена высокая информативность стереолитографических моделей черепа и лицевого скелета, изготовленных с применением редактированных DICOM файлов, реалистично отображающих костные повреждения и дефекты тонкостенных структур орбиты (рисунок 4).

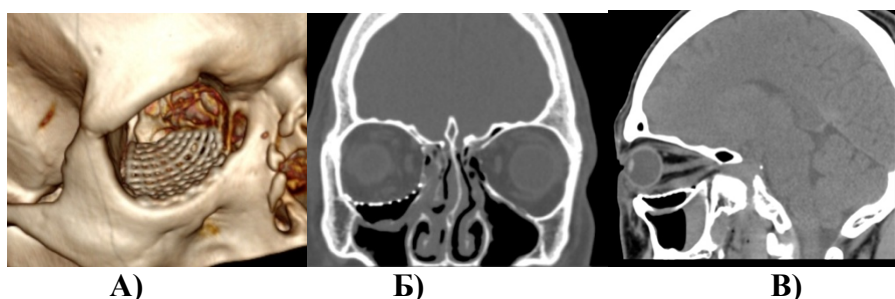


Рисунок 4. Послеоперационное КТ-исследование: А) 3D-реконструкция. Б) Фронтальный срез. В) Сагиттальный срез.

При дооперационном планировании вмешательства на цифровой модели и ее пластиковой копии проводилась имитация хирургических манипуляций: намечались линии остеотомии, направление перемещения фрагментов переломов, их репозиция и

фиксация. Также изготавливали имплантаты из титановой сетки и шаблоны для забора костных аутотрансплантатов со свода черепа различной формы и размеров, в зависимости от геометрии дефекта. Непосредственно во время вмешательства использовали хирургические шаблоны и пресс-формы для изготовления индивидуальных имплантатов из полиметилметакрилата или титановой сетчатой пластины.

Выводы

В середине 1990-х годов развитие новых методов диагностики - компьютерной и магниторезонансной томографии, а также систем компьютерного моделирования и аддитивного производства позволило начать разработку и внедрение в практику новых технологий хирургического лечения. Первоначально они назывались Image Guided Surgery, а затем Computer Aided или Assisted Surgery (CAS). Такие технологии позволяют решить задачи автоматизированного сопровождения работы хирурга и повысить её эффективность. Реконструктивная хирургия черепа и лицевого скелета является одной из наиболее перспективных областей применения CAS-технологий [9, 10]. Подготовка оперативного вмешательства при этом проводится хирургами совместно с техническими специалистами.

На этапе дооперационного планирования применяются специальные программы обработки данных КТ высокого разрешения. Для изготовления физических моделей повреждённой анатомической области, хирургических шаблонов, пресс-форм для индивидуальных имплантатов и самих имплантатов используются различные прикладные программные системы автоматизированного моделирования и производства, включая аддитивные технологии [10, 11]. Такой подход к проведению хирургического лечения позволяет повысить уровень безопасности пациента и снизить риск послеоперационных осложнений [12, 13]. При сложных приобретенных дефектах и деформациях кранио-орбитальной области компьютерное моделирование и лазерная стереолитография имеет преимущество перед КТ-исследованием при планировании и проведении реконструктивного вмешательства и позволяет улучшить качество хирургического лечения [4, 13-16]. Необходимым условием для этого является достаточная точность персональной цифровой модели и пластиковой копии.

Применение предложенной нами методики редактирования КТ изображений позволяет получить цифровую модель для изготовления стереолитографической модели черепа и лицевого скелета высокой степени точности, что дает возможность восстановить геометрию стенок орбиты и смоделировать индивидуальный имплантат правильной формы до операции или во время её проведения. Это значительно облегчает работу хирурга, сокращает время вмешательства и повышает качество хирургического лечения.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Предложенная методика редактирования данных КТ тонкостенных структур орбиты позволяет избежать диагностических ошибок, обусловленных ограниченностью пространственного разрешения каждого среза, превышающего толщину медиальной, нижней и частично верхней стенок орбиты. Это позволяет добиться более высокой точности воспроизведения размеров и конфигурации дефектов тонкостенных структур орбиты, что, в свою очередь, повышает точность имплантатов для их устранения и дает возможность хирургу получить предсказуемый хороший функциональный и эстетический результат. Применения аддитивных технологий и предварительно планирования позволяет значительно сократить время операций, повысить точность и эффективность хирургического вмешательства, сократить время послеоперационного восстановления пациента.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 18-29-03238. Авторы признают поддержку Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в области лазерной стереолитографии.

Цитируемая литература

1. Stoor P., Suomalainen A., Lindqvist C., Mesimäki K., Danielsson D., Westermarck A., Kontio R.K. Rapid prototyped patient specific implants for reconstruction of orbital wall defects, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2014, Vol. 42, P.1644-1649.
2. Sharaf B, Levine J, Hirsch D, Bastidas J, Schiff B, Garfein E. Importance of computer- aided design and manufacturing technology in the multidisciplinary approach to head and neck reconstruction. *Journal of Craniofacial Surgery* 2010; Vol. 21(4), P.1277-1280.
3. Новиков М. М. Внук В. В. Ипполитов Е. В. Черобыло С. А. Проблемы формирования персонализированных цифровых моделей по томографическим данным пациента. *Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2019, 2019, С. 26-31, <https://elibrary.ru/item.asp?id=38571220>.*
4. Еолчийн С.А., Шамсудинов А.Г., Лимберг Ал.А., Потапов А.А. Современный подход к диагностике и хирургическому лечению черепно-лицевой травмы. *Российский стоматологический журнал, 2003, № 5, С.37-42.*
5. Еолчийн С.А. Пластика сложных дефектов черепа имплантатами из титана и полиэтерэтеркетона (ПЕЕК), изготовленными по CAD/CAM технологиям. *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н.Бурденко, 2014, № 78(4), С.3-13.*
6. Jones D. E. P., Evans J. N. G. "Blow-out" Fractures of the Orbit: An Investigation into their Anatomical Basis, *The Journal of Laryngology Otology, 1967, Vol. 81, No. 10 P. 1109-1120.*
7. Straker C. A., Hill J. C. Management of orbital blow-out fractures, *SAMT 1989, Vol 76, P.535-537.*
8. Radnionok A., Asipovich V., Dudzich A., Krasilnikova V., Nikolayeu A., Yashin K. Algorithm of processing microspiral ct-scan results for constructing a three-dimensional model of orbit thin bones, *Journal of Engineering Science 2018, Vol. XXV, No. 4, P. 39 - 46.*
9. Eero Huottilainen, Markku Paloheimo, Mika Salmi, Kaija-Stiina Paloheimo, Roy Björkstrand, Jukka Tuomi, Antti Markkola, Antti Mäkitie Imaging requirements for medical applications of additive manufacturing *Acta Radiologica 2014, Vol. 55, No. 1, P. 78–85.*
10. Hou J, Chen M, Pan C et al. Immediate Reconstruction of Bilateral Mandible Defects: Management Based on Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing Rapid Prototyping Technology in Combination with Vascularized Fibular Osteomyocutaneous Flap. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2011; Vol. 69; P. 1792-1797/*
11. Tack P., Victor J., Gemmel P., Annemans L. 3D printing techniques in a medical setting: a systematic literature review, *BioMedical Engineering OnLine 2016. DOI10.1186/s12938-016- 0236- 4*
12. Потапов А.А., Корниенко В.Н., Кравчук А.Д., Лихтерман Л.Б., Охлопков В.А., Еолчийн С.А., Гаврилов А.Г., Захарова Н.Е., Яковлев С.Б., Шурхай В.А. Современные технологии в хирургическом лечении последствий травмы черепа и головного мозга. *Вестник РАМН, 2012, № 9, С.31-38.*
13. А.Д. Кравчук, А.А. Потапов, В.Я. Панченко, В.С. Комлев, М.М. Новиков, В.А. Охлопков, А.Д. Маряхин, В.Г. Дувидзон, Я.А. Латышев, Д.М. Чёлушкин, С.А. Чобулов, А.П. Александров, А.Н. Шкарубо. Аддитивные технологии в нейрохирургии, *Вопросы нейрохирургии им. Н.Н.Бурденко, 2018, № 82 (6), С. 97-104.*
14. Huottilainen E, Paloheimo M, Salmi M, Paloheimo K-S, Björkstrand R, Tuomi J, Markkola A, Mäkitie A. Imaging requirements for medical applications of additive manufacturing. *Acta Radiologica. 2014, Vol. 55(1), P.78-85. <https://doi.org/10.1177/0284185113494198>*

15. Antony A, Chen W, Kolokythas A, Weimer K, Cohen M. Use of virtual surgery and stereolithography-guided osteotomy for mandibular reconstruction with the free fibula. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery 2011, Vol. 128(5), P.1080-1084.

16. Lethaus B, Poort L, Böckmann R, Smeets R, Tolba R, Kessler P. Additive manufacturing for microvascular reconstruction of the mandible in 20 patients. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 2012, Vol. 40, P. 43-46.

Сведения об авторах

Сергей Азникович Еолчиан

ст. науч. сотр., нейрохирург

*Национальный медицинский исследовательский центр
нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко
Москва, Россия*

Эл. почта: Seolch@nsi.ru

Данил Михайлович Чёлушкин

аспирант

*Национальный медицинский исследовательский центр
нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко
Москва, Россия*

Эл. почта: danil.chelushkin@gmail.com

Михаил Михайлович Новиков

ст. науч. сотр.

Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН – филиал ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН»

Шатура, Московская обл., Россия

Эл. почта: novikov@rambler.ru

Светлана Александровна Черыбыло

науч. сотр.

Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН – филиал ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН»

Шатура, Московская обл., Россия

Эл. почта: Svetlana.cherebylo@rambler.ru

Information about authors

Sergey A. Eolchiyan

MD, Post-PhD. Neurosurgeon, Senior staff member

N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery

Moscow, Russian Federation

E-mail: Seolch@nsi.ru

Danil M. Chelushkin

Post-graduate student

N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery

Moscow, Russian Federation

E-mail: danil.chelushkin@gmail.com

Mikhail M. Novikov

senior researcher

Institute on Laser and Information Technologies of RAS – Branch of Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” of RAS,

Shatura, Moscow region, Russia

E-mail: novikov@rambler.ru

Svetlana A. Cherebylo

Researcher

Institute on Laser and Information Technologies of RAS – Branch of Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” of RAS,

Shatura, Moscow region, Russia.

E-mail: Svetlana.cherebylo@rambler.ru

УДК 671.373

ГРНТИ 29.33.51

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.05

Кортунов В.Н., Дмитриев А.К., Коновалов А.Н., Ульянов В.А.

ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

ИНДЕНТИФИКАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЕЙ АВТОДИННЫМ МЕТОДОМ

Представлены результаты исследований лазерного испарения моделей здоровых и опухолевых биологических тканей автодинным методом. Показано, что уровень автодинного сигнала изменяется в разной степени в зависимости от типа испаряемых здоровых и опухолевых тканей.

Ключевые слова: *СО₂ лазер, автодинное детектирование, здоровая ткань, опухоль, испарение, диагностика.*

IDENTIFICATION OF TUMOR TISSUES BY AUTODYNE METHOD

The results of study of laser evaporation of models of healthy and tumoral biological tissues by autodyne method are presented. It is shown the level of autodyne signal varies in different degrees depending on the type of healthy and tumoral biotissues at its laser evaporation.

Keywords: CO₂ laser, autodyne detection, healthy tissue, tumor, evaporation, diagnostics.

Введение

Для диагностики процессов испарения биотканей излучением одномодовых CO₂ лазеров, наиболее широко распространенных в медицинской практике, нами предложен метод лазерной доплеровской спектроскопии, основанный на автодинном детектировании (прием на резонатор лазера CO₂ лазера) обратно рассеянного излучения из зоны воздействия излучения [1, 2]. В этом методе операционное лазерное излучение одновременно является и диагностическим, создающим оптико-информационный канал для обратной связи. Предметом анализа является автодинный сигнал - модуляция выходного излучения лазера в результате рассеяния излучения с доплеровским сдвигом частоты на выносимых из зоны воздействия продуктах разрушения биотканей. Оперативная диагностика процессов лазерного рассеяния, перфорации или испарения биотканей по автодинному сигналу и его производным (доплеровский спектр, мощность сигнала, его средне-взвешенная частота) состоит в выявлении различий и характерных особенностей амплитудно-частотных характеристик автодинного сигнала для различных типов испаряемых биотканей.

Такой метод позволяет контролировать процесс испарения опухолевой ткани в реальном времени при удалении новообразований различных типов. Предпосылкой для реализации такого подхода является то, что опухолевые ткани могут отличаться от здоровых по структуре, водосодержанию, плотности, оптическим и др. свойствам [3]. Это дает возможность обеспечить полное прецизионное удаление пораженных тканей и избежать излишней тепловой травматизации здоровых тканей.

Цель работы

Целью данной работы является исследование различий в автодинных сигналах в процессе лазерного испарения здоровых и опухолевых биотканей *in vitro* применительно к задачам лазерного испарения злокачественных поверхностных новообразований.

Методы и материалы

Схема метода диагностики процесса лазерного испарения биотканей по автодинному сигналу представлена на рис. 1.

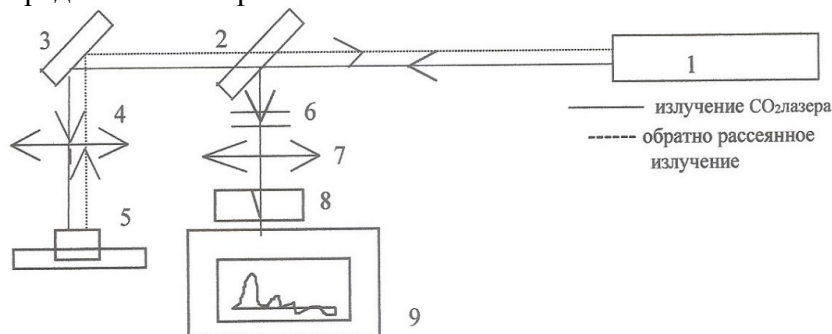


Рис. 1. Схема автодинного детектирования обратно рассеянного излучения.

1 - одномодовый CO₂ лазер, 2 - светоделитель, 3 - зеркало, 4, 7 - линза, 5 – образец биоткани, 6 - ослабитель, 8 – ИК фотоприемник, 9 - компьютер.

Излучение одномодового CO₂ лазера 1 фокусируется на поверхность образца биоткани 5 с помощью линзы 4. Часть лазерного излучения светоделителем 2 отводится на КРТ приемник 8. Сигнал от фотоприемника подается через плату АЦП на компьютер 9 и регистрируется. Такой оптико-информационный канал используется для записи автодинного сигнала. Эксперименты проводились с использованием установки на базе одномодового лазера CO₂ мощностью 20 Вт серии «Ланцет».

В качестве объектов воздействия лазерного излучения использовались биомодели на основе желатина, свежеприготовленные образцы тканей *in vitro* животных (крыс, собак). Желатиновые модели имитировали мягкие биоткани с различным водосодержанием, что обеспечивалось весовой долей воды в этих моделях. Использовались двух- и трехслойные желатиновые мишени с различным содержанием воды в каждом слое - от 90% до 60%. В экспериментах *in vitro* использовались образцы тканей злокачественных и доброкачественных опухолей вместе с участками здоровой ткани. Изъятие образцов тканей животных проводилось в Московском научно-исследовательском онкологическом институте.

Лазерное рассеяние биомоделей осуществлялось с одновременной регистрацией автодинного сигнала из зоны лазерного воздействия. Для этого образцы размещались на подвижном координатном столике и равномерно перемещались со скоростью 0,5-1 мм/с при мощности излучения 5-10 Вт и его фокусировке на поверхность образца ткани.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлена зависимость изменения мощности автодинного сигнала при лазерном рассеянии трехслойной желатиновой модели с весовым содержанием воды в слоях: 90%/80%/90%. Как следует из рисунка, уровень автодинного сигнала меняется в 1,5-3 раза в зависимости от степени водосодержания в слоях данной модели и отражает момент перехода излучения с одного слоя на другой.

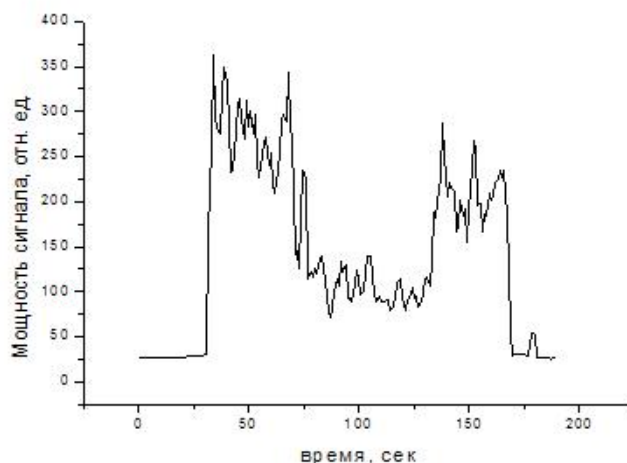


Рис.2. Зависимость изменения мощности автодинного сигнала при лазерном рассеянии трехслойной желатиновой модели с весовым содержанием воды в слоях: 90%/80%/90%.

На рис. 3 и 4 представлены зависимости изменения мощности автодинного сигнала при лазерном рассеянии кожи скальпа собак, пораженной меланомой и базалиомой. Как следует из представленных зависимостей, автодинный сигнал от опухолевой ткани существенно отличается в случае испарения базалиомы и в меньшей степени – при меланоме.

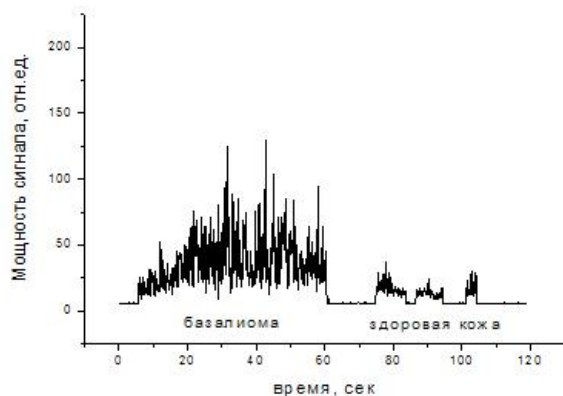


Рис. 3. Лазерное рассеяние скальпа собаки, пораженного базалиомой, с переходом излучения с участка опухоли на здоровую кожу.

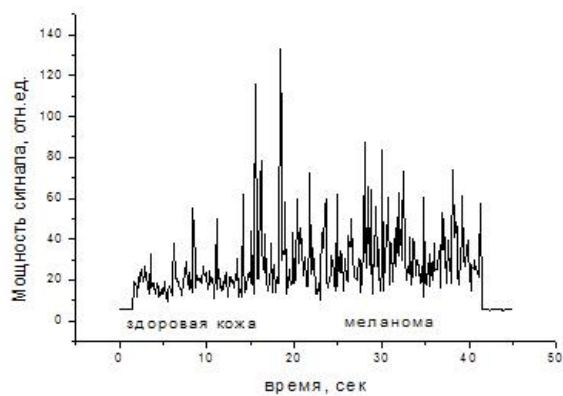


Рис. 4. Лазерное рассеяние скальпа собаки, пораженного меланомой, с переходом излучения с участка здоровой кожи на опухоль.

На рис. 5 представлена зависимость изменения мощности автодинного сигнала при лазерном рассеянии образца мышечной ткани бедра крысы. с привитой опухолью. Видно существенное различие в автодинных сигналах от здоровой и опухолевой тканей.

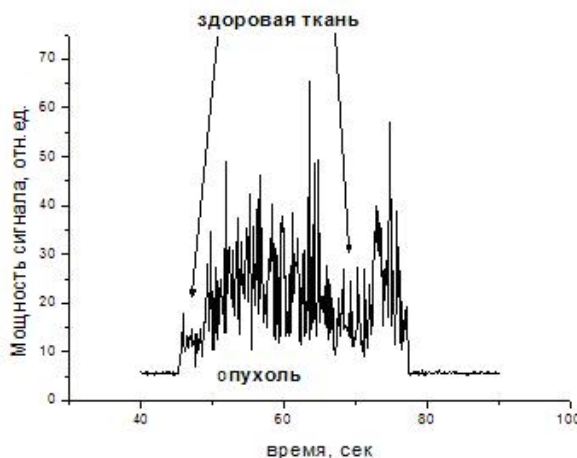


Рис.5. Лазерное рассеяние тканей бедра крысы.

Известно, что для опухолевых тканей по сравнению со здоровыми характерны структурно- тканевый атипизм, биохимический атипизм и различие в оптических свойствах [3-5]. Для структурно - тканевого атипизма характерно то, что опухолевые клетки не могут формировать нормальные функциональные тканевые структуры, опухолевые клетки хаотично расположены. Любая опухоль, как и здоровая ткань, состоит из паренхимы и стромы. В опухолевой ткани нарушено соотношение между ними. В зависимости от этого соотношения опухоли могут иметь как мягкую консистенцию, так и очень плотную. Биохимический атипизм проявляется, в частности, в том, что в большинстве опухолей содержание воды существенно больше, чем в окружающих здоровых тканях. Избыточное накопление жидкости в межклеточном пространстве опухолей является следствием нарушения обмена воды. Вышеописанные различия между здоровыми и опухолевыми тканями создают предпосылки для их диагностики автодинным методом при лазерном испарении этих тканей.

Выводы

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

Показана перспективность применения метода автодинной диагностики процесса лазерного испарения биотканей применительно к задачам лазерного удаления злокачественных новообразований.

На основе данного метода диагностики могут быть разработаны новые подходы и методики проведения прецизионных малотравматичных и органосохранных лазерных операций. *Работа выполнена при поддержке Министерства науки в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части развития методов диагностики лазерного испарения биотканей и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-02069-мк) в остальной части.*

Литература

1. A. N. Konovalov and V. A. Ul'yanov, "Self-mixing detection of backscattered radiation in single-mode pulse-periodic CO2 lasers," Appl. Opt. 51, 3900–3906 (2012).
2. Dmitriev A.K., Konovalov A.N., Kortunov V.N., Ulyanov V.A. Possibilities for organizing feedback on the Doppler backscattering signal in surgical CO2 lasers // Journal of Laser Applications, 32, 022073 (2020).
3. В.И. Чиссов. Онкология. Национальное руководство. М., Геотар-Медиа, 544 с.
4. И.Г. Закурдяева, А.Ф. Цыб. Метастатическая меланома кожи (обзор литературы). Сибирский онкологический журнал, № 6(42), 56-62, (2010).
5. В.А.Горбунова. Новые подходы в лечении сарком мягких тканей. Онкологический журнал, №2, 18-26, (2012).

Сведения об авторах

Владимир Николаевич Кортунов

науч. сотр.

Эл. почта: vnkor@yandex.ru

Александр Константинович Дмитриев

науч. сотр.

Эл. почта: dmitriev_a62@mail.ru

Алексей Николаевич Коновалов

канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: alex_konov@mail.ru

Валерий Андреевич Ульянов

канд. тех. наук, вед. науч. сотр.

Эл. почта: vaul595@mail.ru

ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

Москва, Россия

Information about authors

Vladimir Nikolaevich Kortunov

Researcher

E-mail: vnkor@yandex.ru

Alexandr Konstantinovich Dmitriev

Researcher

E-mail: dmitriev_a62@mail.ru

Alexsey Nikolaevich Konovalov

senior researcher, candidate of sciences

E-mail: alex_konov@mail.ru

Valerii Andreevich Ulyanov

leading researcher, candidate of sciences

E-mail: vaul595@mail.ru

FRC "Crystallography and Photonics" RAS

Moscow, Russia

КОНЦЕПЦИЯ РАЗРАБОТКИ МЕДИЦИНСКОЙ ИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Непрерывное совершенствование программно-аппаратных платформ позволяет значительно расширить возможности разработки современных медицинских информационных систем (МИС) выйти на качественно новый уровень, связанный с переходом к созданию универсальных кроссплатформенных веб-приложений.

В статье рассмотрена концепция разработки МИС для диагностики острых лейкозов (ОЛ) и минимальной остаточной болезни (МОБ) через комплексную интеграцию систем на основе лазерной проточной цитофлуориметрии, интеллектуальной компьютерной микроскопии и экспертного нейросетевого анализатора (интегрированный метод диагностики гемобластозов) для распознавания изображений бластных клеток на основе сформированной референсной базы знаний. При постановке диагноза данная МИС позволит врачам непосредственно через интерфейс системы работать с информацией о пациентах сравнивая данные о новых пациентах с изображениями экспертной базы данных с последующей генерацией диагностического заключения по результатам выполненных исследований. Безопасность данных в системе обеспечивается регламентом администрирования веб-сервера и разделением прав доступа для различных категорий пользователей. МИС обеспечивает возможность комплексных диагностических исследований пациентов принятие решений о тактике проводимого лечения.

Ключевые слова: Медицинская информационная система, веб-приложение, диагностика острых лейкозов, классификация клеток костного мозга и крови, минимальная остаточная болезнь.

V.V. Dmitrieva, E.V. Polyakov

National Research Nuclear University MEPhI

THE MEDICAL INFORMATION SYSTEM CONCEPT FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA DIAGNOSING

Continuous improvement of software and hardware platforms makes it possible to significantly expand the development capabilities of modern medical information systems (MIS) to reach a qualitatively new level associated with the transition to the creation of universal cross-platform web-applications.

The article discusses the concept of the implementation of MIS for the diagnosis of acute leukemia (AL) and minimal residual disease (MRD) through the complex integration of systems based on laser flow cytometry (an integrated method for diagnosing hemoblastosis), intelligent computer microscopy based on expert neural network analyzer for recognition of blast cell images based on formed reference knowledge base. When making a diagnosis, this MIS will allow doctors to work with information about patients directly through the system interface by comparing data about new patients with images of an expert database and then subsequent generate the diagnostic conclusion based on the results of the studies performed.

Data security in the system is ensured by the web server administration regulations and the division of access rights for various categories of users. MIS provides an opportunity for a comprehensive diagnostic study of patients making decisions about the tactics of treatment.

Keywords: Medical information system, Web application, diagnosis of acute leukemia, classification of bone marrow and blood cells, minimal residual disease

Введение

В последние годы в развитии современных информационных технологий в медицине обозначилась тенденция к росту числа лечебно-диагностических МИС (ориентированных на помощь врачу в лечебно-диагностическом процессе) [1-2]. Современные МИС используются в рамках автоматизации деятельности конкретно лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) и их функциональность должна поддерживать функционал учреждения и вписываться в организационные рамки профильных ЛПУ. При этом необходимо учитывать, особенности и специфику медицинской информации как данных о здоровье пациентов и ходе лечебно-диагностического процесса, содержащихся в МИС, с одной стороны, так и информации, составляющей сущность самой МИС как информационной системы: коды программных модулей, реализующих организацию хранения и обработку данных; содержимое внутрисистемных справочников и т.д. В связи с этим становится весьма актуальным аспект информационной безопасности и обеспечения защиты информации от несанкционированного доступа, потери и искажения данных. База данных медицинской информационной системы содержит критически важную информацию, от которой, по сути, зависит жизнь человека, поэтому одним из ключевых факторов при проектировании и разработке МИС является обеспечение целостности базы данных и мониторинг за функциональным состоянием системы [3-10].

Разработка моделей и методов диагностики

При разработке концепции МИС был реализован прототип интегрированного метода диагностики гемобластозов, реализованный на основе интеграцией систем интеллектуальной компьютерной микроскопии и лазерной проточной цитофлуориметрии. Распознавание полученных изображений клеток костного мозга выполняется на основе сформированной референсной базы знаний [11] с использованием экспертных оценок [12]. В системе распознавания в составе МИС реализован модуль предсказаний, позволяющий определять класс клетки. Для определения используется сверточная нейронная сеть, построенная на базе «Tensorflow». Данный модуль получает на вход изображение клетки, которое должно быть предварительно очищено от цитоплазмы (клетка на белом фоне). В дальнейшем система производит сличения и выдает результат о принадлежности к одному из девяти классов (миелоцит, сегментоядерный нейтрофил, нормобласт, палочкоядерный нейтрофил, бласт, лимфоцит, моноцит, метамиелоцит, эозинофил). Также в системе предусмотрена возможность проводить классификацию клеток на изображениях с препаратов костного мозга на основе методов классификации без применения нейронной сети. Распознавание проводится на основе анализа морфологических [13], текстурных [14] и вейвлет-характеристик [15].

Выбор архитектуры и технологической платформы

При выборе системотехнических решений для построения МИС можно использовать централизованную или распределенную топологию, для различных вариантов локальной или облачной архитектуры МИС. Возможен синтез локальных и облачных решений – с так называемой гибридной архитектурой. Выбор архитектуры зависит как от решаемой задачи, так и от доступных информационных технологий. Последнее время всё большее внимание уделяется облачным архитектурам и веб-приложениям на их основе. Это объясняется такими преимуществами облачных систем, как *универсальность доступа* с любого устройства (компьютера, планшета или смартфона), подключенного к Интернету; *кроссплатформенность* – веб-приложения работают на всех платформах и исключают необходимость разработки приложения отдельно для Android и iOS и исключают необходимость клиентского программного обеспечения, за исключением веб-браузеров; *сетевая безопасность, масштабируемость, защита от потери данных* – данные пользователей хранятся в «облаке», за целостность которого отвечают хостинг-

провайдеры и защищены от потери при повреждении жесткого диска компьютера. К недостаткам облачных решений на основе веб-приложений можно отнести зависимость от интернет-соединения, сложная или невозможная реализация комплексного программного обеспечения, требующего значительных затрат системных ресурсов (например, 3D моделирование).

Выбор и создание технологической платформы МИС, включая выбор СУБД, основывается на технологических возможностях средств, удобстве работы и наличии специалистов соответствующей квалификации как на стадии разработки, так и на стадии эксплуатации МИС. При выборе СУБД, важнейшими факторами являются надежность, быстродействие, масштабируемость, перспективы развития, наличие технической поддержки со стороны компании-производителя, не маловажными также являются ценовые показатели эксплуатации системы.

Для МИС диагностики острых лимфобластных лейкозов, с учётом использования облачной архитектуры, для хранения данных используется СУБД PostgreSQL данные получаемые со стороны сервера (DjangoRestFramework) посредством извлечения из структуры данных об изображении, затем эти данные передаются серверной стороной пользовательской стороне, на которой расположен Angular CLI, производит над ними манипуляции необходимые для визуального представления конечному пользователю.

Разработка системы поддержки принятия решений при диагностике острого лейкоза велась на локальном компьютере со стандартными характеристиками (ОС Windows 10 64-bit, Процессор Intel Core i5-6500 3.3GHz с 16 Гб оперативной памяти).

Модель взаимодействия с пользователями и особенности интерфейса

При разработке МИС следует учитывать, что к отдельным фрагментам медицинской информации доступ может получать медицинский персонал различного профессионального уровня и квалификации: врач, диагност, лаборант, медсестра и др. При этом доступ к информации (разделам и фрагментам медкарты пациента) должен предоставляться каждой категории пользователей с учётом соответствующих должностных полномочий.

В рамках веб-приложения с "тонким" клиентом взаимодействие пользователя с приложением реализуется, в существенной степени, через сервер, что требует отправки данных на сервер, получение ответа от сервера и перезагрузку страницы на стороне клиента. В дальнейшем, для увеличения быстродействия веб-приложения целесообразно применение Аjax-технологии, позволяющей обращаться к серверу, не перезагружая при этом всю страницу, реализующей динамическую подгрузку содержимого только обновляемых компонентов веб-страницы.

Архитектура и функциональность медицинской информационной системы реализует добавление/удаление/изменение персональных данных, проведение исследований с применением интеллектуального модуля и выдача результата анализа, приемов пациентов. Функционал, ориентированный на работу с пациентами достаточно обширен и включает в себя следующие пункты:

1. добавление и редактирование информации о пациенте;
2. создание первичного приема и открытие медицинской карты;
3. использование СППР при создании миелограммы;
4. назначение на иммунофенотипирование на вторичном приеме;
5. создание отчёта по результатам иммунофенотипического анализа.

Заключение

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

- концептуально рассмотрен новый уровень разработки современных МИС, связанный с переходом к созданию универсальных кроссплатформенных веб-приложений на базе облачных архитектурных решений;

- как вклад в разработку, принципиально новой концептуальной основы в разработке и применении лечебно-диагностических МИС, выполнена работа по комплексной интеграции методов лазерной проточной цитофлуориметрии и компьютерной микроскопии с системой поддержки принятия решений (СППР) на основе экспертного нейросетевого анализатора для распознавания патологий при диагностике ОЛЛ и МОБ, что позволяет принимать решение о тактике проводимого лечения в дальнейшем;

- разработаны математические модели СППР при диагностике ОЛЛ и МОБ и выполнена их программно-аппаратная реализация в рамках интегрированной системы методов лазерной проточной цитофлуориметрии и компьютерной микроскопии. Проведено экспериментальное исследование, связанное с тестированием созданного программного продукта на данных реальных пациентов;

- создан информационный веб-сайт предоставляющий доступ к тематическому контенту и моделирующему работу различных подсистем МИС по диагностике ОЛЛ и контролю МОБ при проведении диагностических исследований;

-разработан организационный и технический регламент администрирования веб-сервера и разделения прав доступа различных пользователей МИС разных категорий, обеспечивающий программную и аппаратную защиту и безопасность данных в информационной системе.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ по проекту №18-29-09115.

Список литературы:

1. Primova H. A., Sakiyev T. R., Nabiyeva S. S. Development of medical information systems //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2020. – Т. 1441. – №. 1. – С. 012160.

2. Bryndin E. Development of Artificial Intelligence by Ensembles of Virtual Agents with Mobile Interaction //Automation, Control and Intelligent Systems. Volume. – 2020. – Т. 8. – С. 1-8.

3. Shabaniyan T. et al. An artificial intelligence-based clinical decision support system for large kidney stone treatment //Australasian physical & engineering sciences in medicine. – 2019. – Т. 42. – №. 3. – С. 771-779.

4. Kindle R. D. et al. Intensive care unit telemedicine in the era of big data, artificial intelligence, and computer clinical decision support systems //Critical care clinics. – 2019. – Т. 35. – №. 3. – С. 483-495.

5. Rathe M. et al. Minimal residual disease monitoring cannot fully replace bone marrow morphology in assessing disease status in pediatric acute lymphoblastic leukemia //Apmis. – 2020. – Т. 128. – №. 5. – С. 414-419

6. Dix C. et al. Measurable residual disease in acute myeloid leukemia using flow cytometry: a review of where we are and where we are going //Journal of Clinical Medicine. – 2020. – Т. 9. – №. 6. – С. 1714.

7. Fu Y., Zhang Y., Khoo B. L. Liquid biopsy technologies for hematological diseases //Medicinal Research Reviews.

8. Doan M. et al. Label-free leukemia monitoring by computer vision //Cytometry Part A. – 2020. – Т. 97. – №. 4. – С. 407-414.

9. Lhermitte L. et al. Automated identification of leukocyte subsets improves standardization of database-guided expert-supervised diagnostic orientation in acute leukemia: a EuroFlow study //Modern Pathology. – 2020. – С. 1-11.

10. Никитаев В. Г., Проничев А. Н., Поляков Е. В., Чернышева О. А., Серебрякова И. Н., Тупицын Н.Н. Формирование выборок клеток в системе компьютерной микроскопии для проведения исследований методов диагностики острых лимфобластных лейкозов / Известия Юго-Западного государственного университета. Серия: Управление, вычислительная техника, информатика. Медицинское приборостроение. 2019. Т. 9, № 2. С. 91-101.

11. Никитаев В.Г., Тупицын Н.Н., Проничев А.Н., Поляков Е.В., Дмитриева В.В., Чернышева О.А., Серебрякова И.Н., Палладина А.Д. Технологии искусственного интеллекта в диагностике острых лимфобластных лейкозов и минимальной остаточной болезни // Медицинская техника, 2020, №5, С. 42-44.

12. Nikitaev V. G., Pronichev A. N., Polyakov E. V., Dmitrieva V. Approach to building knowledge bases in information-measuring systems diagnostics of acute leukemias // Journal of Physics: Conference Series. 2018. no 945. P. 012007.

13. Никитаев В. Г., Проничев А. Н., Поляков Е. В. и др. Модель описания лейкоцитов периферической крови на основе оптических особенностей структуры ядер // Измерительная техника. 2014. № 5. С. 56-58.

14. Никитаев В. Г., Проничев А. Н., Поляков Е. В. и др. Применение методов текстурного анализа в компьютерной микроскопии видимого диапазона электромагнитного излучения // Краткие сообщения по физике Физического института им. П.Н. Лебедева Российской Академии Наук. 2016. № 10. С. 26-32.

15. Поляков Е.В. Анализ эффективности методов и моделей обработки изображений препаратов крови и костного мозга для автоматизированной диагностики острых лейкозов // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2019. Т. 18, № 2. С. 133-144.

Сведения об авторах

Валентина Викторовна Дмитриева

к.т.н., доцент

Эл. почта: dmitrievq@yandex.ru

*Московский инженерно-технический институт физики
Москва, Россия*

Евгений Валерьевич Поляков

Ассистент

Эл. почта: voterstreit@inbox.ru

*Московский инженерно-технический институт физики
Москва, Россия*

Information about authors

Valentina Viktorovna Dmitrieva

PhD in Engineering, Associate Professor

E-mail: dmitrievq@yandex.ru

*National Research Nuclear University MEPhI
Moscow, Russia*

Evgeny Valeryevich Polyakov

Assistant

E-mail: voterstreit@inbox.ru

*National Research Nuclear University MEPhI
Moscow, Russia*

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИЗМЕРЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ ПОЛОСТИ РТА

Современные возможности рефрактометрии позволяют рассматривать данную методику как перспективную в плане использования в стоматологической практике для диагностики герпетической инфекции полости рта. Метод позволит ускорить и упростить процесс диагностики заболевания, что, в свою очередь, позволит повысить качество проводимого лечения.

Ключевые слова: *Herpes Simplex, герпетическая инфекция, спектрофотометрия, рефрактометрия, волоконная оптика, диагностика, стоматология.*

A.V. Arutyunov², E.A. Badeeva¹, V.V. Volobuev¹, T.I. Murashkina¹,
F.S. Ayupova¹, O.V. Gulenko¹, Yu.A. Vasiliev²,

¹Penza state University

²Kuban state medical University

PROMISING POSSIBILITIES OF THE OPTICAL METHODUS IN THE DIAGNOSIS OF HERPES INFECTION OF THE MOUTH

Modern possibilities of refractometry allow us to consider this technique as promising in terms of use in dental practice for the diagnosis of herpetic infection of the oral cavity. The method will speed up and simplify the process of diagnosing the disease, which, in turn, will improve the quality of the treatment.

Keywords: *Herpes Simplex, herpes infection, spectrophotometry, refractometry, fiber optics, diagnostics, dentistry.*

Введение

Герпетическая инфекция (ГИ) достаточно широко распространена как в России, так и во всем мире (достигает 67 %) [11,13,14,15,16]. По данным ВОЗ, заболевания, обусловленные вирусом простого герпеса, как причина летального исхода, занимает второе место (15,8%) после гриппа (35,8%) [6].

В доступной литературе встречается множество публикаций отечественных и зарубежных авторов, посвященных вопросам этиологии, диагностики, клиники и современных методов лечения патологии. Но, несмотря на широту представленных материалов, до сих пор у врачей общей практики нет целостного представления о данной проблеме.

Целью работы является поиск альтернативных междисциплинарных диагностических систем.

Материалы и методы. Доступные источники информации с проведенным анализом.

Семейство герпесвирусов – это многочисленная группа вирусов, включающая до 100 серотипов и три подсемейства. Всего 8 представителей семейства патогенны для человека. Все они представлены ДНК-содержащими вирусами с единой морфологией, не дифференцируемой при электронной микроскопии [8]. Эти представители герпесвирусов имеют общие физико-химические свойства, но отличаются между собой группоспецифическими и типоспецифическими антигенами, способностью вовлекать в пато-

логический процесс определенных клетки, а также продолжительностью пребывания в них [11].

Подсемейство альфа-герпесвирусов характеризуется выраженным цитопатогенным действием при размножении вируса в эпителиальных клетках, с последующей пожизненной персистенции в сенсорных ганглиях без репликации и разрушения их. Особенностью этого подсемейства является короткое время пребывания в пораженных клетках с образованием в них очагов некрозов и везикул [10].

Диаметр зрелого вириона герпесвируса – 120-200 нм. Вирус имеет сферическую форму, в структуре вириона выделяют более 30 структурных белков (гликопротеинов), семь из которых находятся на поверхности и вызывают образование вируснейтрализующих антител [3].

На сегодняшний день в диагностике герпетической инфекции широкое распространение нашли методики иммуноферментного анализа, иммунофлюоресценции и полимерарной цепной реакции [2]. Поэтому определенный интерес в диагностике патологии представляет спектрофотометрия, которая имеет большое диагностическое значение при исследовании биологических жидкостей, в том числе ротовой жидкости [4].

Данная методика нашла широкое применение в медицинской сфере. Н.Е. Макарова и Ю.А. Винниченко (2017) использовали спектрофотометрию для оценки степени деминерализации эмали путем анализа ее оптических свойств [7]. Бельская Л.В. и Сарф Е.А. (2018) указывают, что данный метод позволяет проанализировать качественный и количественный состав слюны человека [1]. При этом, стоит отметить, преимущества анализа слюны (ротовой жидкости) по сравнению с анализом крови: безболезненность забора материала, простота и удобство, неинвазивность и атравматичность методики [5]. Активно методика используется в количественном анализе фармакологических препаратов в биологических и питательных средах [12]. Особый интерес представляет данная методика в диагностике инфекционных заболеваний. Имеются публикации, посвященные применению метода спектрофотометрического анализа для выявления микроорганизмов, а также вирусов [17]. При этом, анализ микробиологических объектов имеет свои особенности. Оптическая плотность взвеси обусловлена поглощением света органическими молекулами (белки, рибонуклеиновые кислоты, липополисахариды)

Вывод. Обнаружение микроорганизмов традиционными методами занимает, в среднем от 4 до 24 часов. Использование спектрофотометрии позволяет ускорить процесс до нескольких минут [9]. Но спектрометрия достаточно затратный метод с точки зрения аппаратной реализации.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие в последнее время рассматриваются возможности применения рефрактометрического метода анализа ротовой жидкости, но с использованием элементов волоконной оптики. Данный метод основан на регистрации изменения коэффициента ротовой жидкости при наличии той или иной патологии у пациента. Микрометрические размеры зоны измерения волоконно-оптических рефрактометрических преобразователей позволят проводить диагностику заболевания с ничтожным количеством ротовой жидкости.

Список литературы

1. Бельская, Л.В. Околосуточная динамика состава слюны человека по данным ИК-Фурье-спектроскопии / Л.В. Бельская, Е.А. Сарф // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – №5 (63). – С. 277-281. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-5-277-281
2. Долгих, Т.И. Совершенствование диагностики смешанной герпетической инфекции у детей раннего возраста / Т.И. Долгих, С.Г. Дроздова, Н.Л. Кмито, Ф.В. Носкова, Е.А. Гашина // Детские инфекции. – 2006. – №2. – С. 64-66.

3. Долгих, Т.И. Иммунологическая характеристика впервые возникшей герпетической инфекции / Т.И. Долгих, А.В. Ершов, Е.Ю. Минакова, Н.С. Запарий // *Инфекционные болезни*. – 2010. – №8(1). – С. 25-28.
4. Елисеев, А.А. Применение компьютерных и информационных технологий в медицине / А.А. Елисеев, Ю.П. Морозова, В.А. Козинская, Б.В. Королев, И.В. Кулагина и др. // *Вестник Томского государственного университета*. – 2000. – №269. – С. 111-114.
5. Кулапина, Е.Г. Спектрофотометрическое определение цефазолина в смешанной слюне практически здоровых лиц и больных с инфекционно-соматической патологией / Е.Г. Кулапина, А.И. Барсукова, О.И. Кулапина, И.А. Утц // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2011. – №11-12. – С. 17-20.
6. Левончук, Е. А. Герпетическая инфекция полости рта / Е. А. Левончук // *Современная стоматология*. – 2005. – №1. – С. 19-22.
7. Макарова, Н.Е. Спектрофотометрический метод диагностики очаговой деминерализации эмали зубов / Н.Е. Макарова, Ю.А. Винниченко // *Стоматология*. – 2017. – №6. – С. 9-11. DOI: 10.17116/stomat20179669-11
8. Науменко, В.А. Герпесвирусы и мужское бесплодие: есть ли связь? / В.А. Науменко // *Вопросы вирусологии*. – 2013. – №3. – С. 4-8.
9. Уткин, Д.В. Применение методов спектрофотометрического анализа для выявления микроорганизмов / Д.В. Уткин, В.Г. Германчук, П.С. Ерохин, А.Н. Спицын, С.А. Щербакова, А.Н. Глазков // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика*. – 2014. – Т. 14. – Вып. 2. – С. 36-37.
10. Хрянин, А.А. Многолетние тенденции в распространенности вируса простого герпеса в популяции Сибири / А.А. Хрянин, О.В. Решетников, М.П. Кандрюшина // *Вестник дерматологии и венерологии*. – 2010. – №5. – С. 96-101.
11. Хрянин, А.А. Герпес под подушкой. Распространённость вируса простого герпеса в российской популяции: многолетний мониторинг / А.А. Хрянин // *StatusPraesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак*. – 2014. – № 6 (17). – С. 69-76.
12. del Carmen Domínguez, M. Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts in agar / M.del Carmen Domínguez, M. de La Rosa, M.V. Borobio // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2001. – № 47(4). – P. 391-398. DOI: 10.1093/jac/47.4.391
13. Herpes simplex virus. 1 May 2020. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus> (Дата обращения 27.04.2021).
14. James, Ch. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016 / Ch. James, M. Harfouche, N.J. Welton, K.M.E. Turner, L.J. Abu-Raddad, S.L. Gottlieb, K.J. Looker // *Bulletin of the World Health Organization*. – 2020. – №98. – P. 315-329. DOI: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
15. Looker, K.J. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012 / K. J. Looker, A. S. Magaret, M. T. May, K. M. E. Turner, P. Vickerman, S. L. Gottlieb, L.M. Newman // *Plos One*. – 2015. – №10 (10): e0140765. DOI:10.1371/journal.pone.0140765
16. McQuillan, G. Prevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in persons aged 14–49: United States, 2015–2016 / G. McQuillan, D. Kruszon-Moran, E.W. Flagg, R. Paulose-Ram // *NCHS Data Brief*. – 2018. – № 304. – 8 p.
17. Petisco, C. A spectroscopy approach to the study of virus infection in the endophytic fungus *Epichloë festucae* / C. Petisco, B. Garcia-Criado, I. Zabalgoceazcoa, B.R. Vázquez-de-Aldana, A. Garcia-Ciudad // *Virology Journal*. – 2011. – №8. – P. 286-275.

Сведения об авторах

Елена Александровна Бадеева

*д-р. техн. наук, доцент
профессор кафедры бухгалтерский учет, налогооб-
ложение и аудит БУНиА*

*Пензенский государственный университет
Пенза, Россия*

Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru

Арменак Валерьевич Арутюнов

*д.м.н., доцент
профессор кафедры мобилизационной подготовки
здравоохранению и медицины катастроф
Кубанский государственный медицинский университет
Краснодар, Россия*

Эл. почта: armenak@mail.ru

Мурашкина Татьяна Ивановна

*д-р. техн. наук, профессор
профессор кафедры приборостроения
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия*

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Юрий Анатольевич Васильев

*ассистент кафедры общественного здоровья, здраво-
охранения и истории медицины
Кубанский государственный медицинский университет
Краснодар, Россия*

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Фарида Сагитовна Аюпова

*к.м.н., доцент кафедры детской стоматологии, ор-
тодонтии и челюстно-лицевой хирургии
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия*

Эл. почта: kaf-detstom@yandex.ru

Ольга Владимировна Гуленко

*д.м.н., доцент кафедры хирургической стоматологии
и челюстно-лицевой хирургии
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия*

Эл. почта: corpus@ksma.ru

Information about authors

Elena Alexandrovna Badeeva

*doctor of technical Sciences, associate Professor
Professor of accounting, taxation and audit
Department*

*Penza state University
Penza, Russia*

E-mail: badeeva_elena@mail.ru

Armenak Valerievich Arutyunov

*doctor of medicine, associate Professor
Professor of the Department of mobilization
training in health care and disaster medicine
Kuban state medical University
Krasnodar, Russia*

E-mail: armenak@mail.ru

Tatyana Ivanovna Murashkina

*doctor of technical Sciences, Professor
Professor of instrument engineering Department
Penza state University
Penza, Russia*

E-mail: timurashkina@mail.ru

Yuri Anatolyevich Vasiliev

*assistant of the Department of public health, pub-
lic health and history of medicine
Kuban state medical University
Krasnodar, Russia*

E-mail: yurii-59@mail.ru

Farida Ayupova

*Ph.D., Assistant Professor of Pediatric Dentistry,
Orthodontics and Maxillofacial Surgery
Penza State University
Penza, Russia*

E-mail: kaf-detstom@yandex.ru

Olga Gulenko

*Md., Associate Professor of Surgical Dentistry
and Maxillofacial Surgery
Penza State University
Penza, Russia*

E-mail: corpus@ksma.ru

УДК 612.22, 54.07

ГРНТИ 76.29.55

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.08

А.Ю. Зайцева, И.Е. Котова, М.С. Мазинг
Институт аналитического приборостроения РАН

**ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ОБУЧЕНИЯ И РАСПОЗНАВАНИЯ ОБРАЗОВ
В НЕИНВАЗИВНОЙ СЕНСОРНОЙ СИСТЕМЕ ДИАГНОСТИКИ ФУНКЦИОНАЛЬ-
НОГО СОСТОЯНИЯ ЧЕЛОВЕКА С ЦЕЛЬЮ ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ
ВРАЧЕБНЫХ РЕШЕНИЙ**

*Реализован новый метод определения функционального состояния человека, основан-
ный на решении фундаментальной проблемы анализа сложных многокомпонентных
биологических сред- их идентификации на основе методов многопараметрического
электрохимического анализа с применением искусственных нейронподобных систем и
информационных технологий обучения и распознавания образов.*

Ключевые слова: мультисенсорная система; полиселективный сенсор; функциональное состояние человека; конденсат выдыхаемого воздуха; метод главных компонент

A.Yu. Zaitceva, I.E. Kotova, M.S. Mazing
Institute for Analytical Instrumentation RAS

APPLICATION OF TEACHING TECHNOLOGIES AND IMAGE RECOGNITION IN A NON-INVASIVE SENSOR SYSTEM FOR DIAGNOSTICS OF A HUMAN FUNCTIONAL STATE TO SUPPORT THE MAKING OF MEDICAL DECISIONS

A new method for determining the functional state of a person is proposed, aimed at solving the fundamental problem of analyzing complex multicomponent biological means of identification based on new methods of multivariate electrochemical analysis using artificial neural-like systems and technologies for training and pattern recognition.

Keywords: multisensory system; polyelective sensor; functional state of a person; exhaled air condensate; principal component analysis.

Введение

В условиях восстановления после пандемии коронавируса важным вопросом является возвращение человека после перенесенного заболевания к своим повседневным трудовым обязанностям. В настоящее время мало изучены кратковременные и долгосрочные последствия перенесенной инфекции SARS-CoV-2. Для специалистов в области медицинской диагностики зачастую возникает вопрос о критериях возвращения специалистов различных профессий к трудовой деятельности после перенесенного COVID-19.

Более легкие случаи COVID-19 встречается у лиц с хорошим иммунитетом, к которым относится трудоспособная часть общества. Это объясняется тем, что иммунный ответ организма не дает распространиться вирусу, ограничивая его локализацию верхними дыхательными путями, и, как правило, не требует госпитализации. Несмотря на часто легкое течение COVID-19 без ярко выраженных симптомов, часто среди внелегочных осложнений наблюдается декомпенсация сопутствующей патологии – сердечно-сосудистой, церебральной, эндокринной, заболеваний пищеварительной, мочевыделительной систем.

Перенесенный инфекционный процесс часто влечет за собой астенический и астеновегетативный синдромы, проявляющиеся общей слабостью, быстрой утомляемостью, снижением работоспособности. Могут наблюдаться депрессия и нарушения сна. Постинфекционный астенический синдром также может выступать одной из причин, препятствующих возобновлению привычной активности.

Таким образом крайне важно отслеживать не только абсолютные значения показателей инвазивных тестов, но и общее функциональное состояние человека, перенесшего инфекцию COVID-19. Особенно актуальным является наблюдение динамики восстановления функционального состояния [1, 2]. Проведение реабилитационных мероприятий с неинвазивным контролем функционального состояния дает возможность динамически отслеживать изменения, обеспечивая максимальную эффективность и безопасность возвращения к стандартной трудовой деятельности.

Существующие в настоящее время аналитические диагностические системы позволяют измерять в биологических средах определенные вещества, используя сложные процедуры пробоподготовки, дорогостоящие реактивы, высокие затраты времени при недостаточно высоком качестве измерений в связи с неидеальной селективностью сенсоров, возможности повышения которой для любого из существующих видов сенсоров практически исчерпаны [3]. Для современных реалий и тенденций в медицине требуются принципиально новые методы и приборы с повышенными аналитическими, экономическими и эксплуатационными показателями, которые помогали бы медицинскому специалисту в принятии решения относительно тактики ведения конкретного пациента.

Цель работы

Целью настоящей работы является разработка и исследование новых принципов медико-биологических исследований функционального состояния человека по физиологически значимым компонентам конденсата выдыхаемого воздуха с применением диагностической системы на основе массива полиселективных электрохимических сенсоров с использованием математических методов обработки больших массивов информации, обучения и распознавания образов.

Материалы и методы

Электрохимические мультисенсорные системы открывают большие перспективы в области многокомпонентного анализа. С помощью таких систем возможны классификация и количественное определение ряда компонентов в биосредах, в объектах пищевой и фармацевтической промышленности, окружающей среды [4, 5]. Новизной и преимуществом метода, предложенного в настоящей работе, является отсутствие необходимости высокоточного определения содержания в биологических средах определенных химических компонент. Предлагаемая диагностическая система преодолевает ограничение уровня селективности и чувствительности сенсоров к основному измеряемому компоненту и ряду сопутствующих, так называемых, мешающих веществ, тем, что предлагается использовать массив сенсоров с так называемой перекрестной чувствительностью. Каждый сенсор системы реагирует на присутствие сразу нескольких компонентов анализируемой среды. Получаемая совокупность многомерных данных требует современной математической обработки. С этой целью для обработки данных в проекте предполагаются к применению метод главных компонент, метод искусственных нейронных сетей и др [6].

Метод главных компонент (МГК) – это метод эксплораторного анализа данных, он имеет дело только с набором независимых переменных, никакой дополнительной информации от референтных методов для реализации МГК не требуется. МГК позволяет изучить структуру данных в общем виде и понять взаимоотношение между испытываемыми и переменными, например, наличие групп схожих испытуемых, наличие выбросов, наличие скоррелированных переменных, несущих схожую информацию и т.д. [7]. Стоит отметить, что МГК полезен не только для визуализации структуры информации, но и для снижения размерности в данных, для уменьшения нерелевантного шума, что активно применяется в контексте мультисенсорных систем.

Диагностическая система состоит из двух блоков: измерительного, включающего модули пробоподготовки, сенсорного, микропроцессорного измерительного и информационного блока, включающего модули обучения, распознавания и визуализации образов.

Модуль пробоподготовки содержит: устройство для получения конденсата из потока выдыхаемого воздуха испытуемого и устройство для установки сенсоров в исследуемую среду, ее термостатирования.

Сенсорный модуль представлен массивом полиселективных электрохимических сенсоров с перекрестной чувствительностью к биологически важным компонентам: неорганическим ионам, белкам, жирам, органическим кислотам, N-соединениям, продуктам перекисного окисления липидов, лейкоцитам, чужеродным веществам – ксенобиотикам, ПАВ. Каждый из сенсоров генерирует относительно опорного потенциала электрода сравнения (хлорид-серебряный электрод второго рода, аналог ЭСЛ-1М3) выходной сигнал - ЭДС электродной ячейки. Совокупность ЭДС, регистрируемых сенсорами в биосредах, позволяет формировать их «образы» в виде композиций электродных потенциалов. Состав и количество сенсоров подбираются с учетом их перекрестной чувствительности к диагностически значимым компонентам исследуемого объекта. Определен информативный состав массива сенсоров для контроля конденсата выдыхаемого

воздуха, включающий полиселективные потенциометрические сенсоры и селективный рН электрод [8].

Основные сенсорные материалы сформированного массива полиселективных сенсоров: рН - оксидное стекло, рNa - стекло 78, рК- валиномицин в ПВХ матрице, рNO₃ - нитрат три-додецил-гексадецил-аммония в ПВХ, рNH₄⁺ – нонактин в ПВХ, рCl⁻ - монокристаллический гомогенный AgCl, рF⁻ – монокристаллический LaF₃. Для контроля рН исследуемых сред использовали высокоселективный рН-комбинированный электрод рН-3014. В качестве полимерной основы во всех применяемых мембранах выступал поли(винилхлорид) (ПВХ). В качестве растворителя-пластификатора были использованы ди-(2-этилгексил)себацнат (ДОС), о-нитрофенилоктиловый эфир (НФОЕ) и 2-фторфенил-2-итрофениловый эфир (2Ф2Н).

Соотношение растворителя пластификатора и полимера во всех мембранах было фиксированным и составляло 2/1 по массе соответственно. Процентное содержание нейтральных лигандов и ионообменных добавок варьировалось в зависимости от их молярной массы. В большинстве случаев молярность лиганда была 50 ммоль/кг мембраны, а ионообменной добавки 10 ммоль/кг мембраны, таким образом молярное соотношение нейтрального лиганда и добавки составляло в большинстве составов 5:1 и было выбрано для обеспечения избытка нейтрального переносчика над катионообменной добавкой, так как это условие обычно соблюдается для катион-чувствительных полимерных мембран [9].

Каждый компонент в составе мембран имеет важное значение. Пластификатор необходим для обеспечения нужных физико-химических свойств мембраны и высокой подвижности активных компонентов. Также важно отметить, что химическая природа пластификатора способна изменять электрохимические свойства системы мембран. Соответственно изменение полярности растворителя, используемого в качестве пластификатора, оказывает влияние на чувствительность и селективность мембран. Электроноактивный агент (ионофор) также является важной частью мембраны. Он способен образовывать лабильный комплекс с целевым ионом, что представляет собой большую значимость ввиду того, что разность потенциалов образуется при распределении ионов на границе раздела фаз «мембрана – раствор». Кроме того, их использование существенно снижает электрическое сопротивление мембраны, ускоряет ионный обмен на границе раздела фаз, а также уменьшает влияние липофильных анионов (в случае катионообменных добавок) и модифицирует селективность сенсоров.

Также необходимо отметить, что важной составляющей мембран для ИСЭ является липофильная добавка – соль гидрофобных анионов и гидрофильных катионов. Ее применение важно ввиду того, что гидрофобные анионы могут мешать определению катионов металлов, а липофильная добавка способна подавлять этот «анионный эффект».

Микропроцессорный измерительный модуль обеспечивает для каждого используемого измерительного электрода высокоточные измерения ЭДС. Регистрируемые ЭДС отображаются на экране ЖКИ. Они статистически обрабатываются и визуально отображаются на экране компьютера в виде лепестковой диаграммы. Измерительный модуль по командам оператора выполняет управление процедурами автоматических калибровок и измерений с заданными требованиями к допустимой погрешности показаний электродов. Он контролирует температуру среды и термокомпенсацию показаний сенсоров, сохраняет результаты калибровок и измерений, задаваемых параметров и режимов выполняемых процедур (библиотека на 10 сенсоров), а также осуществляет передачу данных в персональный компьютер (ПК) через USB-интерфейс и отображение их в графической форме.

Модуль обучения и распознавания представлен в виде математической модели, реализующей функции обучения системы и распознавания многомерных «образов», формируемых сенсорным модулем в виде массивов значений ЭДС. Интегральный ре-

зультат статистически обрабатывается, отображается и запоминается в виде матрицы состояний «образа нормы» с допустимыми отклонениями параметров, характеризующих «образ».

Экспериментальные исследования

С целью разработки методики сбора и подготовки данных информационным обучаемым модулем искусственной мультисенсорной системы были проведены экспериментальные исследования с участием 31 испытуемого мужского пола в возрасте от 18 до 23 лет. Все испытуемые обладали хорошей физической подготовкой и прошли комплексный медицинский осмотр, согласно заключению которого, они не имели серьезных медицинских отклонений и патологических состояний на момент проведения экспериментальных исследований. Испытуемым была предложена умеренная физическая нагрузка (в течение 20 мин 5 раз подъем умеренным шагом на 5-й этаж и спуск с него).

Для отработки методики экспериментального исследования влияния физической нагрузки на «образ» исследуемого были выполнены исследования конденсата выдыхаемого воздуха. В экспериментах с физической нагрузкой использовали 6 потенциометрических полиселективных сенсоров с перекрестной чувствительностью.

По полученным значениям были построены лепестковые диаграммы, каждая из которых представляет собой многоугольник с шестью углами и с шестью лучами, выходящими из общего центра к вершинам углов геометрической фигуры. Каждый луч является осью, вдоль которой откладывается точка, представляющая собой вершину угла шестиугольника, которая является средним арифметическим значением ($n=5$) снятых показаний каждого из шести датчиков в условных единицах в определенный взятый для анализа момент времени проведенного эксперимента (состояние покоя, период восстановления) [10].

Полученные в процессе обработки данных диаграммы представляют собой «образы» испытуемых, отражающие статус общего функционального состояния организма. Вследствие их оценки было показано, что каждый испытуемый имеет свой собственный индивидуальный и уникальный «образ». Типичные полученные «образы» испытуемых в условных единицах с динамикой его изменения в течение экспериментального исследования изображены на рисунке 1.

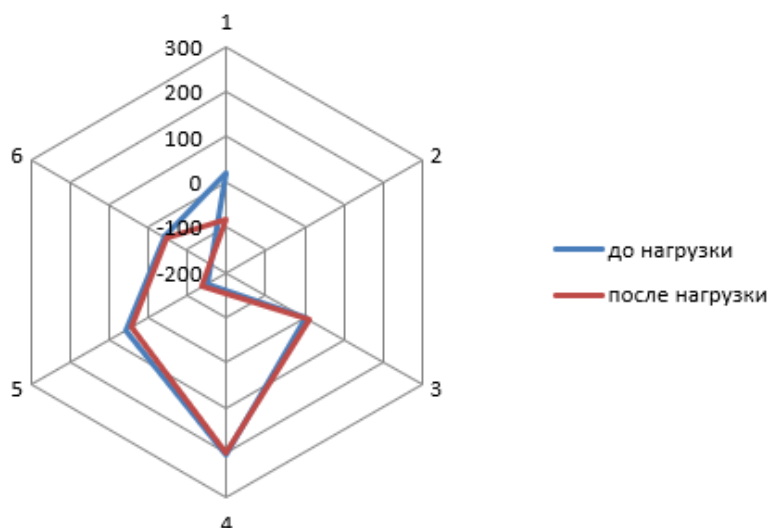


Рис. 1. Визуальное представление типичного образа конденсата выдыхаемого воздуха испытуемых в виде шестиугольников до и после физической нагрузки. По осям диаграммы отложены численные значения показаний каждого из шести сенсоров в условных единицах.

Обсуждение результатов

Результаты проведенных исследований показывают, что «образ» каждого из испытуемых в состоянии покоя, формируемый композицией потенциалов, генерируемых шестью электрохимическими сенсорами в конденсате выдыхаемого воздуха, имеет свои индивидуальные особенности. Умеренные физические нагрузки видоизменяют его. Выявленные в проведенных экспериментах возможности исследуемого аналитического комплекса формировать индивидуальные «образы» испытуемых в четко определенных ситуациях до нагрузки и их индивидуальные изменения после фиксированных нагрузок были использованы для формирования алгоритмов «обучения» аналитической системы к «распознаванию» испытуемых и их функционального состояния.

Полученные экспериментальные данные были проанализированы статистическими методами искусственных нейронных сетей и методом главных компонент с целью уменьшения размерности многомерных данных без потери существенной информации, а также для нахождения статистических взаимосвязей и визуализации данных. МГК представляет собой ортогональное линейное преобразование, которое отображает данные из исходного пространства признаков в новое пространство меньшей размерности. При этом первая ось двумерного пространства называется первой главной компонентой, вторая ось – второй главной компонентой. Главные компоненты представляют собой ортогональную систему координат, в которой дисперсии компонент характеризуют их статистические свойства [7].

Результаты анализа МГК представлены на рисунке 2, где каждый испытуемый обозначен в виде точки в пространстве двух первых главных компонент. На графике прослеживается некоторое разделение между испытуемыми, а также их объединение в разных областях пространства. Каждой из групп с различной компенсаторно-приспособительной реакцией, был присвоен свой цвет. Зеленый цвет - первая группа (с наилучшей реакцией организма), красный цвет - вторая группа (с наихудшей реакцией), желтый - третья группа (с нормальной реакцией на нагрузку). На рисунке 2 представлено объединение испытуемых в 3 кластера. Таким образом, испытуемые были распределены по трем группам согласно расположению точек на графике. Группы включают 12, 9 и 7 человек. Двое испытуемых не попали ни в одну из групп. На рисунке 2 приведена кластеризация получившихся результатов.

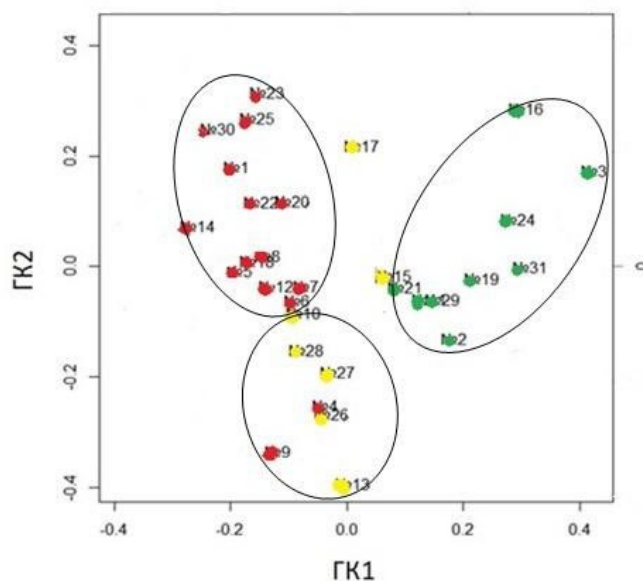


Рис. 2. Результаты анализа экспериментальных данных МГК- график двух главных компонент с разбиением испытуемых на подгруппы.

Полученные результаты представляют собой группы испытуемых с различными компенсаторно-адаптационными реакциями на нагрузку. Разбиение испытуемых на группы коррелирует с независимыми медико-биологическими исследованиями, отра-

жающими реальными компенсаторно-адаптационными реакциями испытуемых. Помимо этого, согласно проведенному медико-биологическому исследованию двое испытуемых (№ 15, № 17), не попавшие ни в одну из групп, на момент эксперимента имели неблагоприятную компенсаторно-адаптационную реакцию и неудовлетворительное функциональное состояние организма.

Выводы

Таким образом, анализируя результаты исследований, можно говорить об эффективности разработанного метода контроля функционального состояния и работоспособности человека.

Показана возможность использования математических методов обработки данных, таких как: метод искусственных нейронных сетей, в частности самоорганизующиеся карты Кохонена, метод главных компонент. При анализе комплексной физиологической реакции испытуемого на функциональную нагрузку приоритетным для использования в информационном модуле мультисенсорной системы был выбран метод главных компонент.

Заключение

Авторы считают, что новым в данной работе является методический подход к решению проблем неинвазивного контроля здоровья и работоспособности человека на основе мультисенсорной диагностической системы поддержки принятия врачебных решений. Авторы показывают перспективность использования информационных технологий обучения и распознавания образов для проведения дальнейших исследований с целью создания измерительной системы, способной к автоматизированному определению функционального состояния человека.

Благодарности

Исследование выполнено в рамках Государственного задания № 075-00280-21-00 по теме «Новые подходы к разработке аналитических систем на основе генетических, физико-химических и иммунных методов исследования» СУ НИР 0074-2019-0013.

Цитируемая литература

1. Кислякова Л.П., Буляница А.Л., Кисляков Ю.Я., Гуляев В.И. Оценка функционального состояния человека при физических нагрузках по показателям конденсата выдыхаемого воздуха, регистрируемым полиселективными электрохимическими сенсорами с применением проекционных методов многомерного анализа // Научное приборостроение. – 2016. № 26 (2). С. 37-47.

2. Kislyakov Yu.Ya., Avduchenko S.A., Kislyakova L.P. and Zaitceva A.Yu. Analytical multisensory trainable system for diagnosing vocational aptitude of military medical specialists by ion content in the expired breath condensate // Journal of Computation and Theoretical Nanoscience. 2019. Vol. 16. P. 4502-4507

3. Зайцева А.Ю., Кисляков Ю.Я., Мазинг М.С., Давыдов В.В. Применение неинвазивной оптической обучаемой диагностической системы и математических методов анализа многомерных данных для оценки кислородного статуса тканей человека. // Научное приборостроение. 2020. Т. 30. № 4. С. 113–118

4 Zaitceva A.Yu., Kislyakova L.P., Kislyakov Yu.Ya., Avduchenko S.A. Development of a multi-sensor analytical trainable system for non-invasive evaluation of adaptedness status of hazardous occupation specialists // Journal of Physics: CS. 2019. Vol. 1400, 033022.

5 Kislyakov Yu.Ya., Avduchenko S.A., Kislyakova L.P. and Zaitceva A.Yu. Analytical multisensory trainable system for diagnosing vocational aptitude of military medical special-

ists by ion content in the expired breath condensate // Journal of Computation and Theoretical Nanoscience. 2019. Vol. 16. P. 4502-4507.

6 Кирсанов Д.О. Потенциометрические мультисенсорные системы на основе фосфор- и азотсодержащих экстрагентов и их аналитические возможности: дис. д. хим. наук: 02.00.02. - СПб Гос. университет, Санкт-Петербург, 2014 - 180 с.

7 Box G.E.P., Draper N.R. Empirical Model-Building and Response Surface, Wiley Series in Probability and Statistics. - New York: Wiley, 1987. - 424 pages.

8 Esbensen K.H. Multivariate Data Analysis – in practice. An introduction to multivariate data analysis and experimental design, 5th ed., CAMO AS, Oslo, 2001

9 Jolliffe I.T. Principal component analysis. –New York: Springer Science & Business Media, 2002. P. 487. 129-155.

10 Бородачёв С.М. Многомерные статистические методы: учебное пособие. — Екатеринбург: УГТУ – УПИ, 2009. 84 с.

Сведения об авторах

Анна Юрьевна Зайцева

к.ф.-м.н., ст. науч. сотр.

Институт аналитического приборостроения РАН

Санкт-Петербург, Россия

Эл. почта: anna@da-24.ru

Ирина Евгеньевна Котова

техник

Институт аналитического приборостроения РАН

Санкт-Петербург, Россия

Эл. почта: irrkott@gmail.com

Мария Сергеевна Мазинг

мл. науч. сотр.

Институт аналитического приборостроения РАН

Санкт-Петербург, Россия

Эл. почта: mazmari@mail.ru

Information about authors

Anna Yurevna Zaitceva

Senior Researcher

Institute for Analytical Instrumentation RAS

St. Petersburg, Russia

E-mail: anna@da-24.ru

Irina Evgenjevna Kotova

Technician

Institute for Analytical Instrumentation RAS

St. Petersburg, Russia

E-mail: irrkott@gmail.com

Maria Sergeevna Mazing

Researcher

Institute for Analytical Instrumentation RAS

St. Petersburg, Russia

E-mail: mazmari@mail.ru

РАЗВИТИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ

Установлено, что эндокринный дисраптор ДДТ, воздействуя на развивающийся организм, нарушает механизмы морфогенеза коркового вещества надпочечников и продукцию ей стероидных гормонов как в пубертатном периоде, так и у взрослого организма.

Ключевые слова: *эндокринный дисраптор, ДДТ, надпочечник, корковое вещество, морфогенез, секреторная деятельность*

Yaglova N.V.

FSBI Research Institute of Human Morphology

DEVELOPMENT AND FUNCTION OF THE ADRENAL CORTEX| IN EXPOSED TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT ORGANISMS

The present investigation found that developmental exposure to endocrine disruptor DDT affects mechanisms, regulating morphogenesis of adrenal cortex, and production of steroid hormones in pubertal period and adulthood.

Keywords: *endocrine disruptor, DDT, adrenal gland, adrenal cortex, morphogenesis, secretory activity*

Введение

Масштабы воздействия эндокринных дисрапторов на организм в непроизводственной сфере имеют явную тенденцию к увеличению, что обуславливает высокую медико-социальную значимость этой проблемы. Наиболее распространенным на планете эндокринным дисраптором является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), а самым частым источником его низкодозового воздействия в развитых странах – продукты питания [1]. Это связано и с продолжающимся использованием ДДТ в противоэпидемических целях с разрешения ВОЗ, и с использованием в сельском хозяйстве в странах Латинской Америки, Африки, Азии.

Необходимо отметить, что в 70-80-е годы прошлого века некоторые метаболиты ДДТ изучались как потенциальные противоопухолевые средства, что было связано с их способностью вызывать селективный некроз клеток пучковой зоны надпочечников. По ряду причин эти исследования утратили актуальность. Однако даже в этих экспериментах крайне скудно были освещены изменения в сетчатой и клубочковой зонах, а также и в мозговом веществе. Воздействие низких доз, имеющих дисрапторное, а не токсичное действие на надпочечники, их развитие и функционирование фактически не изучено. В связи с этим нами была поставлена следующая цель – изучить развитие и функционирование надпочечников при развитии организма в условиях воздействия 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 между адренархе и гонадархе, когда синтез основного количества половых стероидов происходит именно в сетчатой зоне. 70-ые сутки – это постпубертатный период, когда надпочечник крысы по литературным дан-

ным достигает максимума своего морфологического развития [2]. Проведено морфологическое исследование надпочечников, иммуногистохимическое определение экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих морфогенетические процессы, пролиферативной активности кортикостероцитов, иммуноферментное определение концентрации гормонов коркового вещества надпочечников в сыворотке крови.

Результаты

В ходе исследования было установлено, что у крыс, подвергавшихся воздействию в пре- и постнатальном периодах онтогенеза, к пубертатному периоду надпочечник не достигает размеров контрольных животных, но имеет сформированное корковое и мозговое вещество. Уменьшение толщины коркового вещества связано с уменьшением в первую очередь с уменьшением площади клубочковой зоны, а также сетчатой зоны. Сравнение опытных групп доказывает, что именно пренатальное воздействие дисраптора обуславливает нарушения развития клубочковой зоны. У крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, уменьшение площади клубочковой зоны в экваториальных срезах было обусловлено не только меньшей толщиной, но и локальным отсутствием. Наблюдались изменения и в микроциркуляторном русле: капилляры были расширены, часто наблюдались стазы эритроцитов.

Исследование пучковой зоны выявило, что, несмотря на ее чувствительность к действию высоких токсичных доз ДДТ, воздействие низких доз не изменяет ее морфогенез. Выявлены дистрофические изменения и гибель кортикостероцитов в наружной части пучковой зоны, а также активация пролиферации и регенерация. Причиной были с нарушения гемодинамики на границе пучковой и клубочковой зон, связанные с перераспределением венозного оттока.

Сетчатая зона в пубертатном периоде отставала в развитии, причем в большей степени, чем при постнатальном воздействии, что подтверждалось и меньшей площадью, и меньшим количеством клеток в единице площади.

К 70-ым суткам в норме у крыс в корковом веществе увеличивается площадь пучковой зоны и уменьшается размер клубочковой зоны. У крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ, морфогенетические процессы в корковом веществе протекали иначе. Происходило увеличение площади не только пучковой, но и клубочковой и сетчатой зон, и уменьшение промежуточной зоны.

Главным изменением, выявленным в клубочковой зоне у крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, стало восстановление ее целостности, а также уменьшение диаметра капилляров и микроциркуляторных нарушений. Изучение пролиферации клеток клубочковой зоны показало, что пренатальное воздействие замедляет развитие клубочковой зоны до пубертатного периода и активирует ее рост после пубертата, а постнатальное препятствует возрастному регрессу.

В пучковой зоне воздействие дисраптора приводило к развитию фокального цитолита в том числе и вследствие кровоизлияний, но без лейкоцитарной инфильтрации и появление преимущественно лимфоцитарных инфильтратов в участках с нормальной гемодинамикой, но с изменениями в структуре кортикостероцитов, свидетельствующих о развитии в них вакуольной дистрофии. Само появление лимфоцитарной инфильтрации в корковом веществе при отсутствии явной аутоиммунной или эндокринной патологии было ранее описано как у человека, так и у домашних животных и рассматривается как развитие латентного адrenalита. Гибель кортикостероцитов в пучковой зоне на более ранних сроках исследования могла стать причиной аутоиммунной реакции, но в то же время в наших работах по щитовидной железе были выявлены некрозы паренхимы при воздействии аналогичных низких доз ДДТ без последующей лейкоцитарной инфильтрации [3]. Сравнение опытных групп показало наличие зависимости от длительности воз-

действия дисраптора. Животные, начавшие потреблять ДДТ после рождения, демонстрировали изменения, наблюдаемые в пубертатном периоде у животных, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию.

В сетчатой зоне происходили схожие с контрольными животными морфодинамические процессы, но нормализация количества клеток в срезе сетчатой зоны была обусловлена увеличением ее площади, а не увеличением числа клеток в единице площади. Сопоставление пролиферативной активности кортикостероцитов и структуры сетчатой зоны подтверждает, что при постнатальном воздействии ДДТ, ее развитие протекает более активно до пубертатного периода, а при пренатальном и постнатальном воздействии активация развития происходит после пубертата.

Было проведено исследование транскрипционной регуляции морфогенетических процессов в корковом веществе надпочечников.

Известно, что Wnt-сигналинг играет важную роль в формировании клубочковой зоны [4]. Выявленное снижение активации Wnt-сигналинга в постнатальном развитии обуславливало фрагментарность клубочкового слоя. Но увеличение численности клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме указывало на начальные стадии активации Wnt, что позволило увеличить площадь клубочковой зоны к 70-ым суткам. Менее выраженное снижение транслокации β -катенина в ядро у крыс, подвергавшихся только постнатальному воздействию ДДТ, и адекватное контролю развитие у них клубочковой зоны подтверждают роль снижения активации Wnt-сигналинга в выявленных нарушениях морфогенеза.

Роль Wnt-сигналинга в развитии и функционировании пучковой зоны изучена значительно меньше. Мы установили, что гибель клеток и регенерация происходили при подавлении Wnt-сигналинга особенно в участках регенерации. В постпубертатном периоде развитие пучковой зоны соответствовало возрастной норме и характеризовалось ингибированием Wnt-сигналинга. Наши данные подтверждают результаты фактически единственного исследования E. Walczak с соавторами, показавшей, что активация канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга подавляет дифференцировку кортикостероцитов пучковой зоны, но при этом не обнаруживается в пролиферирующих клетках [5].

В пубертатном периоде гипоплазия сетчатой зоны сопровождалась увеличением процента клеток с мембранной локализацией β -катенина. При этом отмечалось начало активации Wnt-сигналинга, также так и клубочковой зоне. Это стимулировало ее дальнейшее развитие, и после достижения половой зрелости мы наблюдали ее увеличение, а не регресс. Таким образом, изменения активации Wnt-сигналинга и морфологические изменения в постнатальном развитии сетчатой и клубочковой зон были схожими.

В дополнение к Wnt-сигналингу, который является ключевым регулятором пролиферации и дифференцировки клеток нами была изучена роль транскрипционного фактора Nhex, известного как мощный репрессор пролиферации.

Исследование выявило выраженную обратную зависимость числа Nhex- и Ki-67-позитивных клеток в клубочковой зоне у контрольных животных. Воздействие дисраптора приводило к повышению экспрессии Nhex и разобщению связи с пролиферацией, что указывает на действие других активирующих деление клеток факторов, но, тем не менее, в группах отрицательная зависимость между уровнями Nhex и Ki-67 сохранялась.

В пучковой зоне отмечалось повышение числа Nhex-позитивных клеток на фоне небольшого повышения пролиферативной активности и одновременного подавления канонического Wnt/ β -катенин сигналинга, что свидетельствует о дисрапторном действии ДДТ. На 70-ые сутки снижение пролиферации происходило на фоне супрессии канонического Wnt/ β -катенин сигналинга и активации Nhex, что также указывает на антипролиферативное действие Nhex, а отсутствие обратной зависимости между этими показателями указывает на механизм действия дисраптора.

Кортикостероциты сетчатой зоны на 42-ые сутки не синтезировали Nhex. У крыс, подвергавшихся действию ДДТ в пре- и постнатальном развитии, активация Nhex на 70-

ые сутки на фоне ингибирования Wnt/ β -катенин сигналинга подавляла деление клеток, как и в контроле. Отсутствие экспрессии Nhex и ингибирование Wnt/ β -катенин сигналинга, а также пониженный уровень пролиферации у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в постнатальном развитии, отражают отсутствие динамики в развитии сетчатой зоны. Таким образом, это приводило к формированию двух программ морфогенеза сетчатой зоны: 1. с уменьшением площади зоны и увеличением плотности клеток без инволюции в постпубертатном периоде при воздействии дисраптора в течение постнатального развития и 2. с замедлением формирования зоны в пубертатном периоде и более позднем ее развитии с сохранением пониженной плотности расположения кортикостероцитов в постпубертатном периоде у крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию.

Исследование выявило изменения продукции всех классов стероидных гормонов надпочечников в пубертатном возрасте. У крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, отмечалось снижение продукции минералокортикоидов и половых стероидов, и повышение глюкокортикоидов, также прогестерона и оксипрогестерона. У животных, подвергавшихся только постнатальному воздействию дисраптора, изменения были диаметрально противоположными, что свидетельствует о сложном, многоступенчатом механизме изменений стероидогенеза. После достижения половой зрелости у крыс нормализация продукция гормонов происходила только в пучковой зоне. У крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию, более ярко было выражено антиандрогенное действие ДДТ.

Выводы

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 коркового вещества надпочечников, связанные с нарушением его транскрипционной регуляции, обусловленной подавлением канонического Wnt-сигналинга Nhex.

Помимо морфологических изменений, воздействие эндокринного дисраптора на развивающийся организм приводит к изменению секреторной деятельности коркового вещества как в пубертатном периоде, так и у взрослого организма.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: Воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм нарушает постнатальный морфогенез и механизмы его регуляции, а также функционирование клубочковой, пучковой, сетчатой зон коркового вещества как до, так и после достижения половой зрелости, что является основой для развития разнообразных патологических процессов, в иммунной, репродуктивной и сердечно-сосудистой системах.

Литература:

1. *Sifakis S., Androutsopoulos 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. Vol. 51. P. 56-70.
2. *Pignatelli D., Xiao F., Gouveia A., Ferreira J., Vinson J.P.* Adrenarche in the rat. *J. Endocrinol.* 2006. Vol. 191. No. 1. P. 301–308.
3. *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.
4. *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.

5. *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.
6. *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.

Сведения об авторе

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл.почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия

Information about author

Nataliya Valentinovna Yaglova

D.Med.Sc., Head of Endocrine System Development Laboratory

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

УДК 612.014
ГРНТИ 76.03.00
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.10

**Н.В. Бобкова¹, Р.А. Полтавцева^{1,2}, Д.Ю. Жданова¹,
В.И. Ковалев¹, А.В. Чаплыгина¹**

¹Институт биофизики клетки РАН

²НИИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии
им. акад. В.И. Кулакова

ЭФФЕКТЫ БЕЛКА YB-1 В «ХИМЕРНОЙ» МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Статья посвящена изучению молекулярно-клеточного взаимодействия мезенхимальных стромальных клеток человека с гиппокампальной первичной культурой трансгенных 5XFAD мышей и влиянию многофункционального белка YB-1 на память и состояние ниши взрослого нейрогенеза у животных с химерной моделью болезни Альцгеймера. Результаты свидетельствуют о целесообразности комплексного применения клеточной терапии в сочетании с YB-1 для активации компенсаторных механизмов при болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания, трансгенные 5XFAD мыши, первичная культура гиппокампа, мезенхимальные стромальные клетки человека, химерная культура, многофункциональный белок YB-1.

N.V. Bobkova¹, R.A. Poltavtseva^{1,2}, D.Ju. Zhdanova¹, V.I. Kovalev¹, A.V. Chaplygina¹

Institute of Cell Biophysics of the RAS

NMRC for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov

THE EFFECT OF YB-1 PROTEIN IN CHIMERIC MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

The paper focuses on the molecular cell interaction of human mesenchymal stromal cells with the hippocampal primary culture of transgenic XFAD mice and the effect of multifunctional YB-1 protein on the memory and state of adult neurogenesis niches in animals with a chimeric model of Alzheimer's disease. The results suggest the usefulness of a comprehensive use of cell therapy in combination with YB-1 to activate compensatory mechanisms in patients with Alzheimer's disease.

Keywords: neurodegenerative diseases, transgenic 5XFAD mice, primary culture of the hippocampus, mesenchymal stromal stem cells of human, chimeric culture, multifunctional protein YB-1.

Введение

Несмотря на то, что в мировой литературе накоплен значительный экспериментальный материал по изучению морфологических, биохимических и физиологических характеристик болезни Альцгеймера (БА), в настоящее время не существует однозначной концепции молекулярных основ патогенеза данного заболевания и адекватных подходов к его лечению и профилактике [1]. По прогнозам ВОЗ, если не будет найдено эффективное лечение, то к 2050 году число заболевших деменциями, где основную долю составляют больные БА, приблизится к 131 млн человек [2]. Нейрофармакология, включающая развитие генной и клеточной терапии, становится на ближайшие 20 лет одним из приоритетов государственной политики РФ, согласно Национальной технологической инициативе [3]. Число публикаций по этой теме за последние 5 лет возросло более, чем в 30 раз [PubMed].

В основу нашей работы положена гипотеза, что нарушение взрослого нейрогенеза в основных мозговых нишах является ключевым патогенетическим фактором БА, а ее лечение может быть осуществлено за счет активации собственного эндогенного нейрогенеза [4].

Цель работы

Целью работы явилась оценка эффективности комплексного воздействия клеточной терапии на основе трансплантации мезенхимальных мультипотентных стромальных стволовых клеток (ММСК) и применения многофункционального белка YB-1 с выраженными нейропротекторными свойствами на характеристики нейродегенеративного процесса в условиях химерной модели болезни Альцгеймера.

Материалы и методы

Комплексное исследование выполнено на животной и клеточной модели БА с использованием трансгенных (Tg) мышей 5XFAD и первичной культуры их гиппокампа. В хронических опытах проведено детальное изучение молекулярно-клеточных эффектов мозговой трансплантации ММСК, выделенных из Вартонова студня пупочного канатика человека, в нишах взрослого нейрогенеза – субвентрикулярной зоне (SVZ) и субгранулярной зоне зубчатой фасции (SGZ), а также в коре и гиппокампе Tg животных. О состоянии нейрогенеза судили по интенсивности иммунопозитивности к BrdU на срезах мозга, для определения направленности и степени дифференцировки использовали антитела к нестину, 3бета-тубулину, доблкортину, GFAP и MAP2- маркерам разных стадий зрелости нейральных прогениторов. Особенностью данного исследования явилось использование «химерной» клеточной модели, позволившей анализировать состояние человеческих ММСК в процессе их кокультивирования с первичной клеточной культурой гиппокампа 5XFAD мышей, что позволило приблизить эксперимент к условиям клинического использования мозговой трансплантации этих клеток [5]. Первичная культура ММСК была выделена из Вартонова студня ткани пупочного канатика. Забор материала производился с письменного информированного согласия нескольких здоровых обследованных рожениц после операции Кесарева сечения. Дальнейшее выделение ММСК проводили в соответствии с протоколом, описанным нами ранее [6]. Культивирование клеток проводили в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в среде DMEM/F12 (1:1, Gibco, USA) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) в культуральных флаконах 25 см² (Corning, USA). Смену среды на 50% проводили, как правило, через трое суток. При достижении состояния 80% конfluence, клетки рассевали в соотношении 1:2. Для снятия клеток с поверхности пластика применяли 0,05% раствор трипсина («ПанЭко»). Экспрессию поверхностных маркеров ММСК анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием первичных антител, конъюгированных с фикоэритрином (PE), к CD90, CD105, CD73, CD19, HLA-DR и конъюгированных с FITC HLA-ABC (BD,

USA), согласно протоколу фирмы-производителя [7]. Измерения проводили на приборе FACScan (BD, USA). Хроническое интраназальное введение YB- (2 мкг/мышь) проводили в течение 3-х недель Tg мышам с трансплантацией ММСК или добавляли его в среду культивирования ММСК перед их помещением в первичную гиппокампальную культуру 5XFAD животных. Обучение и тестирование пространственной памяти животных проводили в водном лабиринте Морриса. Для статистической обработки результатов использовали однофакторный анализ One Way ANOVA с последующим Post-Hoc анализом с применением критерия Tukey's HSD, а также двухсторонний критерий Стьюдента. Данные представлены как $M \pm m$. Различия считались значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Поведенческие эксперименты выявили позитивный эффект трансплантации ММСК человека на память трансгенных животных, нарушенную под влиянием развития нейродегенеративного процесса альцгеймеровского типа, что явилось подтверждением результатов, полученных нами ранее на модели спорадической формы БА [8]. Эффект проявился через 2 мес и сохранялся через 3 мес после введения в мозг ММСК. Трансплантированные в мозг ММСК выживали более 60 дней и проявили способность к миграции, при этом одним из мест их локализации была SVZ, ответственная за нейрогенез во взрослом мозге. Длительность позитивного эффекта ММСК была связана с их низким потенциалом к дифференцировке, что было обнаружено как при трансплантации их в мозг Tg животных, так и при их кокультивировании с Tg культурой. По-видимому, это свойство позволяло ММСК сохранять способность к выделению трофических и ростовых факторов, характерную для стволовых клеток [9], что проявилось в активации формирования нейрональной сети и индукции синаптогенеза в Tg культуре гиппокампа, кокультивированной с ММСК. Tg мыши характеризовались изменением баланса интенсивности нейрогенеза в SVZ и SGZ, который восстанавливался под влиянием субхронического интраназального (и/н) введения белка YB-1. Однако сами ММСК погибали в Tg химерной культуре более интенсивно, чем в nTg культуре. Обработка ММСК человека стресс-белком YB-1 достоверно повышала их выживаемость в агрессивной среде Tg культуры. Комплексное использование трансплантации ММСК и и/н введения YB-1 сопровождалось повышением нейрональной плотности в гиппокампе Tg мышей и увеличением астроцитарного индекса в SVZ. Кокультивирование с ММСК выражено снижало иммунопозитивность к бета-амилоиду в клетках Tg культуры гиппокампа. Таким образом, позитивные изменения в Tg культуре гиппокампа, индуцированные ММСК+YB-1, свидетельствуют об активации механизмов, направленных на компенсацию потери нейронов, характерную для Tg культуры и являющуюся главной причиной нарушения памяти у Tg животных и пациентов, страдающих БА [10].

Выводы

Результаты свидетельствуют, что ММСК в отличие от иммунологических или фармакологических подходов, как правило, направленных на одну из мишеней патологического процесса, оказывают комплексный оздоровительный эффект на мозг, пораженный нейродегенеративным процессом. Наблюдается активация синаптогенеза и формирование нейрональной сети, что повышает функциональную способность еще незатронутых апоптозом клеток, а также ММСК способствуют очищению мозга от нейротоксического белка бета-амилоида. Белок YB-1 является одним из основных факторов, повышающих выживаемость ММСК в агрессивной среде мозга, пораженного нейродегенерацией альцгеймеровского типа, что существенно повышает эффективность клеточной терапии с использованием ММСК.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новым является и создание *in vivo* и *in vitro*

химерных моделей БА "мышь-человек", позволяющих исследовать взаимовлияние донорских клеток человека на состояние нейрогенеза в мозге мыши-реципиента или первичной культуре гиппокампа трансгенных животных. Такой подход позволяет не только оценить влияние агрессивной среды мозга с нейродегенерацией альцгеймеровского типа на выживаемость трансплантированных нейрональных прогениторных клеток, но и разработать средства их защиты, что важно для продвижения клеточной терапии для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-15-00392.

Литература

1. Caselli R.J., Beach T.G., Knopman D.S., Graff-Radford N.R. Alzheimer Disease: Scientific Breakthroughs and Translational Challenges. *Mayo Clin Proc.* 2017. Vol. 92. No. 6. P. 978-994.
2. Tiwari S., Atluri V., Kaushik A., Yndart A., Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int. J. Nanomedicine.* 2019. Vol. 19. No. 14. P. 5541-5554.
3. Loera-Valencia R., Piras A., Ismail M.A.M., Manchanda S., Eyjolfsdottir H., Saido T.C., Johansson J., Eriksdotter M., Winblad B., Nilsson P. Targeting Alzheimer's disease with gene and cell therapies. *J. Intern Med.* 2018. Vol. 284. No. 1. P. 2-36.
4. Bobkova N.V., Poltavtseva R.A., Leonov S.V., Sukhikh G.T. Neuroregeneration: Regulation in Neurodegenerative Diseases and Aging. *Biochemistry (Mosc).* 2020. Vol. 85. Suppl. 1. P. S108-S130.
5. Espuny-Camacho I., Arranz A.M., Fiers M., Snellinx A., Ando K., Munck S., Bonnefont J., Lambot L., Corthout N., Omodho L., Vanden Eynden E., Radaelli E., Tesseur I., Wray S., Ebner A., Hardy J., Leroy K., Brion J.P., Vanderhaeghen P., De Strooper B. Hallmarks of Alzheimer's Disease in Stem-Cell-Derived Human Neurons Transplanted into Mouse brain. *Neuron.* 2017. Vol. 93. No. 5. P. 1066-1081.
6. Жданова, Д.Ю., Полтавцева Р.А., Свирцевская Е.В., Бобкова Н.В. Влияние интраназального введения экзосом мультипотентных мезенхимных стромальных клеток на память у мышей в модели болезни Альцгеймера. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2020. Вып. 4. С. 289-296.
7. Galipeau J., Krampera M., Barret J., Dazzi F., Deans R.J., DeBrujin J., Dominici M., Fibbe W.E., Gee A.P., Gimble J.M., Hematti P., Koh M.B.C., LeBlanc K., Martin I., McNiece I.K., Mendicino M., Oh S., Ortiz L., Phinney D.G., Planat V., Shi Y., Stroncek D.F., Viswanathan S., Weiss D.J., Sensebe L. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytherapy.* 2016. Vol. 18. No. 2. P. 151-159.
8. Bobkova N.V., Poltavtseva R.A., Samokhin A.N., Sukhikh G.T. Therapeutic effect of mesenchymal multipotent stromal cells on memory in animals with Alzheimer-type neurodegeneration. *Bull Exp Biol Med.* 2013. Vol. 156. No. 1. P. 119-121.
9. Caplan A.I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.* 2017. Vol. 6. No. 6. P. 1445-1451.
10. Vasic V., Barth K., Schmidt M.H.H. Neurodegeneration and Neuro-Regeneration-Alzheimer's Disease and Stem Cell Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20. No. 17. P. 4272-4293.

Сведения об авторах

Наталья Викторовна Бобкова

к.б.н., в.н.с.

Институт биофизики клетки РАН

Москва, Россия

Эл. почта: nbobkova@mail.ru

Information about authors

Natalia Victorovna Bobkova

the head of Lab

Institute of Cell Biophysics of the RAS

Moscow, Russia

Эл. почта: nbobkova@mail.ru

Полтавцева Римма Алексеевна

к.б.н., с.н.с.

Институт биофизики клетки РАН
Национальный медицинский исследовательский
центр акушерства, гинекологии и перинатологии
Москва, Россия

Эл. почта: rimpol@mail.ru

Жданова Дарья Юрьевна

м.н.с., аспирантка

Институт биофизики клетки РАН
Москва, Россия

Эл. почта: daryu.zhdanova.1991@mail.ru

Ковалев Владимир Игоревич

м.н.с.

Институт биофизики клетки РАН
Москва, Россия

Эл. почта: kovalev@chemist.com

Чаплыгина Алина Вадимовна

м.н.с.

Институт биофизики клетки РАН
Москва, Россия

Эл. почта: lshadowhao@yandex.ru

Rimma Alekseevna Poltavtseva

senior scientist

National Medical Research Center for Obstetrics, Gyne-
cology, and Perinatology named after Academician V.I.
Kulakov

Moscow, Russia

Эл. почта: rimpol@mail.ru

Daria Jurievna Zhdanova

postgraduate student

Institute of Cell Biophysics of the RAS
Moscow, Russia

Эл. почта: rimpol@mail.ru

Vladimir Igorevich Kovalev

research scientist

Institute of Cell Biophysics of the RAS
Moscow, Russia

Эл. почта: kovalev@chemist.com

Alina Vadimovna Chaplygina

research scientist

Institute of Cell Biophysics of the RAS
Moscow, Russia

Эл. почта: lshadowhao@yandex.ru

УДК 611.018:611.453

ГРНТИ 76.03.00

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.11

С.С. Обернихин, Н.В. Яглова., Д.А. Цомартова,

С.В. Назимова, В.В. Яглов

ФГБНУ НИИ морфологии человека

ДИСРЕГУЛЯЦИОННОЕ ДЕЙСТВИЕ НА МОРФОГЕНЕЗ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КЛУБОЧКОВОЙ ЗОНЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ ЭНДОКРИННЫМ ДИСРАПТОРОМ ДДТ

*Воздействие эндокринного дисраптора ДДТ вызывает нарушение развития клубочко-
вой зоны, что обусловлено высокой экспрессией факторов плюрипотентности наряду
с подавлением факторов, обеспечивающий созревание кортикостероцитов, что в ре-
зультате приводит к снижению продукции альдостерона и компенсаторной гиперпла-
зии клубочковой зоны.*

Ключевые слова: надпочечник, клубочковая зона, развитие, транскрипционный кон-
троль, эндокринные дисрапторы, ДДТ

S.S. Obernikhin, N.V. Yaglova, D.A. Tsomartova,

S.V. Nazimova, V.V. Yaglov

FSBI Research Institute of Human Morphology

DEREGULATORY ACTION OF ENDOCRINE DISRUPTOR DDT ON MORPHOGENESIS AND FUNCTION OF ADRENAL ZONA GLOMERULOSA

*Exposure to endocrine disruptor DDT impairs development of adrenal zona glomerulosa by
higher expression of pluripotency factors along with the suppression of factors that ensure the
maturation of cortical cells. It leads to a decrease in aldosterone production and compensatory
hyperplasia of zona glomerulosa.*

Key words: adrenal gland, zona glomerulosa, development, transcription control, endocrine
disrupting chemicals, DDT

Введение

Развитие клубочковой зоны в корковом веществе надпочечников имеет сложную транскрипционную регуляцию. Ранние этапы ее развития активируются каноническим Wnt-сигналингом [1]. В постнатальном периоде важную роль в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки играют транскрипционные факторы Oct4 и Nhex [2-4]. В научной литературе все больше накапливается данных о способности эндокринных дисрапторов нарушать морфогенетические процессы, а не только синтез гормонов и их взаимодействие с рецепторами [5]. Дисморфогенетическое действие эндокринных дисрапторов на постнатальное развитие всех зон коркового вещества надпочечников остается малоизвестным.

Цель – выявить нарушения морфогенеза и функционирования клубочковой зоны надпочечников эндокринным дисраптором ДДТ.

Материалы и методы

Работа выполнена на 40 самцах крыс Вистар. Крысы опытной группы (n=20) развивались в условиях непрерывного воздействия низких доз ДДТ. С момента зачатия самки потребляли раствор ДДТ (20мкг/л) вместо питьевой воды, постнатально с молоком матери, а затем самостоятельно. Крысы контрольной группы потребляли питьевую воду. 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.

Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов надпочечников. Изучение экспрессии Nhex, Oct4 и β -катенина в кортикостероцитах 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). Результаты иммуногистохимических исследований выражали в виде количества иммунопозитивных клеток в мм² площади среза клубочковой, пучковой и сетчатой зон в связи с отсутствием значимых различий в числе кортикостероцитов в единице площади среза на 42-е и 70-е сутки постнатального развития. В сыворотке крови крыс определяли концентрацию альдостерона методом ИФА с помощью наборов («Cusabio», Китай). Проводили исследование ультраструктуры клеток клубочковой зоны надпочечников методом трансмиссионной электронной микроскопии («Carl Zeiss», Германия). Для количественной оценки структурных и ультраструктурных параметров использовали программу для морфометрии «ImageScore» («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 ($M \pm m$). Анализ связи числа β -катенин-, Ki-67-, и Oct4-позитивных кортикостероцитов в клубочковой зоне и концентрации альдостерона проводили с помощью критерия Пирсона. 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

У крыс контрольной группы в возрасте 6-ти недель клубочковая зона представляла собой циркулярный слой, располагающийся под капсулой. Она занимала менее 10% площади коркового вещества, клетки формировали клубочкообразные структуры, между которыми выявлялись тонкие прослойки рыхлой соединительной ткани. Просветы капилляров были очень малы и, как правило, были заполнены плазмой. Отмечалась высокая

экспрессия β -катенина кортикостероцитами. β -катенин локализовался преимущественно на цитоплазматических мембранах. Накопление β -катенина в цитоплазме было крайне слабо выражено, но клетки с транслоцированным в ядро β -катенином составляли четверть иммунопозитивных кортикостероцитов. Выявлены высокая пролиферативная активность клеток и низкая экспрессия фактора *Nhex*, известного своими антипролиферативными свойствами [6]. Также в клубочковой зоне обнаружено небольшое число *Ost4*-позитивных кортикостероцитов.

У крыс, подвергшихся воздействию низких доз ДДТ, в возрасте 6-ти недель размеры клубочковой зоны были меньше, так как клубочковая зона имела фрагментарное строение, а продукция альдостерона ниже контрольных значений. Наблюдались изменения в микроциркуляторном русле: сосуды были расширены, часто наблюдались стазы эритроцитов. Число кортикостероцитов с мембранной локализацией β -катенина было в полтора раза меньше, чем в контрольной группе, а доля клеток с локализацией в цитоплазме превышала контрольные значения. Транслокация β -катенина в ядро была значительно снижена. Пролиферативная активность кортикостероцитов была повышена. Одновременно наблюдалось большее число *Nhex*-позитивных клеток в клубочковой зоне. Отмечалось увеличение экспрессии *Ost4*.

В 10-ти недельном возрасте у интактных животных отмечено уменьшение размеров клубочковой зоны и повышение продукции альдостерона. Число клеток с мембранной локализацией β -катенина уменьшалось, но процент клеток с транслокацией β -катенина в ядро не изменялся. Пролиферативная активность клеток клубочковой зоны уменьшалась, а число *Nhex*-и *Ost4*-позитивных кортикостероцитов увеличивалось. Наблюдалась обратная корреляция между уровнем экспрессии *Ost4* и продукцией альдостерона ($R=-0,83$ $p=0,0058$) и прямая зависимость числа *Ost4*- и *Ki-67*-позитивных клеток ($R=0,94$ $p=0,00013$).

В 10-ти недельном возрасте у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, выявлено увеличение размеров клубочковой зоны в отличие от контрольной группы. Пролиферативная активность клеток уменьшилась, как и в контроле. В отличие от контрольных животных, у крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ, отмечалось уменьшение *Ost4*-экспрессирующих клеток. Численность *Nhex*-экспрессирующих клеток не увеличивалась и сохранялась на прежнем уровне, незначительно превышая контрольные значения. Корреляции между уровнем экспрессии *Ost4* и *Ki-67*, а также продукцией альдостерона сохранялись. Число экспрессирующих β -катенин клеток также уменьшалось с возрастом без изменения его транслокации в ядро в обеих группах, но уровень активации канонического *Wnt*-сигналинга был ниже. Однако увеличилось число клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме, что указывает на ранние стадии активации *Wnt*-сигналинга.

Несмотря на большие размеры, продукция альдостерона не превысила контрольных значений. Напротив, наблюдалась лишь тенденция к нормализации продукции альдостерона. Это было связано с нарушением созревания секреторного аппарата клеток. В контроле клубочковая зона уменьшалась, но продукция альдостерона увеличивалась. Нами установлено, что это достигалось за счет перестройки митохондриального аппарата клеток. Процесс синтеза альдостерона начинается и заканчивается в митохондриях. Поэтому их количество очень тесно связано с активностью секреторных процессов. В норме у крыс при переходе к половой зрелости происходит замена крупных митохондрий на большее количество митохондрий меньшего размера, что дает значительное увеличение площади поверхности их мембран [7]. У крыс, развивавшихся в условиях воздействия ДДТ, эти изменения происходили в значительно меньшей степени, что и обусловило меньшую стероидогенную активность клеток.

Выводы

Воздействие эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм вызывает

нарушения морфогенеза, а именно замедление постнатального развития, и как следствие снижение продукции гормонов клубочковой зоной коркового вещества надпочечников. Задержка в морфологическом и функциональном развитии клубочковой зоны связана с более высоким содержанием в ней кортикостероидов, экспрессирующим эмбриональный фактор плюрипотентности Oct4 и подавлением канонического Wnt-сигналинга и активацией Hhex. Активное развитие клубочковой зоны после наступления половой зрелости связано с уменьшением экспрессии Oct4 в сочетании с активацией Wnt-сигналинга, а также с нарушением в возрастной оптимизации секреторного аппарата, что компенсировалось за счет увеличения численности кортикостероидов.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: ДДТ оказывает дисморфогенетическое действие, замедляя развитие клубочковой зоны надпочечников, путем поддержания более высокой экспрессии факторов плюрипотентности и подавления факторов, обеспечивающих функциональное созревание кортикостероидов, что приводит к снижению продукции альдостерона и компенсаторной гиперплазии клубочковой зоны.

Цитируемая литература

1. Berthon A., Martinez A., Bertherat J., Val P. Wnt/b-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol. Cell. Endocrinology*. 2012. Vol. 351. P. 87–95.
2. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В. Роль транскрипционного фактора Oct4 в постнатальном развитии и функционировании коркового вещества надпочечников. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2019. №2. С. 114-120.
3. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Назимова С.В., Яглов В.В. Регуляция пролиферативных процессов в корковом веществе надпочечников крыс транскрипционным фактором PRH при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019. Т.167. №3. С.381-385.
4. Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Obernikhin S.S., Nazimova S.V., Ivanova M.Y., Chereshneva E.V., Yaglov V.V., Lomanovskaya T.A. Transcription factors β -catenin and Hex in postnatal development of the rat adrenal cortex: implication in proliferation control. *Heliyon*. 2021. V.7. e05932
5. Papalou O., Kandaraki E.A., Papadakis G., Diamanti-Kandarakis E. Endocrine Disrupting Chemicals: An Occult Mediator of Metabolic Disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2019. Vol. 10. Art. 112.
6. Topisirovic I., Culjkovic B., Cohen N., Perez J.M., Skrabanek L., Borden K.L. The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *EMBO J*. 2003. Vol. 22. P. 689–703.
7. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Цомартова Д.А. Возрастные изменения структуры митохондрий – регулятор активности стероидогенеза в кортикостероидных надпочечниках крыс. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2020. Т.9. № 1. С.64-70.

Сведения об авторах

Светлана Владимировна Назимова

к.м.н., ст.научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы
Эл. почта: pimka60@list.ru
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия

Information about authors

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development
E-mail: pimka60@list.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Дибакхан Асланбековна Цомартова

к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы

Эл. почта: dtsomartova@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Эл. почта: ober@mail.ru

Валентин Васильевич Яглов

д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Nataliya Valentinovna Yaglova

D.Med.Sc., Head of Endocrine System Development Laboratory

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: dtsomartova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obernikhin

D.Med.Sc., Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: ober@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Valentin Vasilyevich Yaglov

D.Med.Sc., Professor, Principal Research Worker of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: vyaglov@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

УДК 577.175[52+82]:57.044

ГРНТИ 34.39.53

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.12

Д.А. Цомартова, Н.В. Яглова., С.С. Обернихин,

С.В. Назимова, В.В. Яглов

ФГБНУ НИИ морфологии человека

ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОФИЗИОЛОГИИ АДРЕНАЛОЦИТОВ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ДИХЛОРОДИФЕНИЛТРИХЛОРОЭТАНА

Хроническое воздействие низких доз дихлордифенилтрихлорэтана не вызывает значительного уменьшения продукции адреналина, обусловленное компенсаторными изменениями цитофизиологии адреналоцитов крыс, заключающимися в усилении функциональной активности митохондриального аппарата.

Ключевые слова: адреналоцит, надпочечник, адреналин, дихлордифенилтрихлорэтан

D.A. Tsomartova, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin,

S.V. Nazimova, V.V. Yaglov

FSBI Research Institute of Human Morphology

ALTERED CYTOPHYSIOLOGY OF EPINEPHRINE-PRODUCING CELLS IN RATS AFTER CHRONIC EXPOSURE TO LOW DOSES OF DDT

Chronic low-dose exposure to dichlorodiphenyltrichloroethane does not diminish epinephrine production since epinephrine-secreting adrenal cells significantly intensify mitochondrial activity to restore epinephrine secretion.

Keywords: epinephrine-producing cell, adrenals, epinephrine, dichlorodiphenyltrichloroethane

Введение

Механизмы действия эндокринных дисрапторов на секрецию катехоламинов адреналокцитами мало изучены, в то время как эта проблема имеет большое медико-социальное значение, поскольку продукция катехоламинов обеспечивает нормальное функционирование жизненно важных органов. Известно, что воздействие ДДТ способно уменьшать продукцию дофамина [1]. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что низкодозовое воздействие эндокринного дисраптора вызывает уменьшение секреции адреналина в системный кровоток [2].

Цель: для установления механизмов нарушения секреторной деятельности адреналокцитов было проведено изучение цитофизиологии адреналокцитов крыс, длительно подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, для установления механизмов нарушения секреции адреналина.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар (n=20). Крысы опытной группы (n=10) потребляли раствор о,п-ДДТ (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мкг/л вместо воды в течение 1,5 месяцев, начиная с периода новорожденности. Расчет уровня воздействия ДДТ проводили с учетом требований к определению низких доз и нормативам содержания ДДТ в пищевой продукции согласно Техническому регламенту Таможенного союза ТР ТС 021/2011. Крысы контрольной группы (n=10) получали водопроводную воду. Отсутствие в воде и корме для животных ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений подтверждено методом газожидкостной хроматографии.

Концентрацию адреналина в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов ("IBL International", Германия).

Для электронно-микроскопического исследования мозговое вещество надпочечника фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в какодилатном буфере с постфиксацией в 1% растворе тетраоксида осмия. После стандартной проводки заливали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме PowerTome X (RMC Boeckeler, США). Проводили компьютерную морфометрию препаратов с помощью программы "ImageScope" ("Leica Microsystems", Германия). Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Полученные результаты

У крыс, подвергавшихся хроническому воздействию ДДТ, отмечалось небольшое уменьшение продукции адреналина (в среднем на 9%), но оно не было статистически значимым. Наблюдались изменения в строении адреналокцитов. Размеры адреналокцитов и их ядер были больше, чем у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пренатальном и постнатальном периоде, но размер ядер не достигал контрольных значений. Ядра имели овальную форму и четкий контур. В структуре ядра значительно превалировал эухроматин (рис. 1). У адреналокцитов отмечались выраженные изменения в структуре митохондрий. Митохондрии были значительно увеличены в размерах, характеризовались отеком матрикса и деструкцией крист (рис. 1). Количество митохондрий в клетках было уменьшено по сравнению с контролем. Также было значительно меньшим содержание секреторных гранул (рис. 1). Хорошо была выражена гЭПС, в парануклеарной области встречался комплекс Гольджи.

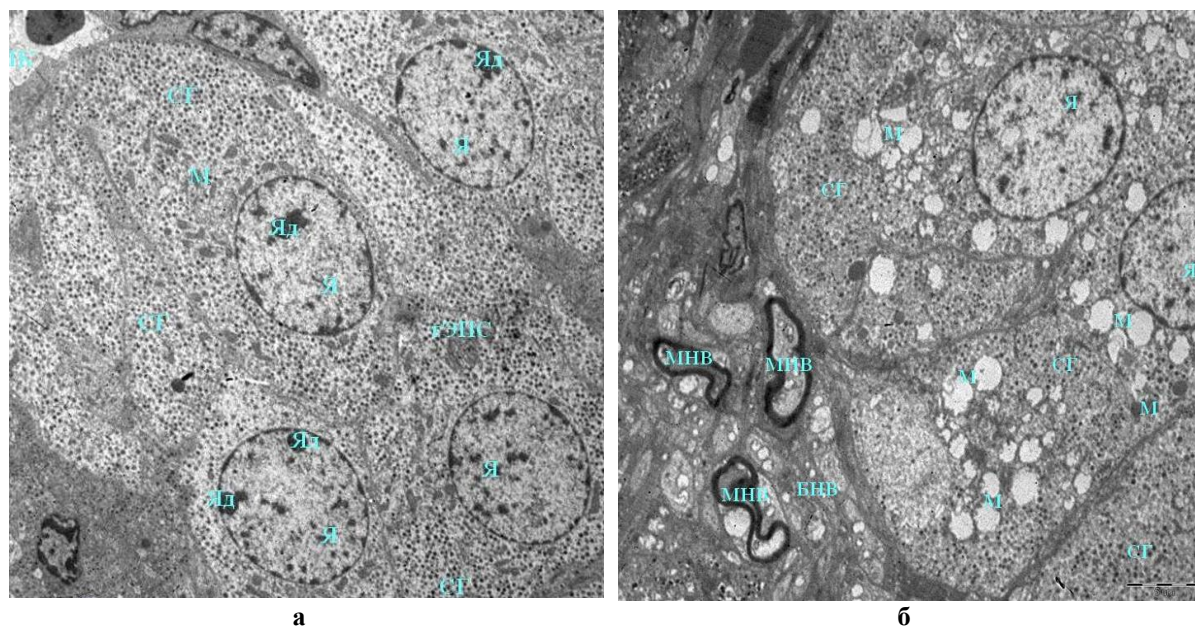


Рис. 1. Ультраструктура адреналцитов крысы контрольной группы (а) и подвергавшейся хроническому воздействию ДДТ (б).

Примечания: гЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть, М – митохондрия, СГ – секреторные гранулы, Я – ядро, Яд – ядрышко.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с первого дня постнатального развития, выявлены значительные отек матрикса и деструкция крист митохондрий, свидетельствующие об усилении их функциональной активности, при хорошо выраженном белоксинтезирующем аппарате и незначительном уменьшении содержания адреналина в системном кровотоке.

Известно, что митохондрии в хромоаффинных клетках выполняют не только функции биологического окисления и окислительного фосфорилирования, но и, располагаясь под плазмолеммой, участвуют в экзоцитозе гранул, регулируя наряду с эндоплазматической сетью содержание и транспорт ионов кальция [3, 4]. У крыс опытной группы митохондрии с выраженным отеком матрикса располагались в различных участках цитоплазмы. Секреторные гранулы, которые способны выделять содержимое за счет растворения и молекулярной секреции [5], практически не отличались по структуре от контрольных животных. Эти данные свидетельствуют о повышении функциональной активности митохондрий, что подтверждает пониженное содержание секреторных гранул в цитоплазме адреналцитов и адекватное контрольным значениям содержание адреналина в плазме крови.

Выводы

Хроническое воздействие низких доз дихлордифенилтрихлорэтана вызывает изменения цитофизиологии адреналцитов крыс, приводя к усилению функциональной активности митохондриального аппарата, что можно рассматривать как компенсаторное изменение, направленное на поддержание секреторных процессов.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: усиление активности митохондриального аппарата адреналцитов является компенсаторной реакцией на дисрапторное воздействие дихлордифенилтрихлорэтана.

Цитируемая литература

1. Hatcher J.M., Delea K., Richardson J., Pennel K., Miller G. Disruption of dopamine transport by DDT and its metabolites. *Neurotoxicology*. 2008. Vol. 29. No.4. P. 682–690.

2. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Влияние пренатального и постнатального воздействия низких доз дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на секрецию катехоламинов у крыс в разные периоды онтогенеза. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т.163. № 4. С. 415-418.

3. 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.

4. *García-Sancho J., de Diego A.M., García A.G.* Mitochondria and chromaffin cell function. *Pflugers Arch.* 2012. Vol. 464. P. 33-41.

5. *Villanueva J. Viniegra S., Gimenez-Molina Y., García-Martinez V., Expósito-Romero G., del Mar Frances M., García-Sancho J., Gutiérrez L.* The position of mitochondria and ER in relation to that of the secretory sites in chromaffin cells. *Journal of Cell Science.* 2014. Vol. 127. P. 5105-5114.

Сведения об авторах

Дибакхан Асланбековна Цомартова

к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы
Эл. почта: dtsomartova@mail.ru
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия

Наталья Валентиновна Яглова

д.м.н., зав. лабораторией развития эндокринной системы
Эл. почта: yaglova@mail.ru
ФГБНУ «НИИ морфологии человека»
Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия
Эл. почта: ober@mail.ru

Светлана Владимировна Назимова

к.м.н., ст.научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы
Эл. почта: pimka60@list.ru
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия

Валентин Васильевич Яглов

д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы
Эл. почта: vyaglov@mail.ru
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия

Information about authors

Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development
E-mail: dtsomartova@mail.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

Nataliya Valentinovna Yaglova

D.Med.Sc., Head of Endocrine System Development Laboratory
E-mail: yaglova@mail.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obornikhin

D.Med.Sc., Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development
E-mail: ober@mail.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development
E-mail: pimka60@list.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

Valentin Vasilyevich Yaglov

D.Med.Sc., Professor, Principal Research Worker of Laboratory of Endocrine System Development
E-mail: vyaglov@mail.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА В ПРЕПУБЕРТАТНОМ ПЕРИОДЕ У КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ДДТ

Воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм снижает митотическую активность лимфоцитов тимуса в препубертатном периоде. Это не связано с уменьшением числа лимфобластов субкапсулярного слоя, а обусловлено уменьшением числа делящихся клеток в глубоких слоях коркового вещества и мозговом веществе.

Ключевые слова: тимус, митоз, лимфоциты, ДДТ, эндокринный дисраптор

D.A. Tsomartova, E.P. Timokhina, N.V. Yaglova,
S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov
FSBI Research Institute of Human Morphology

MITOTIC ACTIVITY OF LYMPHOCYTES IN PREPUBERTAL RATS EXPOSED TO LOW DOSES OF DDT

Low-dose developmental exposure to DDT results in inhibited mitotic activity of thymic lymphocytes in prepubertal rats. Decreased number of proliferating cells in deeper layers of the cortex and in the medulla, not subcapsular lymphoblasts, contributes to lowered proliferation rate.

Keywords: thymus, mitosis, lymphocytes, DDT, endocrine disrupter

Введение

Препубертатный возраст является периодом активного развития тимуса. К пубертатному возрасту тимус достигает максимального развития и начинается его возрастная инволюция. Воздействия на иммунную и эндокринную системы развивающегося организма в пренатальном и постнатальном развитии, непосредственно или опосредованно через материнский организм вызывает значительные сдвиги в развитии тимуса за счет изменения темпов пролиферации и дифференцировки его клеток [1-3]. В настоящее время одним из облигатных факторов антропогенного воздействия являются эндокринные дисрапторы, поступающие в организм с пищевыми продуктами, водой, гигиеническими и косметическими препаратами. Ранее было показано, что низкодозовое воздействие эндокринного дисраптора ДДТ изменяет тиреоидный и стероидный статус развивающегося организма, что создает основу для изменения морфогенетических процессов в органах-мишенях [4-6].

Целью настоящего исследования было определение показателей митотической активности клеток тимуса у крыс препубертатного возраста, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ.

Материалы и методы

Эксперимент был выполнен на самцах крыс Вистар (n=10), рожденных самками, которые с первого дня ссаживания с самцами до достижения потомством 21-дневного возраста вместо воды получали раствор о,п-ДДТ («Sigma-Aldrich», США) с концентрацией 20 мкг/л. С 22-х суток потомство было переведено на самостоятельное потребление аналогичного раствора ДДТ. Среднесуточное потребление ДДТ составило $2,89 \pm 0,12$ мкг/кг, что соответствует потреблению ДДТ человеком с продуктами питания с учетом максимально допустимых уровней его содержания в пищевых продуктах [7]. В качестве контрольной группы использовали потомство интактных самок (n=10). Животных выводили из эксперимента в возрасте 7 суток, что соответствует препубертатному периоду. Определяли пролиферацию тимоцитов *ex tempore* по методике [8, 9]. После стандартной

гистологической проводки и заливки в парафин и изготавливали гистологические препараты, в которых определяли пролиферацию тимоцитов методом иммуногистохимии с использованием поликлональных антител к Ki-67 «Cell Marque», США). Количественную оценку иммуногистохимических реакций проводили методом компьютерной морфометрии с использованием программы «ImageScope» («Leica Microsystems», Германия).

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 7.0 («Statsoft Inc.», США). Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

Гистологическое исследование показало, что развитие коркового и мозгового вещества тимуса у крыс препубертатного возраста, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ, соответствовало возрастному контролю (Рис. 1).

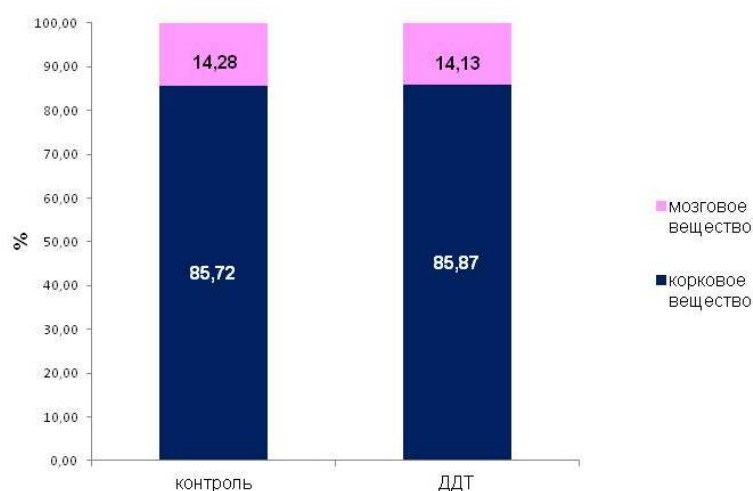


Рис. 1. Соотношение коркового и мозгового вещества в тимусе крыс препубертатного возраста контрольной группы и развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ.

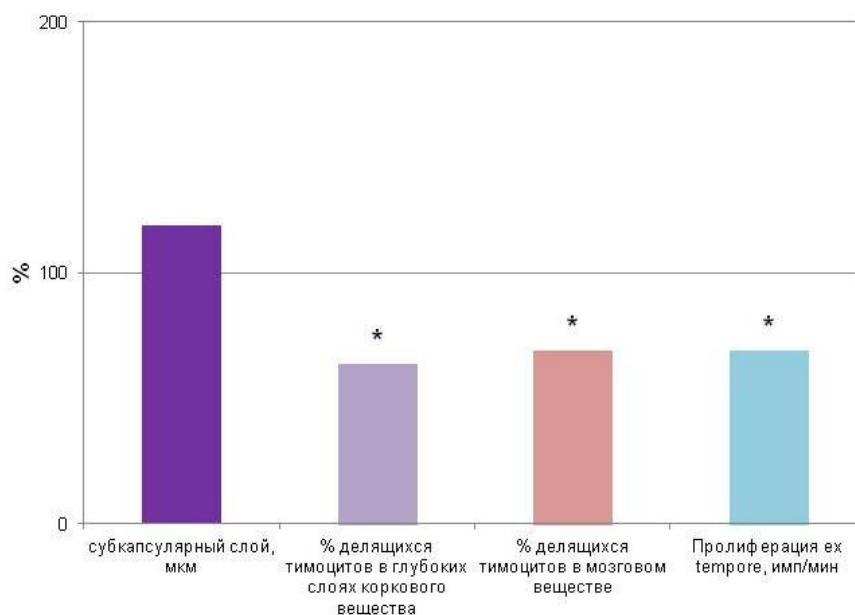


Рис. 2. Показатели пролиферативной активности тимоцитов крыс препубертатного возраста, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ.

Примечания: значения контрольной группы приняты за 100%, * – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

В корковом и мозговом веществе встречались митотически делящиеся клетки. Субкапсулярный слой, представленный активно делящимися лимфобластами, был хорошо выражен. Его ширина незначительно превышала контрольные значения (Рис. 2).

В более глубоких слоях коркового вещества количество Ki-67-позитивных тимоцитов было статистически значимо меньше, чем в контрольной группе (Рис. 2). Аналогично и в мозговом веществе пролиферативная активность тимоцитов была меньшей (Рис. 2). Пролиферация тимоцитов *ex tempore* у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, была статистически значимо ниже значений контрольной группы (Рис. 2).

Таким образом, сопоставление данных радиоизотопного и гистотопографического исследования показало, что снижение митотической активности происходит не за счет уменьшения темпов пролиферации недифференцированных лимфобластов, а дифференцирующихся клеток, то есть наблюдается дисбаланс в соотношении пролиферации и дифференцировки, на фоне пониженной митотической активности клеток. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что у новорожденных крыс, развивавшихся при воздействии дисраптора, также отмечается пониженная митотическая активность тимоцитов, но в значительно меньшей степени [10]. Это снижение было обусловлено незначительным уменьшением числа лимфобластов и пролиферирующих лимфоцитов в корковом веществе и более выраженным уменьшением – в мозговом. Следовательно, в процессе развития эти изменения стали более выраженными.

Выводы

В препубертатном возрасте лимфоциты тимуса крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ демонстрируют пониженную митотическую активность. Это обусловлено снижением пролиферативной активности в глубоких слоях коркового вещества и мозговом веществе.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: воздействие эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм приводит к снижению митотической активности лимфоцитов тимуса в препубертатном периоде, являющимся периодом активного роста органа.

Литература

1. Яглова Н.В., Обернихин С.С. Изменения процессов дифференцировки Т-клеток тимуса у потомства самок мышей, перенесших стимуляцию иммунной системы в ранние сроки беременности. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 160. № 11. С. 613-616.
2. Singh N., Miranda K., Singh U., Nagarkatti P., Nagarkatti M. Diethylstilbestrol (DES) induces autophagy in thymocytes by regulating Beclin-1 expression through epigenetic modulation. Toxicology. 2018. Vol. 410. P. 49-58.
3. Яглова Н.В., Яглов В.В., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Обернихин С.С. Изменения пролиферации и апоптоза тимоцитов крыс при хроническом воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. Современные технологии в медицине. 2017. Т. 9. № 14. С.62-67.
4. Яглов В.В., Яглова Н.В. Морфологические и функциональные изменения щитовидной железы крыс при длительном воздействии низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана. Современные технологии в медицине. 2014. Т. 6. № 4. С. 55-61.

5. Яглова Н.В., Яглов В.В. Механизмы дисрапторного действия дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на функционирование фолликулярных эпителиоцитов щитовидной железы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т.160. № 8. С. 196-199.

6. 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.

7. *Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»*. СПб.: ГИОРД, 2015. 176 с.

8. 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.

9. Рахмилевич А.Л., Обернихин С.С. Усиление чувствительности клеток селезенки мышей к интерлейкину-2 после внутривенного введения конканавалина А. Иммунология. 1990. № 1. С. 68-69.

10. 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 во внутриутробном периоде развития. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 2. С. 261–264.

Сведения об авторах

Дибакхан Асланбековна Цомартова

к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы
Эл. почта: dtsomartova@mail.ru
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия

Екатерина Петровна Тимохина

к.б.н., научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия
Эл. почта: rodich-k@mail.ru

Наталья Валентиновна Яглова

д.м.н., зав. лабораторией развития эндокринной системы
Эл. почта: yaglova@mail.ru
ФГБНУ «НИИ морфологии человека»
Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия
Эл. почта: ober@mail.ru

Валентин Васильевич Яглов

д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы
Эл. почта: vyaglov@mail.ru
ФГБНУ НИИ морфологии человека
Москва, Россия

Information about authors

Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development
E-mail: dtsomartova@mail.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

Ekaterina Petrovna Timokhina

PhD, Research worker of Laboratory of Endocrine System Development
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia
E-mail: rodich-k@mail.ru

Nataliya Valentinovna Yaglova

D.Med.Sc., Head of Endocrine System Development Laboratory
E-mail: yaglova@mail.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obernihkhin

D.Med.Sc., Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development
E-mail: ober@mail.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

Valentin Vasilyevich Yaglov

D.Med.Sc., Professor, Principal Research Worker of Laboratory of Endocrine System Development
E-mail: vyaglov@mail.ru
Research Institute of Human Morphology
Moscow, Russia

УДК 616-021.02
ГРНТИ 76.29.30
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.14

А.Д. Черкасов
ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии
2

ОСТЕОХОНДРОЗ ПОЗВОНОЧНИКА - ФАКТОР ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА

С помощью МРТ и рентгенологических исследований, проводимых в течение 20 лет, установлено, что остеохондроз позвоночника является не только проявлением преждевременного старения костно-хрящевой ткани, но и патологическим фактором, приводящим к преждевременному и болезненному старению человека.

Ключевые слова: *Остеохондроз позвоночника, МРТ, нейродистрофические изменения, заболевания ЖКТ, кардиологические синдромы, реабилитация, старение.*

A. Cherkasov

¹The institute of general pathology and pathophysiology

OSTEOCHONDROSIS OF THE SPINE - A FACTOR OF PREMATURE AGING OF A PERSON

With the help of MRI and X-ray studies, carried out for 20 years, it was found that osteochondrosis of the spine is not only a manifestation of premature aging of bone and cartilage tissue, but also a pathological factor leading to premature and painful aging of a person.

Keywords: *Osteochondrosis of the spine, MRI, neurodystrophic changes, gastrointestinal diseases, cardiac syndromes, rehabilitation, aging.*

Введение

Данная статья является итогом двадцатилетних исследований причин хронических заболеваний, сокращающих продолжительность жизни человека, и преждевременного старения. Отечественная геронтология второй половины прошлого века рассматривала два взгляда на связь старения с возрастными заболеваниями. Первый состоял в том, что возрастные заболевания, приводящие к окончанию жизни, являются следствием старения организма. Статистически это подтверждается на 99%. Вторым взглядом состоял в том, что старение и возрастные заболевания это два независимых процесса. Он был основан на том, что очень малый процент людей доживает до возраста 100, 120, 140 и даже 168 лет (Муслимов), оставаясь практически здоровыми, в то время как смертность начинает возрастать с возраста 40 лет. Третий взгляд принадлежал И.И. Мечникову – хронические заболевания приводят к преждевременному старению человека. Геронтологи, придерживавшиеся второго взгляда, разбивали задачу увеличения продолжительности жизни человека на две подзадачи. Первая подзадача – это борьба с так называемыми возрастными заболеваниями. Вторая подзадача – это замедление процессов старения. Многие геронтологи считали решение второй подзадачи бесперспективным без решения первой. Современные геронтологи пытаются сразу решать вторую подзадачу полагая, что хронические заболевания являются следствием запрограммированного старения или генетических нарушений.

Последние 60 лет диагноз остеохондроз позвоночника (ОП) ассоциировал у наших граждан с болями в спине благодаря теории остеохондроза проф. Я.Ю. Попелянского. По теории Попелянского ОП это комплексное заболевание ортопедическое и неврологическое. «Первично это заболевание позвоночника, и значительная часть его клинических проявлений носит характер ортопедических синдромов» (вертебральные синдромы) (Попелянский Я.Ю., 1989). Теория предполагает, что костные выросты – остеофиты приводят к компрессии нервных корешков и вызывают болевые ощущения во всем теле. Причиной остеохондроза Попелянский считал прямохождение человека.

ОП придавался фатальный характер – все люди должны страдать ОП, а сам ОП имеет четкую возрастную зависимость.

В 1995 г. в Вене на съезде вертебрологов и ортопедов был сделан доклад д-ра Вольфа (G.D.Wolf). Он привёл результаты обследования 50000 пациентов с пояснично-крестцовой радикулопатией. Из них 40% больных с изменениями на рентгенограммах не имели клинических неврологических проявлений. С другой стороны, в 40 % пациенты имели болевые синдромы в спине без отклонений на рентгенограммах. Было сделано заключение: боли в спине и позвоночнике не связаны с дистрофическими изменениями в позвонках и межпозвоночных дисках. Наши неврологи пришли к этому заключению только в 2015 году на ежегодной конференции «Боль в спине – междисциплинарная проблема», проходившей в 1-ом Московском Медицинском университете им. И.М. Сеченова. Причиной болевых синдромов стали считать грыжи межпозвоночных дисков. Диагноз, который ещё недавно не вызывал сомнения - «дискогенный радикулит» или «пояснично-крестцовый радикулит», уже давно объявлен не соответствующим действительности и исключен из МКБ-10. По данным рентгенологии, ни остеохондроз позвоночника, ни грыжи дисков не могут вызвать болевые синдромы в спине, позвоночнике и конечностях (Жарков П.Л., 2001, 2003).

Недавно появилось новое творение российских врачей. По представлению ряда неврологов ОП является защитной реакцией на возрастное разрушение костной ткани для сохранения прочности позвоночного столба (Никифоров А.С. и др., 2015). Остеохондроз позвоночника рассматривается как позитивный эволюционный реконструктивный процесс, свойственный каждому человеку. Этот процесс вызван нарастанием статодинамической нагрузки на позвоночник и ведёт к увеличению у взрослого человека прочности позвоночника. При ОП возможно развитие патологических осложнений, ведущих к местной и/или отраженной боли и ограничению движений.

Нами в течение 15 лет были проведены исследования причин болевых синдромом в позвоночнике с помощью МРТ. Установлено, что причиной болевых синдромов в спине и позвоночнике являются спастические состояния межпозвоночных мышц – межостистых, межпоперечных и поперечно-остистых. Причиной спастических состояний мышц является повышенное потребление крахмала и сахара при недостатке витамина В1 – тиамина. Мы предложили рассматривать боли в спине как мягкий вариант болезни бери-бери – полиневропатии вследствие гиповитаминоза витамина В1 (Черкасов А.Д. 2019). Так же было показано, что ОП может возникать уже в подростковом возрасте 14 - 17 лет и может отсутствовать при возрасте пациентов 78 лет, страдающих болями в пояснице.

В 2020 году диагноз ОП был исключён из Международной классификации болезней 11-й редакции (МКБ-11). ОП перестал быть болезнью, которую нужно лечить, но он не перестал быть фактором преждевременного и болезненного старения человека. Из «бича человечества XX века» остеохондроз превратился в «Домоклов меч» для каждого человека на всю его жизнь. «Домоклов меч» - огромный меч без ножен, висящий на одном волоске конского хвоста над головой сидящего на троне правителя царедворца Домокла. Это символ неизбежной и вечной опасности. Опасность ОП это опасность нейродистрофических процессов во внутренних органах, приводящих к хроническим заболеваниям.

Позвоночник и спинной мозг является проводниками не только моторных и сенсорных влияний, но также содержат тракты нервов симпатической нервной системы, иннервирующей внутренние органы. Ещё в тридцатые годы прошлого века академиком А.Д. Сперанским и его сотрудниками было показано, что нарушение симпатической иннервации внутренних органов (компрессия нервов или их перерезка) приводит к снижению секреторных функций и развитию нейродистрофических процессов в иннервируемом органе. Раздражение симпатических нервов приводит к образованию трофических язв, язв желудка, кровоизлияниям в тканях внутренних органов и некрозу тканей. Восстановление симпатической иннервации приводило к регенерации тканей и исчезновению ранее возникших нейродистрофических изменений в тканях внутренних органов и

мышцах. Эти патологические проявления наблюдали на животных в острых экспериментах. На основе экспериментальных данных была разработана доктрина академика А.Д. Сперанского о нейродистрофических расстройствах, лежащих в основе хронических заболеваний внутренних органов.

Суть доктрины состояла в том, что симпатическая нервная система помимо управления работой внутренних органов – моторикой, секрецией, фильтрацией и пр. также отвечает за управление метаболизмом и регенерацией тканей. Нарушения в симпатической нервной системе и её проводящих нервных путях приводят к развитию нейродистрофических процессов в тканях внутренних органов и развитию неинфекционных хронических заболеваний.

Нарушения симпатической иннервации возникают при проблемах позвоночника – спастических состояниях мышц и остеохондрозе позвоночника. Симпатические нервные волокна - аксоны, не имеют прочной миелиновой оболочки как моторные и сенсорные нервы ЦНС и легко поддаются компрессии. Компрессия симпатических нервов в зависимости от локализации в различных отделах позвоночника приводит не только к развитию хронических заболеваний желудка, кишечника и сердца (Черкасов А.Д., 2008а, 2008б, 2012), но и преждевременному и болезненному старению человека. Концепцию преждевременного и болезненного старения развивал ещё И.И. Мечников. По его мнению хронические заболевания и преждевременное старение вызывается аутоинтоксикацией продуктами жизнедеятельности патогенных микроорганизмов: стафилококков, пневмококков, колибацил и пр., присутствующих в кишечнике в большем количестве, чем бифидобактерии и лактобактерии.

Цель исследования: Исследование факторов, приводящих к преждевременному старению человека. Разработка методов увеличения продолжительности жизни человека.

Результаты

Нашими многолетними исследованиями, проведёнными с помощью МРТ на более, чем 100 пациентах, и анализом диагностических заключений 600 амбулаторных пациентов было показано, что болевой синдром в позвоночнике предшествует развитию дистрофических изменений в позвонках и дисках. В настоящее время ОП рассматривается нами как преждевременное старение костно-хрящевой ткани вследствие нарушения трофики позвонков, вызванного многолетним нарушением кровотока в телах позвонком при спастических состояниях межпозвонковых мышц.

Нами также было проведено сопоставление хронических заболеваний с патологическими состояниями позвоночника 46 пациентов. Состояние позвоночника оценивалось с помощью рентгенологических исследований, МРТ, функциональных проб на подвижность сегментов позвоночника и мануальной диагностики. Было показано, что в областях позвоночника, где локализован болевой синдром, изменяется тон изображения межпозвонковых мышц, т.е. изменяется МР-ответ мышечной ткани. Мышцы видны как тёмные области, приближающиеся по тону к воде или крови. Это говорит об увеличении доли воды в мышцах или наличии отёка. Нормальные (здоровые) мышцы имеют серый тон. При функциональных пробах на латерофлексию (изгибы позвоночника в стороны по всей его длине) в областях с болевым синдромом выявляются участки со сниженной подвижностью позвонков относительно друг друга. Это так называемые мышечные блоки – участки позвоночника, где межпозвонковые мышцы перешли в спастическое состояние. Это состояние может длиться днями, месяцами, годами и десятилетиями. Длительное спастическое состояние приводит к перерождению мышечной ткани – потери сократимости и эластичности, возникновению фиброзных волокон и жировых прослоек. На МРТ эти мышцы имеют слои с нормальным серым тоном, между которыми имеются белые прослойки – жировые скопления. Это является с одной стороны признаком нера-

ботающей мышцы, а с другой стороны это признак фиброза мышцы – прорастания фиброзных волокон в толще мышцы. Фиброз мышц обеспечивает жесткую связь между позвонками, сохраняющую форму позвоночного столба при значительных физических нагрузках. Наблюдения за пациентами, имеющими такие нарушения, и мануальная диагностика показали, что болевой синдром в этой области, как правило, отсутствует. Таким образом, болевые ощущения в спине связаны, прежде всего, с состоянием межпозвонковых мышц – спастика, воспаление (миозит) и отёк. Рисунок 1 является иллюстрацией описанных нами в предшествующих публикациях типичных нарушений в состоянии позвонков, межпозвонковых дисков и мышц позвоночника человека, возникающих к пожилому возрасту (60 лет), а также различных стадий развития остеохондроза позвоночника.

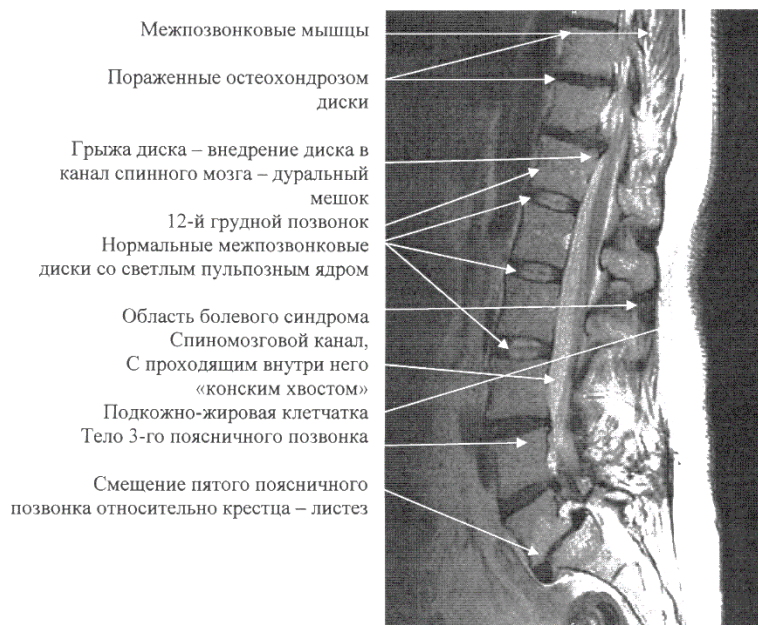


Рис. 1. МРТ поясничного отдела позвоночника шестидесятилетнего пациента.

В области болевого синдрома, где имеются три нормальных межпозвонковых диска, (рис. 1) межпозвонковые мышцы имеют более тёмный тон, чем тон в норме (мышцы в верхней части рисунка). Это говорит о присутствии большого количества воды в мышцах. Тёмные мышцы это мышцы находящиеся в спастическом состоянии. Этот участок служит иллюстрацией первичности спастических состояний межпозвонковых мышц перед развитием дистрофических процессов в позвонках межпозвонковых дисках. Выше и ниже спазмированных мышц мышцы позвоночника имеют яркие прожилки – жировые прослойки. Эти мышцы подверглись дистрофическому перерождению. Они потеряли сократимость и в них появились фиброзные волокна для сохранения прочности мышечного корсета позвоночника.

На рис. 2 на левом снимке оказано МРТ исследование другого нашего пациента 23 лет с болями в среднегрудном отделе позвоночника. В этой области обнаружены 3 межпозвонковых дисков тёмного тона (исчезли пульпозные ядра – они в норме светлые) и сниженной толщины. Болевой синдром локализован в области 5 – 8 грудных позвонков. В этой области мышцы позвоночника имеют тёмный тон, а подкожно-жировая клетчатка снижена по толщине. Это признак спастических состояний межпозвонковых мышц. На правом снимке показано МРТ исследование грудного отдела пациентки 17 лет. Видны 2 диска в состоянии дистрофии между 12 грудным позвонком и вторым поясничным позвонком (Th12 - L2). Тёмный тон мышц выше двенадцатого грудного позвонка и истощённая подкожно-жировая клетчатка в этой области. Это также является признаком спастических состояний межпозвонковых мышц. В области 6 – 8 грудных позвонков также

имеется спастическое состояние межпозвонковых мышц, приведшее к развитию острого гастрита, по причине которого было проведено это обследование.



Рис. 2. Снимок слева: МРТ грудного отдела позвоночника мужчины 23 лет. Снимок справа: МРТ грудного отдела пациентки 17 лет.

Причина хронических заболеваний ЖКТ – нарушение симпатической иннервации органов

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 33 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 большинства 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.

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 лечение гастрита уходило 2 месяца, на лечение язвенной болезни желудка 3 и более месяцев. Единственные случаи лечения многолетних энтероколита и колита потребовали 3 и 9 месяцев соответственно. Эти лица впоследствии наблюдались и посещали курсы массажа мышечного корсета позвоночника в течение 14 лет, рецидивов заболеваний не было.

Вертебро-кардиальные синдромы

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются первой, в процентном отношении, причиной смерти человека – более 55%. Возможность предотвращения заболеваний ССС является важнейшей задачей увеличения продолжительности жизни граждан РФ.

Исследование состояния позвоночника при коронарографии пациентов с кардиологическими синдромами

Хронические формы вертебро-кардиальных синдромов и их статистические закономерности мы изучали на основе анализа 60 коронарографических обследований, проведенных в частной клинике Москвы на ангиографической системе Innova 2000 фирмы General Electric.

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, вызванное атеросклерозом, и пациенты с умеренным поражением коронарных артерий, которое не может вызывать существенное нарушение кровообращения в миокарде. Общим для двух этих групп обследованных является наличие сильных проявлений остеохондроза в области верхне-грудного отдела позвоночника Th3-Th5. Нашими исследованиями ранее было показано, что развитие остеохондроза как дистрофического процесса в межпозвонковых дисках и позвонках вызывается многолетними спастическими состояниями межпозвонковых мышц, нарушающих трофику позвонков и дисков.



Рис. 3. 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.

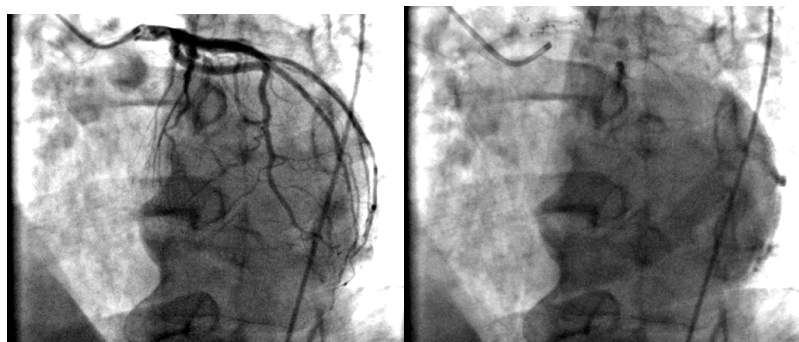


Рис. 4. Пациент Т.К. 2. Обследование коронарных артерий у другого пациента со стенокардией.

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.

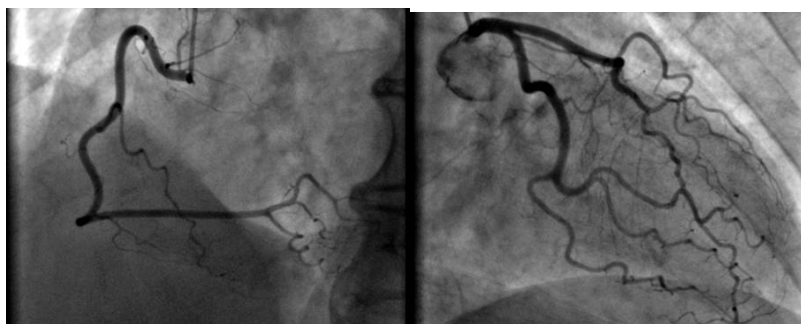


Рис. 5. Рентгенограмма правой коронарной артерии (снимок слева) и левой коронарной артерии (снимок справа) пациентки 46 лет с остеохондрозом верхнегрудного отдела позвоночника, компрессионным переломом 4-го грудного позвонка.

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 снижения толщины межпозвонковых дисков.

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. 3 – 5).

В восстановительной группе в ходе реабилитационных практик была проведена мануальная терапия от 1 до 10 сеансов по устранению ВКС для 10 пациентов с сильным проявлением кратковременной формы ВКС - со стенокардией (1), сердечной недостаточностью (3), желудочковой экстрасистолией (3), предсердной экстрасистолией (1), брадикардией (2). Мануальная терапия – массаж глубоких мышц позвоночника по типу миофасциального релизинга – полностью устраняли проявление перечисленных нарушений в работе сердца. Гимнастика по принципам китайской гимнастики цигун полностью устраняла приступы стенокардии и предсердной экстрасистолии.

Наши исследования, наблюдения и практики реабилитации показывают, что до 30% кардиологических больных страдают вертебро-кардиальными синдромами, которые в большинстве случаев поддаются реабилитационным мероприятиям.

Реабилитация при вертеброгенных патологиях

В качестве реабилитационных мероприятий мы использовали массаж глубоких мышц позвоночника по типу вибрационного воздействия на спазмированные мышцы, гимнастику для восстановления подвижности позвонковых двигательных сегментов и профилактики спастических состояний и диетологические рекомендации, предотвращающие гиповитаминоз витамина В1 (Черкасов А.Д., 2018).

Обсуждение

Анализ возрастных закономерностей развития остеохондроза позвоночника показал, что остеохондроз позвоночника может начаться в 17 лет, но может отсутствовать и в 78

лет. У подростков локализация боли в позвоночнике совпадает с локализацией мышечных блоков без дистрофических изменений, присущих остеохондрозу позвоночника или с начальной фазой их образования. У лиц среднего возраста области локализации болей в позвоночнике и области мышечных блоков совпадают с областями дистрофических изменений в межпозвонковых дисках и позвонках, т.е. с остеохондрозом позвоночника. У лиц старшей возрастной группы в областях дистрофических изменений боли отсутствуют и, наоборот, боли имеются в тех областях, где ещё нет далеко зашедших дистрофических изменений, но имеются длительно существующие спастические состояния мышц.

В практике врачей - специалистов по лучевой диагностике отсутствует анализ состояния мышц. Обязателен только анализ мягких тканей на предмет обнаружения опухолей и новообразований. Нашей основной задачей была МРТ диагностика состояния мышц, которые мы на основе мануальной диагностики определяли как долговременные спастические состояния, которые длятся месяцами, годами и десятилетиями. Практически у всех пациентов всех возрастов, начиная с 17 лет, с болевыми синдромами в позвоночнике в МРТ исследованиях нами обнаружены спастические состояния мышц. Следствием спастических состояний мышц являются не только болевые синдромы, дистрофические процессы в межпозвонковых дисках вследствие нарушения кровообращения в позвонках и дисках как следствие многолетних нарушений метаболизма. Спастические состояния в мышцах позвоночника имеют прямое отношение к состоянию внутренних органов.

В каждом сегменте позвоночника из межпозвонковых отверстий выходят симпатические нервы, иннервирующие внутренние органы. Обнаруженные нами спастические состояния межпозвонковых мышц создают компрессию, а при миозите и отёках раздражение симпатических нервов, не имеющих прочной миелиновой оболочки. Эффекты сдавления или раздражения локализуются в тех внутренних органах, к которым приходят эти нервы. Вследствие этого во внутренних органах возникают дисфункции, гиперфункции и нарушения регенеративных механизмов. Это и есть нейродистрофические процессы, приводящие к функциональным физиологическим нарушениям и преждевременному старению тканей внутренних органов. Как показал наш двадцати пятилетний опыт мануальной терапии, при устранении у человека спастических состояний межпозвонковых мышц дистрофические и язвенные процессы во внутренних органах обратимы. Это успешно можно осуществлять в молодом и среднем возрасте. В пожилом возрасте остеохондроз позвоночника и дистрофические явления в мышцах позвоночника уже не позволяют полностью восстановить нормальную иннервацию внутренних органов, а, следовательно, регенерацию тканей внутренних органов и слизистых оболочек желудка и кишечника. Это приводит к снижению секреции в ЖКТ соляной кислоты, ферментов, гормонов и нарушению процессов пищеварения. Белки не подвергаются перевариванию. Расщеплением белков занимается гнилостная микрофлора кишечника, порождая токсины, которые при нарушении регенерации слизистой оболочки кишечника приводят к возрастающему потоку токсинов в кровь. Следствием этого становятся хронические заболевания, сокращающие продолжительность жизни человека.

Наши исследования подтверждают нейротрофическую теорию старения человека (по В.В. Фролькису). Она состоит в том, что вегетативная нервная система, особенно, её симпатическая часть, управляет процессами метаболизма и регенерации тканей, а снижение её активности приводит к нарушениям в процессах регенерации тканей, что и является основным фактором старения. Естественно, всё, что подавляет регенеративные процессы (аутоинтоксикация, нарушение нервной трофики, вызванное компрессией симпатических нервов), приводит к преждевременному старению организма человека и к болезненной старости по И.И. Мечникову.

Заключение

1. Остеохондроз позвоночника, являясь проявлением преждевременного старения

костно-хрящевой ткани, вызывает преждевременное старение тканей внутренних органов и организма в целом.

2. Для увеличения продолжительности жизни человека необходимо предупредить развитие спастических состояний мышц позвоночника и развитие остеохондроза позвоночника.

3. Остеохондроз позвоночника не является заболеванием позвоночника, которое может быть вылечено, а является необратимым дистрофическим процессом, носящим характер инвалидности.

4. Проблема предотвращения и остановки развития остеохондроза позвоночника, как ведущего фактора нездоровья человека, является не медицинской проблемой, а проблемой физической культуры, а именно: стратегией на устранение спастических состояний мышц позвоночника, предшествующих патологическим дистрофическим процессам в позвоночнике - остеохондрозу.

5. Остеохондроз позвоночника не является ни возрастным процессом (несмотря на наличие возрастной тенденции развития), ни расплатой за прямохождение человека – неустраняемым фактором, не предусматривающим профилактику.

6. Развитие остеохондроза может быть предотвращено и остановлено на протяжении всей жизни методами устранения спастических состояний межпозвонковых мышц - массажем мышц спины и позвоночника по принципам миофасциального релизинга (расслабления глубоких мышц позвоночника) и гимнастикой для позвоночника по принципам китайской релаксационной гимнастики.

7. Физическая культура в XXI веке должна быть ориентирована не на усиление мышц спины и позвоночника с помощью тренажеров, а на их расслабление и регулярное поддержание здоровья мышечного корсета позвоночника, который нуждается в постоянном контроле за образованием мышечных блоков, гимнастике для позвоночника и массаже глубоких мышц позвоночника.

8. Для увеличения продолжительности жизни граждан РФ преподавание системы сохранения здоровья позвоночника должно начинаться уже со школы, как минимум, с вузов.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: Нейродистрофические нарушения во внутренних органах, приводящие к развитию хронических заболеваний, вызываются компрессией симпатических нервов при прохождении между спазмированными межпозвонковыми мышцами. Эти нарушения обратимы при устранении спастических состояний. Остеохондроз позвоночника это ещё и дистрофическое перерождение межпозвонковых мышц, делающее необратимыми нарушения симпатической иннервации внутренних органов. Следствием является преждевременное старение органов и тканей по причине нарушения регенеративных процессов. Разработанные нами методы реабилитации способны остановить развитие остеохондроза позвоночника и предотвратить развитие дисфункций и хронических заболеваний, имеющих в своей основе нейродистрофические процессы. Эти методы могут позволить каждому человеку вернуть себе здоровье и продлить свою жизнь за счет устранения так называемых возрастных заболеваний. Наша двадцатилетняя практика восстановления здоровья путём устранения нейродистрофических процессов, вызванных проблемами с мышечным корсетом позвоночника, показали, что человек может жить до девяностолетнего возраста без болезней (Черкасов А.Д., 2018).

Литература:

1. Попелянский Я.Ю. «Болезни периферической нервной системы». М. Медицина, 1989.
2. Жарков П.Л., Жарков А.П., Бубновский С.М. «Поясничные боли». ООО «Юниартпринт». М. 2001. 143 с.

3. Жарков П.Л. «Что такое остеохондроз в клинической практике». Бюллетень №5. XIII-я конференция мануальных терапевтов. «Актуальные вопросы мануальной терапии – 2003». М. 2003, с.97-98.

4. Никифоров А.С., Авакян Г.Н., Мендель О.И. Неврологические осложнения остеохондроза позвоночника. М. ООО Издательская группа «ГЕОТАР-Медиа». 267 с. 2015.

5. Черкасов А.Д. «Пути предотвращения остеохондроза позвоночника. Часть 1. Локализация дегенеративно-дистрофических изменений в позвоночнике». Ж. «Фундаментальные исследования». № 7, 2008, С. 41.

6. Черкасов А.Д. «Пути предотвращения остеохондроза позвоночника. Часть 2. Характеристики мышечных блоков в позвоночнике». Ж. «Фундаментальные исследования». № 7, 2008, С.45.

7. Черкасов А.Д. 2018. <http://www.healthsys.ru>.

8. Черкасов А.Д. МРТ исследование причин возникновения болевых синдромов в спине и их связи с остеохондрозом позвоночника. Журнал «East European Science Journal». Vol.2, 10 (50), 2019. P. 56-60.

Сведения об авторе

Анатолий Данилович Черкасов

ст. науч. сотр.

Эл. почта: healthsys@mail.ru.

ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии.

Москва, Россия

Information about author

Anatoliy Cherkasov

senior researcher

E-mail: healthsys@mail.ru,

The institute of general pathology and pathophysiology.

Moscow, Russia

УДК 616-06

ГРНТИ 76.29.45

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.15

В.Г. Васильков, А.И. Сафронов, Д.В. Осинькин

ПИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

КРИТЕРИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ ХОЛЕЦИСТЭКТОМИИ (ЛСХЭ)

Статья посвящена применению методики стабิโลграфии для оценки компенсации системы антиоксидантной защиты при использовании антигипоксантов-антиоксидантов для профилактики послеоперационных когнитивных дисфункций у пациентов при лапароскопической холецистэктомии (ЛСХЭ).

Ключевые слова: *послеоперационные когнитивные дисфункции, стабิโลграфия.*

Vasilkov V.G., Safronov A.I., Osinkin D.V.

PIFTPh - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia

ANTIOXIDANT PROTECTION CRITERIA IN LAPAROSCOPIC CHOLECYSTECTOMY

This is article dedicated to using stabilographia for evaluation criterion system antioxidant protection after application drugs (antihypoxants – antioxydants) for prevention cognitive dysfunction in Pts after laparoscopic cholecystectomy.

Keywords: *local abdominal hypothermia, intensive care, peritonitis, effect Peltier*

Актуальность. Многими исследованиями показано, что использование антигипоксантов-антиоксидантов в периоперационном периоде снижает количество случаев

послеоперационных когнитивных дисфункций (ПОКД). [2,6,10,11]. Общепринятых объективных методов мониторинга когнитивных функции пациента в периоперационном периоде, основанных на лабораторно-инструментальных или электрофизиологических методиках, в практике анестезиолога не существует. [1,510,13] Тем не менее, некоторые компоненты основных когнитивных функций могут быть отслежены при помощи современной электрофизиологической методики – стабิโลграфии [3,4,8,9,12]. В наших ранних исследованиях при изучении динамики стабิโลграфических параметров параллельно с клинико-лабораторными показателями у пациентов при ЛСХЭ с общим обезболиванием в условиях антиоксидантной защиты было получено регрессионное уравнение для оценки компенсации системы антиоксидантной защиты: [7] $P = 95Fu60-70Fх60+4V+W$. В докладе дается объяснение использованных показателей и их интерпретация.

Цель: установить критерии использования антигипоксантов-антиоксидантов в периоперационном периоде ЛСХЭ для профилактики ПОКД при общей анестезии.

Материал и методы исследования. Исследованы 90 пациентов при ЛСХЭ с общей анестезией, тяжесть состояния I-III по ASA. 1 группа (30) в процессе хирургического лечения антиоксидантную терапию не получала; 2 группа (30) получала антиоксидантную терапию мафусолом; 3 группа (30) - кардиоксипином; 4 (контрольная) группа - 24 здоровых добровольцев. Стабิโลграфические обследования проводились на компьютеризированном стабิโลграфе «ST-150»; программное обеспечение Stabip, разработано компанией «БИОСОФТ-М» (Москва) с участием сотрудников кафедры.

Результаты собственных исследований. Введение антигипоксантов-антиоксидантов привело к достоверному увеличению баллов шкалы MoCA в группах, где использовались мафусол и кардиоксипин, как на 2, так и на 3 сутки послеоперационного периода по сравнению с 1 группой, где эти препараты не использовались.

Таблица 1.

Значения тестов MoCA в группах пациентов и группе здоровых

Время исследований	1 группа (контроль)	2 группа (использован мафусол)	3 группа (использован кардиоксипин)	Здоровые добровольцы
До операции	27,0 [26,0; 28,0] *	21,0 [21,0;22,0] **,**	23,0 [22,0;25,0] **,**	28,0 [27,0;29,0] *
24 часа после операции	27,0 [26,0; 28,0] *	24,0 [23,0;25,0] **,**	25,0 [25,0;26,0] **,**	
48 часов после операции	27,0 [26,0;27,0] *	24,0 [23,5;25,5] **,**	26,0 [25,0;26,0] **,**	

* - наличие статистической разницы показателей по сравнению с контрольной группой (p<0,05)

** - наличие статистической разницы показателей между группами пациентов (p<0,017)

Использование антиоксидантов-антигипоксантов у пациентов 2 и 3 групп привело, помимо отсутствия развития у них ПОКД, к снижению показателей оксидантного стресса и повышению антиоксидантной активности, оцениваемой по уровню антиоксидантов плазмы крови.

Наиболее информативными показателями стабิโลграфии, свидетельствующими о наличии когнитивных нарушений, в исследовании явились: S(ОГ) (мм²) - площадь стабิโลграммы при открытых глазах пациента, FУ (ЗГ) (Гц) - частота колебаний по оси Y при закрытых глазах, QR - коэффициент Ромберга – процентное соотношение площадей стабิโลграммы при открытых и закрытых глазах пациента. Динамика изменений этих показателей в процессе исследований показана в таблице 2.

Таблица 2. Наиболее информативные стабิโลграфические показатели у пациентов в группах исследования

Время обследования	До операции	24 часа после операции	48 часов после операции
1 группа (без антиоксидантов)			
S (ОГ) (мм ²)	230,0 [196,0;288,0]**	323,0 [241,0;452,0]*, **	237,5 [152,0;323,0]**
FY (ЗГ) (Гц)	0,25 [0,16;0,33]	0,18 [0,124;0,22]**	0,24 [0,18;0,35]**
QR	84,2 [41,7;203,0]	103,0 [70,4;136,0]	91,1 [53,4;165,0]
2 группа (с мафусолом)			
S (ОГ) (мм ²)	210,0 [172,0;312,0]	241,0 [164,0;384,0]	259,0 [190,0;314,0]
FY (ЗГ) (Гц)	0,24 [0,16;0,31]	0,27 [0,16;0,35]	0,25 [0,16;0,29]
QR	112,0 [89,0;153,0]	95,0 [48,1;187,0]	108,5 [55,9;153,0]
3 группа (с кардиоксипином)			
S (ОГ) (мм ²)	197,5 [157,0;328,0]	211,0 [147,5;301,5]	250,0 [158,5;324,0]
FY (ЗГ) (Гц)	0,20 [0,17;0,26]	0,21 [0,17;0,30]	0,25 [0,18;0,30]
QR	117,00 [85,60;154,50]	120,50 [87,35;159,50]	61,00 [50,35;165,00]
Группа здоровых добровольцев			
S (ОГ) (мм ²)	152,0 [79,0;324,5]*	-	-
FY (ЗГ) (Гц)	0,17 [0,12;0,25]	-	-
QR	108,0 [77,7;152,0]	-	-

* - наличие статистической разницы показателей по сравнению с группой здоровых добровольцев (p<0,05)

** - наличие статистической разницы показателей в динамике обследования - до операции и через 24 часа, через 24 и 48 часов после операции, (с учетом поправки Бонферрони p<0,017)

Анализ значений уровня компенсации антиоксидантной защиты «Р» показал, что в группе здоровых добровольцев отсутствовали индивидуумы с выраженной декомпенсацией антиоксидантного статуса и, в основном, группа представлена здоровыми людьми с хорошей компенсацией антиоксидантной защиты (75%). В первой группе пациентов (без использования антиоксидантов-антигипоксантов) на 2-е сутки после операции количество пациентов со значительной декомпенсацией системы антиоксидантной защиты увеличилось почти в 2 раза (с 8 до 14), в то время как в группах с использованием мафусола и кардиоксипина их количество не изменилось по сравнению с дооперационным уровнем.

Использование антигипоксантов-антиоксидантов привело к статистически достоверному увеличению в анализируемых группах больных баллов шкалы MoSA как на 2 так и на 3 сутки послеоперационного периода по сравнению с 1 группой. На основании проведенных клиничко-инструментальных данных найдена взаимосвязь статико-локомоторных функций пациента (по показателям стабילוграфии) с состоянием когнитивных функций (оцененных по шкале MoSA) в послеоперационном периоде ЛСХЭ. В докладе подробно сопоставляются эти показатели

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новым является то, что предложен простой в техническом исполнении неинвазивный метод определения регрессионного показателя степени компенсации антиоксидантной защиты пациента «Р», основанный на данных стабילוграфических исследований: значения показателя $P \leq 130$ – значительная декомпенсация системы антиоксидантной защиты (необходимо назначение антигипоксантов-антиоксидантов); при $P = 130-150$ – средняя степень декомпенсации (назначение антигипоксантов-антиоксидантов желательно); при $P \geq 150$ – хорошая компенсация системы антиоксидантной защиты (антигипоксанты-антиоксиданты не имеют абсолютных показаний).

Литература

1. Большедворов Р.В., Кичин В.В., Федоров С. А., Лихванцев В.В. Эпидемиология послеоперационных когнитивных расстройств // Анестезия и реанимация. -2009. -№ 3. - С. 20-23.
2. Васильков В.Г. Антигипоксанты-антиоксиданты (кардиоксипин, мафусол) - в медицине критических состояний [Текст]: учебное пособие для врачей / В.Г. Васильков. - Пенза: ГБОУ ДПО ПИУВ Минздрава России, 2015. - 30 с.
3. Гурфинкель В.С. Физиология двигательной системы // Успехи физиол. наук. 1994. - Т.25, №2. - С.83-89.
4. Кубряк О.В. Практическая стабилметрия. Статические двигательные тесты с биологической обратной связью по опорной реакции [Текст] / О.В. Кубряк, С.С. Гроховский. - М.: ООО «ИПЦ Маска», 2012. - 88 с.
5. Лихванцев В.В. Анестезия в малоинвазивной хирургии [Текст] / В.В. Лихванцев. - М.: МИЛКQШ, 2005. - 350 с.
6. Овезов А.М. Этиопатогенез послеоперационной когнитивной дисфункции: вопросов больше, чем ответов [Текст] / А.М. Овезов, М.А. Лобов, А.В. Луговой и соавт. // Тез. XIV съезда Федерации анестезиологов и реаниматологов. - Казань, 2014. - С. 249- 250.
7. Патент RU2594976 Способ снижения анестезиологического риска при проведении лапароскопической холецистэктомии / Сафронов А.И., Киреев А.В., Васильков В.Г., Карпицкая С.А. - Заявл. 06.02.2016; зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 28.07.2016.
8. Скворцов Д.В. Стабилметрическое исследование: краткое руководство / Д.В. Скворцов - М.: Маска, 2010.-172 с.
9. Усачев В.И. Стабилметрия в постурологии [Текст]: Метод, пособие / В.И. Усачев. - СПб, 2004. - 14 с.
10. Усенко Л.В. Профилактика и коррекция послеоперационных когнитивных дисфункций у больных пожилого возраста [Текст]: метод, рекомендации / Л.В. Усенко, Шади Ейд Ризк, А.А. Криштафор и соавт. - Днепрпетровская государственная медицинская академия, 2012. - 60 с.
11. Черныш А.М., Козлова Е.К., Мороз В.В., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Манченко Е.А., Козлов А.П. Влияние антиоксиданта на основе янтарной кислоты на превращение метгемоглобина в оксигемоглобин in vitro. Общая реаниматология. 2018;14(2):46-59.
12. Эльнер А.М. Исследование периферических и центральных механизмов регуляции вертикальной позы человека и ее нарушений: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. - М., 1988.-34 с.
13. Ancelin M.L., de Roquefeuil G., Ledesert B. et al. Exposure to anaesthetic agents, cognitive functioning, and depressive symptomatology in the elderly // British Journal of Psychiatry - 2001. - Vol. 178. - P. 360-366.

Сведения об авторах

Валерий Григорьевич Васильков

д-р мед. наук, проф., зав. каф. анестезиологии, реаниматологии и скорой медицинской помощи
Э

ПИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО
Пенза, Россия

Алексей Иванович Сафронов

д-р мед. наук, проф. каф. анестезиологии, реаниматологии и скорой медицинской помощи
Ф

ПИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО
Пенза, Россия

Дмитрий Владимирович Осинькин

асс. каф. анестезиологии, реаниматологии и скорой медицинской помощи
И

ПИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО
Пенза, Россия

i

Information about authors

Valery G. Vasilkov

M.D., Prof., Head of Department of Anesthesiology, Resuscitation and Emergency Care
E-mail: air@piuv.ru

PIFTPh - Branch Campus of the FSBEI
Penza, Russia

Alexey I. Safronov

Associate Professor, Department of Anesthesiology, Resuscitation and Emergency Care
E-mail: air@piuv.ru

PIFTPh - Branch Campus of the FSBEI
Penza, Russia

Osinkin Dmitriy V

Assistant Professor, Department of Anesthesiology, Resuscitation and Emergency Care, E-mail: air@piuv.ru
E-mail: air@piuv.ru

PIFTPh - Branch Campus of the FSBEI
Penza, Russia

ИЗМЕНЕНИЯ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ СДВИГАХ СООТНОШЕНИЯ ИЗОТОПОВ ВОДОРОДА

Проведено исследование влияния кратковременного изменения содержания дейтерия в организме на функционирование щитовидной железы крыс. Выявлено усиление функциональной активности железы, не сопровождающееся увеличением периферической конвертации тироксина в трийодтиронин, одинаково как при повышении, так и при понижении содержания дейтерия в организме.

Ключевые слова: дейтерий, протий, изотопы водорода, щитовидная железа, тиреоидные гормоны

N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, E.P. Timokhina
FSBI Research Institute of Human Morphology

CHANGES IN THYROID FUNCTION INDUCED BY SHIFTS OF HYDROGEN ISOTOPES RATIO

Impact of short-term shift in deuterium body content on thyroid function was studied. Increased functional activity of the thyroid gland, but without raise in rate of thyroxine to triiodothyronine conversion was found both after depletion and enrichment of deuterium body content.

Keywords: deuterium, protium, hydrogen isotopes, thyroid gland, thyroid hormones

Введение

Дейтерий – стабильный изотоп водорода, широко распространенный в живой природе. В организме человека и млекопитающих животных содержание дейтерия достаточно велико [1], в частности оно больше содержания калия, натрия, кальция [2]. Роль этого изотопа водорода в жизнедеятельности клеток остается малопонятной. Известно, что связи дейтерия с другими атомами, в частности, атомами углерода обладают большей устойчивостью, чем протия, что обуславливает более низкую скорость химических реакций [3]. Однако это не единственный механизм действия дейтерия, поскольку изменение его содержания в организме демонстрирует эффекты, которые нельзя объяснить только скоростью метаболических процессов [4,5]. Влияние изменений концентрации дейтерия и протия во внутренней среде организма на функционирование эндокринных желез не известно.

Цель исследования – определить изменения в функционировании щитовидной железы при кратковременных сдвигах соотношения изотопов водорода.

Материалы и методы

Исследование выполнено на самцах крыс Вистар. Животные контрольной группы (n=7) потребляли дистиллированную воду с содержанием дейтерия [D]=146 ppm ad libitum, что соответствует содержанию дейтерия в водопроводной воде. Животные 1-й опытной группы (n=6) потребляли воду с повышенным содержанием дейтерия [D]=500000ppm (ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Россия), 2-й опытной группы (n=6) – с пониженным содержанием дейтерия [D]=10ppm (ИП Селиваненко, Россия) в течение 24 часов. Учитывали количество потребленной крысами жидкости, рассчитывали объемы потребленной жидкости на 100г массы тела.

В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли концентрации тиреоидных гормонов: общего и свободного тироксина (Т4 и сТ4), общего и свободного трийодтиронина (Т3 и сТ3), и тиреотропного гормона (ТТГ) с помощью коммерческих наборов («BioVendor», «Monobind», США).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ “Statistica” (“Statsoft Inc.”, США. Количественные данные, имеющие приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением. Рассчитывали относительные значения для параметров тиреоидного статуса, приняв средние значения контрольной группы за 100%. Для сравнения групп использовали однофакторный анализ ANOVA. Значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

Различий в количестве потребленной жидкости на единицу массы тела у крыс контрольной и опытной групп не выявлено.

Через 24ч у крыс, потреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия, обнаружено повышение концентрации Т4 без изменений концентрации его свободной фракции. Концентрация Т3 существенно не изменялась, но содержание сТ3 в системном кровотоке снизилось. Концентрация ТТГ была значительно ниже контрольных значений (рис. 1). Таким образом, тиреоидный статус крыс свидетельствует об усилении функциональной активности щитовидной железы. Снижение секреции ТТГ указывает, что эти изменения обусловлены непосредственно реакцией щитовидной железы на повышение содержания дейтерия во внутренней среде организма. Поскольку усиления превращения Т4 в Т3 не наблюдалось, можно прийти к заключению, что активность периферических дейодиназ не изменялась, и, видимо, эти ферменты менее чувствительны к повышению содержания дейтерия в организме [6].

У крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, выявлены повышение концентрации Т4 и снижение концентрации сТ4 в сыворотке крови. Содержание Т3 и сТ3 не изменялось. Концентрация ТТГ также была понижена (рис. 1). То есть у крыс, подвергавшихся снижению содержания дейтерия в организме, аналогично развивалась первичная гиперфункция щитовидной железы без повышения активности дейодиназ.

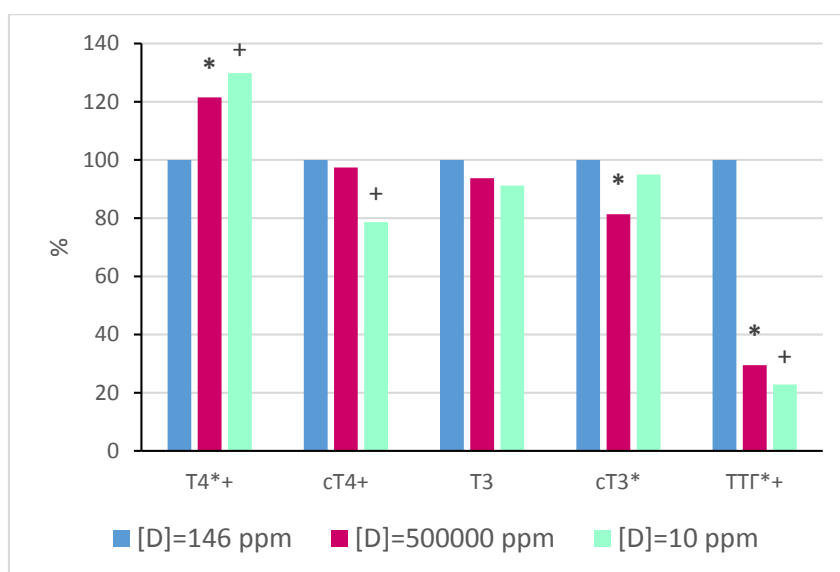


Рис. 1. Изменения продукции тиреоидных гормонов и ТТГ гипофиза через 24ч после потребления воды с различным содержанием дейтерия.

Примечания: значения контрольной группы [D]=146ppm приняты за 100%. * – статистически значимые отличия группы [D]=500000ppm, + – группы [D]=10ppm от контрольной группы.

Статистически значимых отличий между изучаемыми параметрами тиреоидного статуса обеих опытных групп не выявлено. Сравнение изменений, происходящих в функционировании щитовидной железы при повышении и понижении содержания дейтерия в организме, показывает, что отличия незначительны и связаны с изменением концентрации не связанных с белками плазмы фракций Т4 и Т3. Образование тиреоидных гормонов включает в себя синтез тироглобулина и его последующее йодирование, что требует высокой активности окислительно-восстановительных процессов и затрат энергии. По имеющимся в научной литературе данным, изменение концентрации дейтерия в культуральной среде не оказывало влияния на продукцию супероксид-аниона в дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов, но снижало эффективность фосфорилирования [7]. С другой стороны, было показано, что увеличение содержания дейтерия в культуральной среде клеток опухолевых линий оказывает антиоксидантное, а уменьшение, соответственно, прооксидантное действие [8, 9]. Следовательно, можно было предположить развитие противоположные изменений активности тироцитов при повышении и понижении содержания дейтерия. Однако, наши данные, напротив, показали наличие дуализма, то есть развития аналогичных эффектов при противоположности воздействий.

Выводы

Щитовидная железа демонстрирует высокую чувствительность к изменению содержания дейтерия в организме. Кратковременные сдвиги в как с сторону увеличения, так и уменьшения содержания дейтерия в организме приводят к сходным изменениям в функционировании щитовидной железы, заключающимся в повышении ее секреторной активности.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: любое кратковременное изменение содержания дейтерия в организме вызывает усиление продукции гормонов щитовидной железой.

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

Литература

1. Джимаков С.С., Басов А.А., Барышев М.Г. Распределение дейтерия в биологических жидкостях и внутренних органах: влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на градиент D/H и процессы адаптации. Доклады Академии наук. 2015. Т.465. №2. С. 245-248.
2. 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. Vol. 2. No. 1. P. 1-7.
3. Jancso G. Isotope effects. In: Vértes A, Nagy S, Klencsar Z, editors. *Handbook of nuclear chemistry*, vol. 2. Dordrecht, Netherland: Kluwer Academic Publishers; 2013. p. 85–116.
4. Hassanzade A., Mandegary A., Sharif E., Rasooli R., Mohammadnejad R., Masoumi-Ardekani Y. Cyclooxygenase inhibitors combined with deuterium-enriched water augment cytotoxicity in A549 lung cancer cell line via activation of apoptosis and MAPK pathways. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2018. Vol. 21. No. 5. P. 508-516.
5. 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.

6. Bates J.M., St. Germain D.L., Galton V.A. Expression Profiles of the Three Iodothyronine Deiodinases, D1, D2, and D3, in the Developing Rat. *Endocrinology*. 1999. Vol. 140. No. 2. P. 844–851.

7. 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.

8. Zhang X., Gaetani M., Chernobrovkin A., Zubarev R. Anticancer Effect of Deuterium Depleted Water - Redox Disbalance Leads to Oxidative Stress. *Mol. Cell. Proteomics*. 2019. Vol. 18. P. 2373–2387.

9. Zhang X., Wang J., Zubarev R.A. Slight Deuterium Enrichment in Water Acts as an Antioxidant: Is Deuterium a Cell Growth Regulator? *Mol. Cell. Proteomics*. 2020. Vol. 19. No. 11. P. 1790–1804.

Сведения об авторах

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы

Эл. почта: ober@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Екатерина Петровна Тимохина

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

Эл. почта: rodich-k@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Information about authors

Nataliya Valentinovna Yaglova

D.Med.Sc., Head of Endocrine System Development Laboratory

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obernikhin

D.Med.Sc., Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: ober@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Ekaterina Petrovna Timokhina

0PhD, Research worker of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: rodich-k@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

УДК: 53.01

ГРНТИ: 76.09.41

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.17

С.С. Джимаков^{1,2}, А.А. Елкина^{1,2}, А.А. Басов^{1,3}

¹Кубанский государственный университет

²ЮНЦ РАН

³Кубанский государственный медицинский университет

МЕХАНИЗМЫ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

Рассмотрены некоторые физические закономерности, обеспечивающие стабильное фракционирование изотопов, приводящие к накоплению определенных изотопных форм в интрацеллюлярном и межклеточном пространстве с проявлением этих эффектов на различных уровнях организма. Сделано предположение о том, что для более полного понимания вышеописанных процессов, необходимо изучить механизм обменного взаимодействия между частицами с целым спином (бозонами) и полуцелым спином (фермионами).

Ключевые слова: изотоп, изотопные эффекты, живые системы, нейтрон.

MECHANISMS OF FRACTIONATION OF STABLE ISOTOPES IN LIVING SYSTEMS

Some physical laws are considered that provide stable fractionation of isotopes, leading to the accumulation of certain isotopic forms in the intracellular and intercellular space with the manifestation of these effects at various levels of the organism. It is suggested that for a more complete understanding of the above processes, it is necessary to study the mechanism of exchange interaction between particles with integer spin (bosons) and half-integer spin (fermions).

Keywords: *isotope, isotope effects, living systems, neutron.*

Введение

Понимание возможных закономерностей формирования биофизических и биохимических эффектов при полиизотопном взаимодействии макро- и микроэлементов в организме представляет интерес для изучения особенностей функционирования как растительных, так и животных организмов и мест их обитания [1, 2]. При сравнительном анализе ряда данных экспериментальных исследований была выявлена следующая закономерность (таблица) [3-6]: возникновение изотопного шока (резкое возрастание функциональной активности биологической системы при определенном содержании изотопов в окружающей ее среде) характерно в тех случаях, когда высока вероятность образования связей с нечетным количеством нейтронов больше, чем протонов (нескомпенсированным нейтроном) или при наличии в системе химического элемента (обычно металла), имеющего нескомпенсированный нейтрон/нейтроны [7, 8].

Таблица – Закономерность возникновения изотопного резонанса в биологических объектах путем вероятной реализации нейтронного эффекта

Изотопный резонанс отсутствует	Изотопный резонанс наблюдается	Изотопный резонанс отсутствует
¹³ C- ¹ H [6]: 7n-7p = 0 Спин: ½ ⁻ + ½ ⁺ = 1 ⁻⁺	¹³ C-D [3]: 8n-7p = 1 Спин: ½ ⁻ + 1 ⁺ = 1½ ⁻⁺	
¹² C- ¹⁶ O: 14n-14p = 0 Спин: 0 ⁺ + 0 ⁺ = 0 ⁺⁺	¹² C- ¹⁷ O: 15n-14p = 1 Спин: 0 ⁺ + 5/2 ⁺ = 5/2 ⁺⁺	¹² C- ¹⁸ O: 16n-14p = 2 Спин: 0 ⁺ + 0 ⁺ = 0 ⁺⁺
	¹³ C- ¹⁶ O: 15n-14p = 1 Спин: ½ ⁻ + 0 ⁺ = ½ ⁻⁺	¹³ C- ¹⁷ O: 16n-14p = 2 Спин: ½ ⁻ + 5/2 ⁺ = 3 ⁻⁺
¹⁶ O-D: 9n-9p = 0 Спин: 0 ⁺ + 1 ⁺ = 1 ⁺⁺	¹⁷ O-D: 10n-9p = 1 Спин: 5/2 ⁺ + 1 ⁺ = 3½ ⁺⁺	¹⁸ O-D: 11n-9p = 2 Спин: 0 ⁺ + 1 ⁺ = 1 ⁺⁺
¹⁵ N- ¹ H [37]: 8n-8p = 0 Спин: ½ ⁻ + ½ ⁺ = 1 ⁻⁺	¹⁵ N-D: 9n-8p = 1 Спин: ½ ⁻ + 1 ⁺ = 1½ ⁻⁺	
		⁶⁶ Zn ^[43] : 36n-30p = 6 Спин: 0 ⁺
²⁴ Mg ^[4, 5] : 12n-12p = 0 Спин: 0 ⁺	²⁵ Mg ^[4, 5] : 13n-12p = 1 Спин: 5/2 ⁺	²⁶ Mg ^[4, 5] : 14n-12p = 2 Спин: 0 ⁺
⁴⁰ Ca ^[11] : 20n-20p = 0 Спин: 0 ⁺		

Цель работы. Объяснение физических механизмов реализации нейтронного эффекта.

При изучении вероятности возникновения данной закономерности, называемой далее нейтронным эффектом [2], было установлено, что возможным механизмом его реализации может являться изменение спина ядер атомов в зависимости от количества

нейтронов. Это, в свою очередь, способно влиять и на реакционную способность химической связи, образуемой изотопами, имеющими суммарную нескомпенсированность по нейтронам.

Объяснение подобного феномена с нескомпенсированным нейтроном может быть связано с изменением физических параметров следующих явлений: взаимодействия магнитных моментов валентных электронов с магнитными моментами атомных ядер; взаимодействия магнитных моментов атомных ядер, приводящих к изменению расстояния между ними; влияние размера ядра на энергию валентного электрона, в том числе вследствие изменения расстояния между атомами. Принципиально объяснить механизм возникновения нейтронного эффекта можно нарушением баланса по массе в системах с равновесным зарядом.

Равновесное положение электрона определяет химическую активность соединения, которую можно оценить, вычислив энергию взаимодействия электрона с атомными остовами. Активность валентной связи определяется не только взаимным расположением атомов 1 и 2, но и взаимодействием атомных остовов с парой валентных электронов. Чем ниже энергия, тем менее активна химическая связь, поэтому для активации ковалентной химической связи требуется большая внешняя энергия. На расстояние между атомами и энергию химической связи влияет несколько факторов [8]:

1. Кулоновское взаимодействие валентных электронов слабо зависит от изотопного состава химических элементов.

2. Взаимодействие магнитных моментов валентных электронов также незначительно зависит от изотопного состава соединения.

3. Взаимодействие магнитных моментов валентных электронов с магнитными моментами ядер атомов в большей степени определяется изотопным составом, поскольку для разных изотопов одного и того же химического элемента магнитные моменты ядер атомов могут отличаться весьма значительно. Магнитный момент ядра атома связан с его спином гиромагнитным отношением, поэтому магнитные моменты ядер атомов пропорциональны их спинам.

4. Взаимодействие магнитных моментов ядер атомов, приводящее к изменению расстояния между ними.

5. Эффект влияния размеров ядра на энергию валентного электрона. У разных изотопов одного и того же химического элемента разное количество нейтронов, т.е. разный размер ядра атома, что приводит к искажению кулоновского потенциала ядер атомов и как следствие к изменению энергии электрона.

6. Еще один эффект, вызывающий изменение расстояния между атомами – их тепловые колебания. Предполагаем, что колебания происходят вблизи положения равновесия по гармоническому закону с частотой ω , определяемой параметрами потенциальной ямы, в которой находятся атомы, т.е. в конечном счете параметрами межатомных взаимодействий. Следовательно, амплитуда тепловых колебаний атомов будет зависеть только от их массы и температуры.

Для описания влияния изотопного состава молекул на живые системы [9-13] нами выдвигается гипотеза, что стимулирующее либо подавляющее их влияние связано с деформацией химической связи, вызванное изменением изотопного состава и связанному с этой деформацией изменению энергии соответствующей валентной связи. Изменение энергии химической связи обусловлено несколькими факторами. Рассмотрим два атома, связанные ковалентной связью, расположенные на равновесном расстоянии a [14]. Локализованное состояние электрона в атомах имеет волновые функции с экспоненциальной асимптотикой в виде затухающей экспоненты. Следовательно, в месте расположения электронов, потенциал, создаваемый атомными остовами, расположенными на концах связи, можно представить в виде суперпозиции ку-

лоновских потенциалов атомных остовов, т.е., ядер и сферически симметричных заполненных внутренних электронных оболочек, и экспоненциально спадающих потенциалов, обусловленных асимптотиками волновых функций внешних электронов:

$$V(r) = \frac{Ze^2}{r} + e^2 \frac{\exp(-kr)}{r}, \quad (1)$$

где Z – эффективный заряд атомного остова, e – энергия электрона, r – расстояние от электрона до ядра, k – величина, обратная радиусу атома. В месте локализации валентных электронов в вышеприведенной формуле можно пренебречь вторым слагаемым, и считать, что первый атом создает в месте расположения валентных электронов потенциал $V_1(r) = \frac{Z_1e^2}{r}$, а второй атом создает в месте расположения валентных электронов потенциал $V_2(r) = \frac{Z_2e^2}{a-r}$. Следовательно, потенциал в месте расположения валентных электронов можно выбрать в виде

$$U(r) = \frac{Z_1e^2}{r} + \frac{Z_2e^2}{a-r}, \quad 0 \leq r \leq a, \quad (2)$$

Мы считаем, что такая замена вполне допустима, поскольку потенциал (1) является эмпирическим. В вышеприведенных формулах Z_1, Z_2 – безразмерные константы, имеющие смысл зарядов атомных остовов в единицах, заряда электрона e . $r, a-r$ – расстояния от валентного электрона до первого и второго атомных остовов. Обычно используемый для расчета межатомных взаимодействий потенциал Леннарда-Джонса сильно их усложняет, именно поэтому нами выбран потенциал (2).

В тоже время, для более углубленного понимания механизмов фракционирования стабильных изотопов необходимо изучить принцип обменного взаимодействия между частицами с целым спином (бозонами) и полуцелым спином (фермионами). Так, мы считаем, что при наличии в системе из двух ядер (для атомов металлов может быть одно ядро) нейтронов больше, чем протонов усиливается обменное взаимодействие за счет фермионов (в протонах и опосредованно в электронах), а взаимодействие бозонов ослабевает, тогда как в атомах, где количество протонов и нейтронов одинаковое, или преобладают протоны над нейтронами, наблюдается обменное взаимодействие за счет бозонов, а фермионное взаимодействие ослабляется. Авторы считают, что в данной работе все результаты являются новыми.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект №19-44-230026 и проект №20-34-90014, а также при финансовой поддержке государственного задания ЮНЦ РАН (№АААА-А19-119040390083-6).

Цитируемая литература.

- Galimov E.M. Life is a product of molecular ordering “machine” // *Geochem. Int.* 2014. V. 52. P. 1190–1196. <https://doi.org/10.1134/S0016702914130059>
- Zubarev R.A., Artemenko K.A., Zubarev A.R. et al. Early life relict feature in peptide mass distribution // *Cent. Eur. J. Biol.* 2010. V. 5. Is. 2. 2010. P. 190–196. doi:10.2478/s11535-009-0069-2
- Li X., Snyder M.P. Yeast longevity promoted by reversing aging-associated decline in heavy isotope content // *NPJ Aging Mech Dis.* 2016. V. 2. P. 16004. doi:10.1038/npjamd.2016.4
- Koltover V.K., Labyntseva R.D., Kosterin S.O. et al. Magnetic isotope of magnesium accelerates ATP hydrolysis catalyzed by myosin // *Biophysics.* 2016. V. 61. Is. 2. P. 200–206.

5. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A. Efficiency of ATP Synthase as a Molecular Machine // *Biophysics*. 2008. V. 53. № 3. P. 219–222.
6. Xie X., Zubarev R.A. Isotopic resonance hypothesis: experimental verification by *Escherichia coli* growth measurements // *Scientific reports*. 2015. V. 5. P. 9215. doi: 10.1038/srep09215.
7. Basov A., Fedulova L., Vasilevskaya E., Dzhimak S. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes // *Molecules*. 2019. Vol. 24. Is. 22. P. 4101. doi:10.3390/molecules242241016.
8. Елкина А.А., Тумаев Е.Н., Басов А.А., и др. Механизмы взаимодействия стабильных изотопов с биологическими объектами с учетом нескомпенсированного нейтрона в химических связях // *Биофизика*. 2020. Т. 65. № 5. С. 1034–1040. doi: 10.31857/S0006302920050221
9. Schmidt H.-L., Robins R.J., Werner R.A. Multi-factorial in vivo stable isotope fractionation: causes, correlations, consequences and applications // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 2015. V. 51. Is. 1. P. 155–199.
10. Zhang X., Gaetani M., Chernobrovkin A., Zubarev R.A. Anticancer effect of deuterium depleted water - Redox disbalance leads to oxidative stress // *Molecular and Cellular Proteomics*. 2019. V. 18. Is. 12. P. 2373–2387.
11. Zlatskiy I., Pleteneva T., Skripnikov A., et al. Dependence of Biocatalysis on D/H Ratio: Possible Fundamental Differences for High-Level Biological Taxons // *Molecules*. 2020. V. 25. P. 4173.
12. Letuta U.G., Shailina D.M. Magnetosensitivity of *E. coli* bacteria in the presence of zinc isotopes // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2018. V. 479. № 1. P. 111–113.
13. Basov A., Drobotenko M., Svidlov A., et al. Inequality in the frequency of the open states occurrence depends on single $^2\text{H}/^1\text{H}$ replacement in DNA // *Molecules*. 2020. V. 25. Is. 16. P. 3753. doi: 10.3390/molecules25163753
14. Джимак С.С., Копытов Г.Ф., Елкина А.А., и др. Влияние на энергию ковалентной связи изотопного состава формирующих ее ядер // *Известия вузов. Физика*. 2020. № 11.

Сведения об авторах

Степан Сергеевич Джимак

к.б.н., в.н.с.

КубГУ

Краснодар, Россия

ЮНЦ РАН

Ростов-на-Дону, Россия

Эл. почта: jimack@mail.ru

Анна Анатольевна Елкина

научный сотрудник

КубГМУ

Краснодар, Россия,

ЮНЦ РАН

Ростов-на-Дону, Россия

Эл. почта: 013194@mail.ru

Александр Александрович Басов

д.м.н., с.н.с.

КубГУ

Краснодар, Россия

КубГМУ

Краснодар, Россия

Эл. почта: son_sunytch79@mail.ru

Information about authors

Stepan S. Dzhimak

PhD

Kuban State University

Krasnodar, Russia

SSC RAS

Rostov-on-Don, Russia

E-mail: jimack@mail.ru

Anna A. Elkina

Researcher

Kuban State University

Krasnodar, Russia

SSC RAS

Rostov-on-Don, Russia

E-mail: 013194@mail.ru

Alexandr A. Basov

MD

Kuban State University

Krasnodar, Russia

Kuban State Medical University

Krasnodar, Russia

E-mail: son_sunytch79@mail.ru

УДК 577.344:611.441
ГРНТИ 34.39.39
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.18

Е.П. Тимохина, Н.В. Яглова,
С.С. Обернихин, В.В. Яглов
ФГБНУ НИИ морфологии человека

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ СНИЖЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ

Исследовали динамику морфологических изменений щитовидной железы мышей, потребляющих воду с пониженным содержанием дейтерия. Выявлены структурные изменения в паренхиме органа, свидетельствующие об активации секреторной деятельности, а затем о значительном ее снижении. Эти изменения указывают на чувствительность клеток щитовидной железы к изменению баланса стабильных изотопов водорода в организме.

Ключевые слова: *эндокринная система, изотопы водорода, дейтерий, протий, щитовидная железа.*

E.P. Timokhina, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov
FSBI Research Institute of Human Morphology

DYNAMIC MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE THYROID GLAND ASSOCIATED WITH DEPLETION OF DEUTERIUM BODY CONTENT

Dynamics of morphological changes in the thyroid gland of mice, consuming water with lower deuterium content, was studied. Primary changes in structure were indicative of more active hormone secretion. Later morphological signs of inhibited hormone secretion were found. The findings demonstrate sensitivity of thyroid cells to shifts in deuterium body content.

Keywords: *endocrine system, hydrogen isotopes, deuterium, protium, thyroid gland.*

Введение

Исследование влияния различных концентраций стабильных изотопов водорода в воде на живые организмы – активно развивающееся направление в науке. Известно, что с питьевой водой организм получает различные концентрации двух основных стабильных изотопов водорода – протия и дейтерия. При этом дейтерий образует более сильные химические связи с другими биогенными атомами, чем протий. Это, в свою очередь, обуславливает более низкую скорость химических реакций и большую устойчивость биополимеров, в первую очередь белков, к денатурации и распаду [1, С. 85-116]. Известно, что потребление воды с изменённым содержанием изотопов водорода приводит к более выраженным изменениям их концентрации в плазме, чем во внутренних органах [2, С. 245-248]. В научной литературе имеются единичные публикации по влиянию изменения содержания в организме дейтерия на функции эндокринной системы и контролируемые ими метаболические процессы [3, С. 1-7; 4, С.23]. При этом исследование функции щитовидной железы в норме и при развитии патологических процессов в условиях изменения содержания в организме стабильных изотопов водорода ранее не проводилось.

Цель исследования – изучение морфологических изменений щитовидной железы мышей при различных сроках потребления воды с пониженным содержанием дейтерия.

Материалы и методы

Исследование выполнено на самцах мышей линии С57В1/6, полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (филиал «Столбовая»). Экспериментальную группу составляли животные, которые вместо водопроводной воды потребляли воду

с пониженным содержанием дейтерия (10ppm). Содержание дейтерия в воде определяли с помощью спектрального жидкостного изотопного анализатора T-LWIA-45-EP («Los Gatos Research», США). Контрольную группу составляли животные, потреблявшие дистиллированную воду. Животных выводили из эксперимента через 2 и 4 недели передозировкой золетила. Доли щитовидной железы фиксировали в растворе Буэна и после гистологической проводки заливали в парафин. Изготавливали срезы, которые после депарафинизации окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили гистологическое и морфометрическое исследование препаратов с помощью световой микроскопии и компьютерной морфометрии с использованием программы «Image Scope» и светового микроскопа «Leica DM2500» («Leica Microsystems», Германия). Определяли размеры фолликулов, количество фолликулов в 1мм² площади среза железы и высоту фолликулярных тироцитов. Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

У мышей контрольной группы щитовидная железа имела типичное строение. Паренхима была представлена группами различных по размеру фолликулов овальной и реже круглой формы. Более крупные фолликулы локализовались в периферических зонах. Фолликулы были заполнены плотным коллоидом. Фолликулярный эпителий был, в основном, кубической формы. Ядра имели округлую форму. Цитоплазма характеризовалась умеренной базофилией. Отмечены активные процессы десквамации эпителия железы в полость фолликулов. Стромальный компонент был слабо развит.

Через 2 недели после начала эксперимента у мышей, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, были выявлены морфологические изменения щитовидной железы. Отмечалось уменьшение размеров фолликулов (рис. 1а), а также их число в единице площади среза железы (рис. 1б). Фолликулы имели овальную и круглую форму. Более крупные фолликулы, как и в контроле, локализовались в периферических зонах. В центральных зонах долей отмечалось появление резорбционных вакуолей в коллоиде. Также было отмечено увеличение высоты фолликулярного эпителия (рис. 2). В цитоплазме эпителиальных клеток встречались включения коллоидных капель крупного размера.

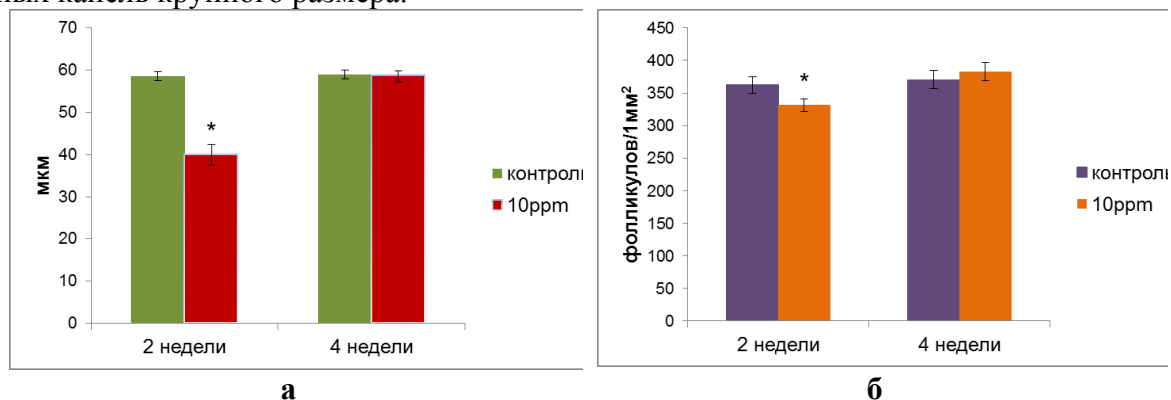


Рис. 1. Диаметр фолликулов (а) и число фолликулов в единице площади среза щитовидной железы (б) контрольной и опытной групп через 2 и 4 недели после начала эксперимента, мкм ($M \pm m$).

Примечания: * – статистически значимые отличия от значений контрольной группы.

Через 4 недели после начала эксперимента у мышей, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, отмечены изменения в строении паренхимы щитовидной железы. размеры фолликулов не отличались от таковых в контрольной группе, но они утратили округлую форму и приобрели вытянутую форму, нередко с заостренными краями. Отмечалось уплощение фолликулярного эпителия (рис. 2). Наряду с

клетками со слабо и умеренно базофильной цитоплазмой в фолликулах встречались клетки с резко оксифильной цитоплазмой. Часто встречались гиперхромные ядра. Коллоид в полости фолликулов был компактным с ровным краем. Резорбционные вакуоли встречались редко.

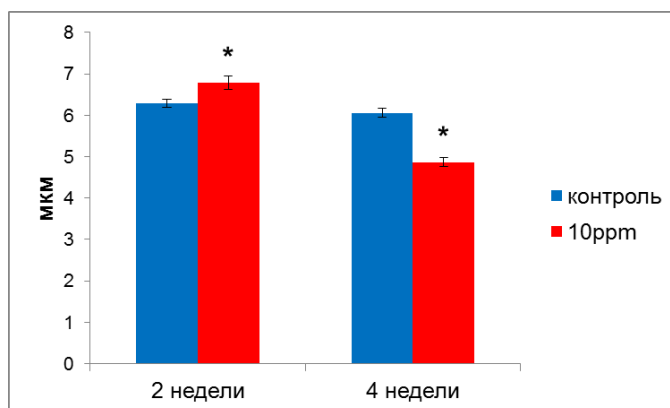


Рис. 2. Высота клеток фолликулярного эпителия контрольной и опытной групп через 2 и 4 недели после начала эксперимента, мкм ($M \pm m$).

Примечания: * – статистически значимые отличия от значений контрольной группы.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что потребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводило к морфологическим изменениям щитовидной железы у мышей. Через 2 недели, отмечалось усиление процессов резорбции тироглобулина из полости фолликулов. По данным нашего исследования скорость резорбции тироглобулина не только превышала скорость его выделения в полость фолликулов, но и скорость расщепления лизосомами, о чем свидетельствуют признаки неэффективной резорбции [5, С.215-219]. Усиление резорбции – это ТТГ-зависимый процесс, свидетельствующий о необходимости усиления продукции тиреоидных гормонов [6, С.24-32]. Через 4 недели интенсивность резорбтивных процессов снижалась, а в последующем появились признаки, указывающие на снижение не только резорбции, но и синтеза тироглобулина, то есть значительного снижения функциональной активности щитовидной железы.

Выводы

Потребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводит к морфологическим изменениям в паренхиме щитовидной железы, свидетельствующим об активации ее секреторной деятельности на малом сроке воздействия, а затем к ее снижению на более длительном сроке воздействия.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: снижение поступления дейтерия в организм вызывает структурные перестройки в щитовидной железе, свидетельствующие о неоднородности изменений функциональной активности органа и его чувствительности к изменению концентрации дейтерия в организме.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №0-015-00236 А.

Цитируемая литература:

1. Jancso G. Isotope effects. In: Handbook of nuclear chemistry, Eds A.Vértes, S.Nagy, Z. Klencsar. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers, 2013. P. 85-116.

2. Джимаков С.С., Басов А.А., Барышев М.Г. Распределение дейтерия в биологических жидкостях и внутренних органах: влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на градиент D/H и процессы адаптации. Доклады АН. 2015. Т. 465, № 2. С. 245-248.

3. 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. Vol. 2. No 1. P. 1-7.

4. Halenova T., Zlatskiy I., Syroeshkin A., Maximova T., Pleteneva T. Deuterium-depleted water as adjuvant therapeutic agent for treatment of diet-induced obesity in rats. Molecules. 2019. Vol. 25. No. 1. P.23.

5. Яглова Н.В. Нарушения секреторного цикла фолликулярных тироцитов и их коррекция тиреотропным гормоном при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т.152. №8. С.215-219.

6. Яглова Н.В. Синдром нетиреоидных заболеваний при остром бактериальном эндотоксикозе. Вестник Российской академии медицинских наук. 2013. Т.68. №3. С.24-32.

Сведения об авторах

Екатерина Петровна Тимохина

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

Эл. почта: rodich-k@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы

Эл. почта: ober@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Валентин Васильевич Яглов

д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

ФГБНУ НИИ морфологии человека

Москва, Россия

Information about authors

Ekaterina Petrovna Timokhina

0PhD, Research worker of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: rodich-k@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Nataliya Valentinovna Yaglova

D.Med.Sc., Head of Endocrine System Development Laboratory

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obernikhin

D.Med.Sc., Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: ober@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Valentin Vasilyevich Yaglov

D.Med.Sc., Professor, Principal Research Worker of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: vyaglov@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

ПРОТЕКТИВНЫЙ ФРАГМЕНТ RAGE ИНГИБИРУЕТ ОЛИГОМЕРИЗАЦИЮ БЕТА-АМИЛОИДА

В статье обсуждается участие бета-амилоида в механизме защитного действия синтетического фрагмента RAGE. Показано, что пептид способен подавлять образование олигомеров и фибрилл бета-амилоида в растворе. Это подтверждает гипотезу, что протективная активность пептида связана с его способностью ингибировать процесс олигомеризации бета-амилоида.

Ключевые слова: рецептор конечных продуктов гликирования, синтетические пептиды, болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, мономеры, олигомеры, фибриллы.

T.D. Volkova¹, A.V. Avetisyan², D.O. Koroev¹, O.M. Volpina¹

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS

²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University

PROTECTIVE RAGE FRAGMENT INHIBITS AMYLOID BETA OLIGOMERIZATION

The article discusses the involvement of beta-amyloid in the mechanism of the protective action of the synthetic RAGE fragment. It was shown that the peptide is able to suppress the formation of oligomers and fibrils of beta-amyloid in solution. This confirms the hypothesis that the protective activity of the peptide is associated with its ability to inhibit the process of oligomerization of beta-amyloid.

Keywords: receptor for advanced glycation end products, synthetic peptides, Alzheimer's disease, amyloid beta, monomers, oligomers, fibrils

Введение

Бета-амилоид (A β) играет центральную роль в патогенезе болезни Альцгеймера. В мозге он подвергается олигомеризации, образуя токсичные олигомеры и бета-складчатые фибриллы, откладывающиеся в бляшках [1-4]. A β является лигандом рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE) и с его помощью проникает и накапливается в мозге. Активация этого рецептора бета-амилоидом на поверхности микроглии инициирует внутриклеточный каскад, который приводит к воспалению, оксидативному стрессу и дегенерации нейронов [5-10]. Ранее нами был получен синтетический фрагмент последовательности (60-76) внеклеточного домена RAGE, который оказывает терапевтическое действие в животной и клеточной моделях болезни Альцгеймера [11-14], однако механизм его действия пока не известен. Было высказано предположение, что протективное действие пептида реализуется через взаимодействие с A β путем ингибирования образования токсичных олигомеров. Проверка данного предположения и выяснение механизма защитного действия пептида актуальны для разработки подходов к терапии болезни Альцгеймера.

Цель работы

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы изучить физико-химическими методами способность пептида (60-76), обладающего протективной активностью, влиять на процесс олигомеризации бета-амилоид 1-40 (A β 40) в растворе. Для сравнения использовали укороченный пептид (65-76), не проявлявший активности в животной модели болезни Альцгеймера.

Материалы и методы

Фрагменты RAGE человека (Q15109 UniProtKB/SwissProt) и A β 40 человека (P05067.3, UniProtKB/Swiss-Prot) были синтезированы твердофазным методом на

полимере Ванга с использованием Fmoc/Buoc-схемы. Гомогенность пептидов составляла >95%.

Синтетический A β 40 после лиофилизации дезагрегировали путем растворения в гексафторизопропанол, затем растворитель упаривали и добавляли ДМСО.

Для формирования олигомеров и фибрилл к дезагрегированному A β 40 добавляли буфер (20mM Tris-Cl, 100mM NaCl, pH 7.4) и инкубировали 40 ч при 37°C.

Динамику формирования фибрилл определяли по реакции с тиофлавином Т с помощью ридера Clariostar Plus, BMG LABTECH.

Размеры агрегатов в растворе определяли методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK). Размер агрегатов определен как диаметр сферической частицы, имеющей одинаковый с агрегатом коэффициент диффузии. Результаты представлены в виде гидродинамического диаметра частиц (d_h).

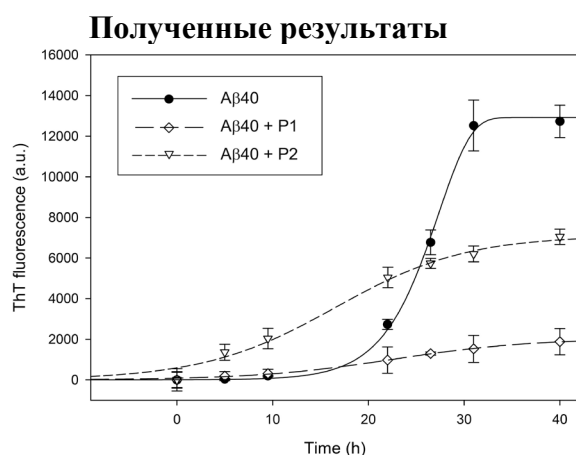


Рис. 1. Динамика формирования фибрилл A β 40

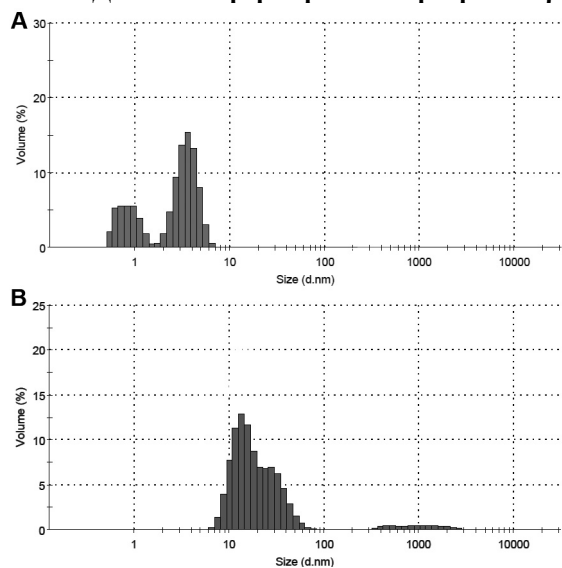


Рис. 2. Анализ размера частиц A β 40 в растворе методом DLS: А – дезагрегированный A β 40; В – раствор A β 40 без предварительной дезагрегации.

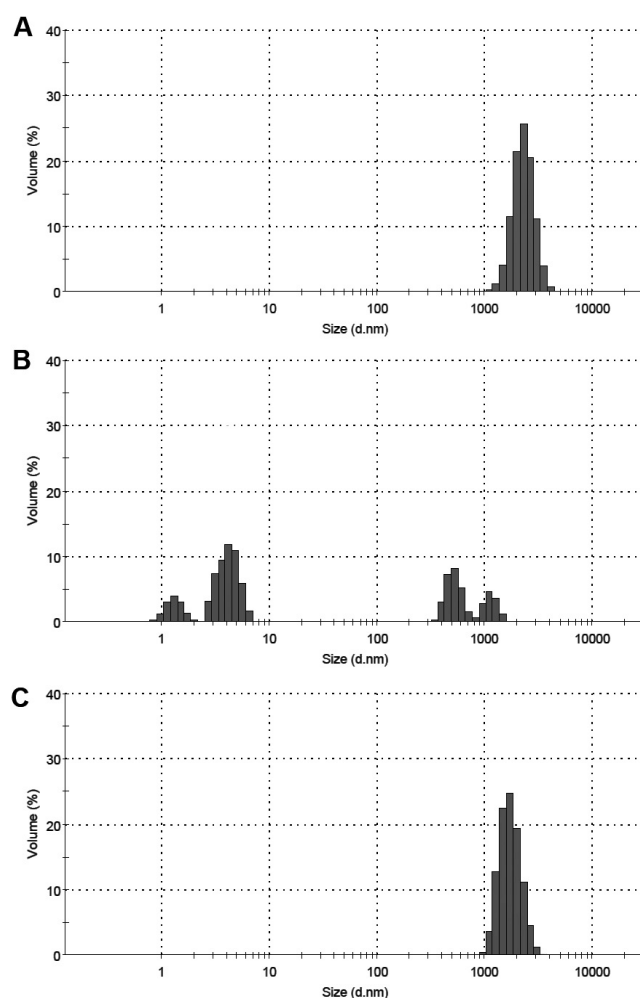


Рис. 3. Анализ размера частиц A β 40 в растворе после 20 ч инкубации методом DLS: А – чистый A β 40; В – A β 40 в смеси с P1; С - A β 40 в смеси с P2

Исследовали способность пептидов ингибировать образование протофибрилл и фибрилл A β 40 в растворе по реакции с тиофлавином Т. Показано, что пептид (60-76) (P1), обладающий протективной активностью в животной и клеточной моделях болезни Альцгеймера, ингибировал процесс формирования фибрилл A β 40 более чем на 90%.

Действие укороченного фрагмента (65-76) (P2), не способного защищать животных, было гораздо меньше. Пептид P2 только на 50% ингибировал процесс фибриллизации A β 40 (рис. 1).

Влияние пептидов на олигомеризацию A β 40 было также изучено методом динамического рассеяния света (DLS). Показано, что в растворе исходного дезагрегированного A β 40 присутствуют мономеры, а также димеры, тримеры и тетрамеры [15] (рис. 2A).

В результате агрегации A β 40 все находившиеся в растворе молекулы превратились в очень крупные олигомеры (около 2500 нм) (рис. 2A). В присутствии пептида P1 не происходило активного превращения всего набора молекул A β 40 в высокомолекулярные олигомеры. В смеси оставались мономеры, димеры, тримеры и тетрамеры A β 40 (рис. 2B), а также в небольших количествах появлялись олигомеры, средний диаметр которых 500 нм и 1000 нм. По данным DLS в результате инкубации A β 40 в присутствии пептида P2 формировался единственный пул высокомолекулярных олигомеров со средним размером 1500 нм.

Необходимо отметить, что методом ThT флуоресценции выявляются только β -структуры фибрилл, а метод DLS показывает весь спектр олигомеров, поэтому именно методом DLS выявляется принципиальная разница способности пептидов P1 и P2 ингибировать процесс олигомеризации бета-амилоида.

Было выдвинуто предположение, что разная способность пептидов P1 и P2 ингибировать олигомеризацию A β 40 обусловлена их разной способностью связываться с A β 40. При помощи флуоресцентного титрования было показано, что оба пептида образуют стабильные комплексы с A β 40 ($K_d=0.54$ для пептида P2 и 1.4 для пептида P1). Очевидно, что методом флуоресцентного титрования невозможно объяснить разную способность пептидов ингибировать олигомеризацию бета-амилоида.

Результаты, полученные в настоящей работе, объединены в табл. 1.

Таб. 1. Результаты изучения способности RAGE пептидов ингибировать олигомеризацию A β 40 и их активность на мышинной модели БА

Обозначение	Фрагмент	А. к. последовательность	Ингибирование олигомеризации и A β 40		Связывание с A β 40 (флуоресцентное титрование)	Защита памяти БЭ мышей [13]
			DLS	ThT		
P1	60-76	AWKVLSPQGGPWDSVA	+	+	+	+
P2	65-76	SPQGGPWDSVA	-	±	+	-

В последнем столбце добавлены ранее полученные данные тестирования пространственной памяти ольфакторно бульбэктомированных (БЭ) мышей после интраназального введения пептидов P1 или P2 [12], где было продемонстрировано, что введение пептида P1 приводит к сохранению пространственной памяти животных, а введение пептида P2 не приводит.

Выводы

Показано, что пептид P1 значительно ингибирует процесс олигомеризации A β 40 в растворе, а пептид P2 практически не способен это делать. Таким образом, в настоящей работе было получено подтверждение гипотезы о том, что протективная активность пептида, соответствующего фрагменту (60-76) последовательности RAGE, связана с его способностью ингибировать процесс олигомеризации бета-амилоида.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: только пептид P1, способный ингибировать процесс олигомеризации бета-амилоида, что было показано двумя методами – с помощью ThT и DLS методом, - обладает протективной активностью. При этом способность ингибировать олигомеризацию бета-амилоида не коррелирует со способностью пептидов связываться с низкомолекулярным A β 40.

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 19-04-00624.

Цитируемая литература

1. *Hardy J.A., Higgins G.A.* Alzheimers-Disease - the Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*. 1992. Vol. 256. No. 5054. P. 184-185.
2. *Selkoe D.J.* Alzheimers-Disease - a Central Role for Amyloid. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1994. Vol. 53. No. 5. P. 438-447.
3. *Gandy S., Simon A.J., Steele J.W., et al.* Days to Criterion as an Indicator of Toxicity Associated with Human Alzheimer Amyloid-beta Oligomers. *Annals of Neurology*. 2010. Vol. 68. No. 2. P. 220-230.
4. *Kayed R., Lasagna-Reeves C.A.* Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity. *Alzheimer's Disease: Advances for a New Century*. 2013. P. 367-78.
5. *Banks W.A.* Immunotherapy and neuroimmunology in Alzheimer's disease: a perspective from the blood-brain barrier. *Immunotherapy*. 2010. Vol. 2. No. 1. P. 1-3.
6. *Lue L.F., Walker D.G., Brachova L., et al.* Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: Identification of a cellular activation mechanism. *Experimental Neurology*. 2001. Vol. 171. No. 1. P. 29-45.
7. *Cai Z.Y., Liu N.N., Wang C.L., et al.* Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2016. Vol. 36. No. 4. P. 483-495.
8. *Pugazhenth S., Qin L.M., Reddy P.H.* Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2017. Vol. 1863. No. 5. P. 1037-1045.
9. *Fang F., Lue L.F., Yan S.Q., et al.* RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, A beta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Faseb Journal*. 2010. Vol. 24. No. 4. P. 1043-1055.
10. *Mao Y.X., Cai W.J., Sun X.Y., et al.* RAGE-dependent mitochondria pathway: a novel target of silibinin against apoptosis of osteoblastic cells induced by advanced glycation end products. *Cell Death & Disease*. 2018. P. 9.
11. *Volpina O.M., Koroev D.O., Volkova T.D., Kamynina A.V., Filatova M.P., Zaporozhskaya Ya.V., Samokhin A.N., Aleksandrova I.Yu., Bobkova N.V.* A fragment of the receptor for advanced glycation end products restores the spatial memory of animals in a model of Alzheimer's disease. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2015. Vol. 41. No. 6. P. 638-644.
12. *Koroev D.O., Volpina O.M., Volkova T.D., et al.* A Synthetic Fragment of the Receptor for Glycation End Products and Its Analogue Improve Memory in Transgenic Alzheimer's Disease Mouse Model. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2019. Vol. 45. No. 5. P. 361-365.
13. *Volpina O.M., Samokhin A.N., Koroev D.O., et al.* Synthetic Fragment of Receptor for Advanced Glycation End Products Prevents Memory Loss and Protects Brain Neurons in Olfactory Bulbectomized Mice. *Journal of Alzheimers Disease*. 2018. Vol. 61. No. 3. P. 1061-1076.
14. *Kamynina A.V., Esteras N., Koroev D.O., et al.* Synthetic Fragments of Receptor for Advanced Glycation End Products Bind Beta-Amyloid 1-40 and Protect Primary Brain Cells

From Beta-Amyloid Toxicity. *Frontiers in Neuroscience*. 2018. No. 12.

15. *Bitan G., Kirkitadze M.D., Lomakin A., et al.* Amyloid beta-protein (A beta) assembly: A beta 40 and A beta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. Vol. 100. No. 1. P. 330-335.

Сведения об авторах

Татьяна Даниловна Волкова

к.х.н., с.н.с.

Институт биоорганической химии им. академиков

М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Москва, Россия

Эл. почта: tdvol@mx.ibch.ru

Армине Врезовна Аветисян

к.б.н., н.с.

НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ им. М.В.

Ломоносова

Москва, Россия

Эл. почта: avetis@belozersky.msu.ru

Дмитрий Отарович Короев

к.х.н., с.н.с.

Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Москва, Россия

Эл. почта: korojev@mx.ibch.ru

Ольга Марковна Вольпина

д.х.н., г.н.с.

Институт биоорганической химии им. академиков

М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Москва, Россия

Эл. почта: volpina@ibch.ru

Information about authors

Tatiana Danilovna Volkova

Ph.D., Ph.D.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic

Chemistry RAS

Moscow, Russia

E-Mail: tdvol@mx.ibch.ru

Armine Vrezovna Avetisyan

Ph.D., Ph.D.,

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,

Lomonosov Moscow State University

Moscow, Russia

E-Mail: avetis@belozersky.msu.ru

Dmitry Otarovich Korojev

Ph.D., Ph.D.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic

Chemistry RAS

Moscow, Russia

E-Mail: korojev@mx.ibch.ru

Olga Volpina

Ph.D., Ph.D.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic

Chemistry RAS

Moscow, Russia

E-Mail: volpina@ibch.ru

УДК 577.112.6

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.20

**О.М. Вольпина¹, Д.О. Короев¹, Т.Д. Волкова¹,
А.В. Камынина, М.В. Серебрякова³, Н.В. Бобкова⁴**

¹Институт биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

²Московский физико-технический институт

³НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского
МГУ

⁴Институт биофизики клетки РАН, 142290,

УСТОЙЧИВОСТЬ К ПРОТЕОЛИЗУ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФРАГМЕНТОВ RAGE

В статье показана корреляция между устойчивостью к протеолизу фрагмента (60-76) рецептора конечных продуктов гликозилирования (RAGE) и его защищенного аналога, составом образующихся продуктов и проявляемой биологической активностью. Сделан вывод о том, что защищенный фрагмент RAGE является перспективным для разработки на его основе средств терапии болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, рецептор конечных продуктов гликозилирования, синтетические пептиды, животные модели

О.М. Volpina¹, D.O. Koroev¹, T.D. Volkova¹,A.V. Kamynina², M.V. Serebryakova³, N.V. Bobkova⁴¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS²Moscow Institute of Physics and Technology³Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,⁴Institute of Cell Biophysics (RAS),

RESISTANCE TO PROTEOLISYS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF RAGE FRAGMENTS

It was shown the correlation between the resistance to proteolysis of (60-76) RAGE fragment and its protected analogue, formation of their fragments and revealed biological activity. We assumed that protected RAGE fragment is a promising for development of anti-AD therapy.

Keywords: *Alzheimer's disease, receptor for advanced glycation end products, synthetic peptides, animal models*

Введение

Рецептор конечных продуктов гликозилирования (RAGE) представляет собой мультифункциональный мембранный белок [1, 2]. RAGE участвует в связывании множества лигандов, включая белки конечных продуктов гликозилирования (AGE), S100/кальгранулины, бета-амилоид (Аβ) и амфотерин (HMGB1). В норме RAGE присутствует и функционирует в разных тканях организма, однако при многих патологиях, включая болезнь Альцгеймера (БА), отмечается его гиперэкспрессия и повышение его активности в клетках головного мозга [3]. В настоящее время RAGE рассматривается как перспективная молекулярная мишень для разработки средств эффективной терапии БА. Ранее нами был выявлен пептид, соответствующий последовательности (60-76) RAGE, который проявил выраженное защитное действие на состояние пространственной памяти бульбэктомированных (БЭ) мышей [4]. БЭ мыши известны как модель депрессии и, в то же время, используются в качестве модели БА, поскольку у них развиваются основные патологические реакции, наблюдаемые при БА [5, 6], такие как нарушение памяти, дефицит холинергической системы, повышение уровня мозгового бета-амилоида.

Известно, что свободные пептиды в организме подвергаются протеолизу, что приводит к быстрому снижению концентрации пептидов в крови. Одним из подходов к повышению устойчивости пептидов к действию ферментов является защита N- и C-концевых групп молекулы пептида [7, 8]. Такая модификация пептидов может привести повышению их активности за счет увеличения концентрации в организме. В то же время, подобная модификация структуры пептидов может сопровождаться не увеличением, а снижением их активности [8]. Поэтому модификация любого пептида с целью повышения его биологической активности нуждается в проведении детальных исследований.

Цель работы

Основная цель данного исследования заключалась в изучении устойчивости к протеолизу свободного фрагмента RAGE (60-76) и его модифицированного аналога с защищенными N- и C-концевыми функциональными группами с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. Другой целью текущей работы было сравнение способности этих двух соединений в различных дозах защищать пространственную память у БЭ мышей, моделирующих БА. Также целью настоящего исследования является сравнение способности свободного и защищенного пептидов предотвращать нарушение пространственной памяти у трансгенных 5xFAD мышей, моделирующих развитие БА. В заключение, мы сопоставили данные по устойчивости свободного пептида и его модифицированного аналога к действию протеаз и особенности их деградации с результатами тестирования памяти, выявленными на БЭ и Tg 5xFAD мышцах.

Материалы и методы

В работе использовали пептидный фрагмент (60-76) RAGE AWKVLSPQGGG-PWDSVA и его защищенный аналог Ас-AWKVLSPQGGGPWDSVA-NH₂. Пептиды получены методами твердофазного синтеза. Для оценки устойчивости к протеолизу пептиды обрабатывали сывороткой крови NMRI мышей. Результаты протеолиза оценивали с помощью (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии. БЭ или трансгенным 5xFAD мышам интраназально вводили раствор пептидов и состояние памяти животных оценивали с использованием водного лабиринта Морриса.

Полученные результаты

Было показано, что протеолиз защищенного пептида происходит медленнее, чем протеолиз свободного пептида. При деградации защищенного пептида образуются укороченные N-концевые фрагменты, обладающие протективной активностью, тогда как при деградации свободного пептида образуются только неактивные фрагменты из центральной части молекулы.

Анализ состояния памяти у БЭ мышей после интраназального введения пептидов в различных дозах показал, что эффективная доза защищенного пептида была в пять раз ниже, чем доза свободного пептида. Также было выявлено, что интраназальное введение свободного пептида и его защищенного аналога в течение 70 дней индуцировало одинаковую защиту пространственной памяти у Tg 5xFAD мышей в водном лабиринте Морриса. Затем Tg мыши в течение 7 дней не получали пептиды и тестирование состояния памяти показало, что мыши, ранее получавшие защищенный пептид, показывают хорошую пространственную память, а мыши, которым ранее вводили свободный пептид (60-76), полностью теряли память. Результаты настоящей работы представлены на рис. Таким образом, снижение эффективной дозы защищенного пептида на БЭ мышах может быть объяснено возрастанием времени деградации этого пептида. В то же время, индуцированная введением этого пептида долговременная защита памяти Tg мышей, сохраняющаяся даже через неделю после прекращения его введения, не может быть объяснена только низкой скоростью деградации. Согласно данным ВЭЖХ через 600 мин. обработки сывороткой не обнаружено следов защищенного пептида, при этом пространственная память Tg животных сохраняется даже через 1 неделю после прекращения введения этого пептида. Только масс-спектрометрические данные продуктов деградации двух пептидов могут объяснить выявленную разницу в проявляемой активности на Tg мышах.

Ас(60-76)NH ₂ Ас-AWKVLSPQGGGPWDSVA-NH ₂		(60-76) AWKVLSPQGGGPWDSVA
120 мин.	← Время 50% деградации →	40 мин.
600 мин.	← Время 100% деградации →	240 мин.
Пептид Ас(60-76)NH ₂ и его N-концевые фрагменты	← фрагменты после 240 мин. деградации →	Фрагменты из центральной части
4 мкг	← Эффективная доза для БЭ мышей →	20 мкг
Да	← Долговремен ная защита Tg 5xFAD мышей →	Нет

Профиль деградации защищенного пептида демонстрирует образование большого числа N-концевых фрагментов пептида, которые, как ранее было показано, проявляют протективную активность [4]. Свободный пептид не только быстрее деградирует, но и не образует каких-либо активных N-концевых фрагментов.

Выводы

Показано, что применение ВЭЖХ и масс-спектрометрии для анализа протеолитических продуктов расщепления двух пептидов позволяет объяснить разницу в проявлении их активности на животных моделях БА. Результаты настоящего исследования дают основания полагать, что защищенный фрагмент RAGE является более перспективным для разработки на его основе средств терапии БА, чем его свободный аналог.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые проведен сравнительный анализ скорости и профилей деградации синтетического фрагмента (60-76) RAGE и его аналога с защищенными N- и C-концевыми группами. Впервые проведено сравнение способности этих двух пептидов защищать пространственную память на двух животных моделях болезни Альцгеймера – бульбэктомизированных мышах и трансгенных 5xFAD мышах. Показана корреляция между скоростью протеолиза двух пептидов, составом образующихся укороченных фрагментов и проявляемой биологической активностью. Сделан вывод о том, что защищенный фрагмент RAGE является перспективным для разработки на его основе средств терапии болезни Альцгеймера.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-015-00064

Цитируемая литература

1. Dattilo B. M., Fritz G., Leclerc E., Kooi C. W., Heizmann C. W., Chazin W. J. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46, № 23. P. 6957-70.
2. Yatime L., Andersen G. R. Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products // *FEBS J*. 2013. Vol. 280, № 24. P. 6556-68.
3. Leclerc E., Sturchler E., Vetter S. W. The S100B/RAGE Axis in Alzheimer's Disease // *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010. Vol. 2010. P. 539581.
4. Volpina O. M., Samokhin A. N., Korojev D. O., Nesterova I. V., Volkova T. D., Medvinskaya N. I., Nekrasov P. V., Tatarnikova O. G., Kamynina A. V., Balasanyants S. M., Voronina T. A., Kulikov A. M., Bobkova N. V. Synthetic Fragment of Receptor for Advanced Glycation End Products Prevents Memory Loss and Protects Brain Neurons in Olfactory Bulbectomized Mice // *J Alzheimers Dis*. 2018. Vol. 61, № 3. P. 1061-1076.
5. Hozumi S., Nakagawasai O., Tan-No K., Nijima F., Yamadera F., Murata A., Arai Y., Yasuhara H., Tadano T. Characteristics of changes in cholinergic function and impairment of learning and memory-related behavior induced by olfactory bulbectomy // *Behavioural Brain Research*. 2003. Vol. 138, № 1. P. 9-15.
6. Kamynina A. V., Volpina O. M., Medvinskaya N. I., Aleksandrova I. J., Volkova T. D., Korojev D. O., Samokhin A. N., Nesterova I. V., Shelukhina I. V., Kryukova E. V., Tsetlin V. I., Ivanov V. T., Bobkova N. V. Vaccination with peptide 173-193 of acetylcholine receptor alpha7-subunit prevents memory loss in olfactory bulbectomized mice // *J Alzheimers Dis*. 2010. Vol. 21, № 1. P. 249-61.
7. Brinckerhoff L. H., Kalashnikov V. V., Thompson L. W., Yamshchikov G. V., Pierce R. A., Galavotti H. S., Engelhard V. H., Slingluff C. L. Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: Implications for peptide vaccines // *International Journal of Cancer*. 1999. Vol. 83, № 3. P. 326-334.

8. Werle M., Bernkop-Schnurch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs // *Amino Acids*. 2006. Vol. 30, № 4. P. 351-367.

Сведения об авторах**Ольга Марковна Вольпина**

д.х.н., проф., зав. Лабораторией
Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
Москва, Россия
Эл. почта: volpina@ibch.ru

Дмитрий Отарович Короев

к.х.н., с.н.с.
Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
Москва, Россия
Эл. почта: koroevd@gmail.com

Татьяна Даниловна Волкова

к.х.н., с.н.с.
Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
Москва, Россия
Эл. почта: tdvolkova@gmail.com

Анна Владимировна Камынина

к.б.н., с.н.с.
Московский физико-технический институт
Москва, Россия
Эл. почта: aneskaminina@mail.ru

Марина Васильевна Серебрякова

к.х.н., в.н.с.
НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Бело-
зерского МГУ
Москва, Россия
Эл. почта: mserebr@mail.ru

Наталья Викторовна Бобкова

к.б.н., зав. Лабораторией
ФГБУН Институт биофизики клетки РАН
Пушино, Россия
Эл. почта: nbobkova@mail.ru

Information about authors**Olga Markovna Volpina**

Dr., Prof., Head of the Laboratory
Institute of Bioorganic Chemistry, M. M. Shemyakin
and J. A. Ovchinnikova RAN
Moscow, Russia
E-Mail: volpina@ibch.ru

Dmitry Otarovich Koroiev

Ph.D., Ph.D.
Institute of Bioorganic Chemistry by M. M.
Shemyakin and Yuri A. Ovchinnikova RAN
Moscow, Russia
E-Mail: koroevd@gmail.com

Tatiana Danilovna Volkova

Ph.D., Ph.D.
Institute of Bioorganic Chemistry by M. M.
Shemyakin and Yuri A. Ovchinnikova RAN
Moscow, Russia
E-Mail: tdvolkova@gmail.com

Anna Vladimirovna Kamynina

Ph.D., Ph.D.
Moscow Institute of Physics and Technology
Moscow, Russia
E-Mail: aneskaminina@mail.ru

Marina Serebryakova

Ph.D., Ph.D.
Institute of Physics and Chemical Biology named
after A. N. Belozersky
Moscow, Russia
E-Mail: mserebr@mail.ru

Natalia Bobkova

Ph.D., head of the Laboratory
Institute of Cell Biophysics of the RAS
Pushchino, Russia
E-Mail: nbobkova@mail.ru

УДК 616.12.-009.72-085.849.11(045)-
611.018.8
ГРНТИ 34.19.19
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.21

В.П. Реутов¹, Е.Г. Сорокина²
¹ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
²ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Министерства здравоохранения РФ

ОКСИД АЗОТА В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ И В МОЗГЕ В НОРМЕ И ПРИ ГИПОКСИИ/ИШЕМИИ

В обзоре представлены анализ и обобщения данных литературы и результатов собственных исследований относительно механизмов действия оксида азота на кровеносные сосуды и головной мозг в нормальных физиологических условиях, а также при гипоксии/ишемии.

Ключевые слова: аксоны, дендриты, аксоно-дендритные связи, гипоксия/ишемия мозга, принцип цикличности, цикл оксида азота, цикл супероксидного анион-радикала, шипики дендритов

V.P. Reutov¹, E.G. Sorokina²

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS;

²National Medical Center for Children's Health of the Ministry of Health of the RF;

NITRIC OXIDE IN BLOOD VESSELS AND BRAIN IN NORMAL AND IN HYPOXIA / ISCHEMIA

The review presents an analysis and generalization of literature data and the results of our own studies on the mechanisms of action of nitric oxide on blood vessels and the brain under normal physiological conditions, as well as during hypoxia / ischemia.

Keywords: axons, dendrites, axon-dendritic connections, hypoxia / cerebral ischemia, cyclic principle, nitric oxide cycle, superoxide radical anion cycle, dendritic spines

*Памяти заслуженного деятеля науки РФ,
профессора Н.С. Косицына (1934 – 2020)*

Введение

Нобелевский лауреат по физиологии и медицине (1998) Роберт Фэрчготт (1916 – 2009), открывший вместе с Сальвадором Монкада (р. 1944), Луисом Игнарро (р. 1941) и Ферридом Мурадом (р. 1936) механизм расслабления/релаксации сосудов и увеличения их объема при участии оксида азота (NO) стал всемирно известным ученым [1–8]. Увеличение объема сосудов можно наблюдать визуально на макро уровне при функциональной нагрузке, рабочей гиперемии, при воздействии NO, как указывалось выше, и Виагры – ингибитора фосфодиэстеразы cGMP.

Советский/российский ученый Николай Степанович Косицын (1934–2020) обнаружил вместе с коллегами при помощи метода электронной микроскопии явление увеличения объема и улучшения визуализации центрального звена передачи сигнала – синапса – между нейронами при гипоксии/ишемии [9–14]. Это явление связано с *активацией при гипоксии/ишемии цикла оксида азота (NO) и его NO-синтазной и нитритредуктазной компонент* [15–24]. Несмотря на то, что эти работы были выполнены раньше работ американских коллег, и, были обнаружены более сложные детали в механизме действия NO, чем в работах американских исследователей, Н.С. Косицын так и остался «бойцом невидимого научного фронта», словно глубоко законспирированный разведчик [25]. Актуальность работ Н.С. Косицына и его коллег не вызывает ни у кого сомнений. Механизм улучшения визуализации шипиков дендритов, а также аксоно-

дендритных связей и активной зоны синапса, связанные с увеличением объема центрального звена нейротрансмиссии, является одним из составляющих компонентов памяти. Активация этого механизма происходит при обучении (например, реализация механизмов, участвующих в формировании «сверхпроченных» рефлексов после 3000 повторений одного и того же действия), функциональной гипоксии, а также при гипоксии/ишемии. Естественно возникает вопрос: неужели события в центральном звене нейронов мозга, связанные с памятью, обучением и мышлением менее значимы, чем те механизмы, которые работают в стенке сосудов при действии NO и Виагры? Если учесть то обстоятельство, что само явление Н.С. Косицыным было обнаружено ранее, чем это сделали всемирно известные американские Нобелевские лауреаты, а механизмы, лежащие в основе увеличения объема центрального звена нейротрансмиссии, оказались более сложными, чем в кровеносных сосудах, то становится очевидным, что достижением Н.С. Косицына и его коллег, может гордиться не только Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, но и медико-биологическая наука России.

Активация NO-синтазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота при гипоксии/ишемии

В Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР/РАН (ИВНД и НФ АН СССР/РАН) впервые была сформулирована и обоснована концепция *цикла оксида азота* [15–19]. Установлено, что цикл оксида азота может активироваться при гипоксии/ишемии [15–20]. Дальнейшее развитие этой концепции привело к формулировке и обоснованию концепции *цикла супероксидного анион-радикала* [17]. Согласно развиваемым представлениям *циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала* являются следствием наличия универсального *принципа цикличности* [18, 19]. *Цикл NO может активироваться как вместе с NO-синтазой, так и нитритредуктазной компонентами* (Рис. 1) [15–25]. Анализ данных литературы и результатов собственных исследований позволил объяснить не только механизм увеличения *NO-синтазной компоненты этого цикла*. Активация образования NO при гипоксии/ишемии может явиться причиной *перераспределения белков из растворимого в цитоплазме состояния в состояние мембранно-связанное* [23, 26]. Это явление само по себе может быть причиной увеличения объема и улучшения визуализации шипиков дендритов и их мембран при гипоксии/ишемии (Рис. 2). Увеличение объема и протяженности активной зоны синапса тоже может быть следствием перераспределения белков из растворимого в мембранно-связанное состояние.

Однако дефицит энергии в мозге при гипоксии/ишемии, а также повышенные концентрации NO могут ингибировать электронно-транспортные цепочки в митохондриях, и, тем самым, снижать содержание АТФ и митохондриального мембранного потенциала, а также приводить к нарушению ионного гомеостаза [27–48]. Вместе с этими нарушениями вокруг ионов Na^+ в нейронах могут накапливаться молекулы H_2O , а вместе с ними могут развиваться явления набухания и отека (Рис. 3) [34, 36–50]. Такие же изменения, какие происходят в мозге *in vivo* («изменения в результате употребления» – «changes due to use»), также происходят при токсическом воздействии глутамата (Glu), NO-генерирующих соединений и при гипоксии/ишемии (Рис. 3). Таким образом, события, которые происходят в мозге при функциональной нагрузке, связанной с обучением, памятью и мышлением, а также с воздействием Glu, NO-генерирующих соединений и гипоксии/ишемии однонаправлены [9–14, 53–87]. Они являются частью общих адаптационных и компенсаторно-приспособительных механизмов, участвующих в развитии организмов [63]. Именно эти обстоятельства сделали *механизмы памяти сопряженными с механизмами развития, и, наоборот, механизмы развития клеток и организмов сопряженными с механизмами памяти и обучения*. В результате этого обстоятельства способность *запоминать и обучаться* стали имплицитными, внутренне присущими свойствами всех клеток и всех живых организмов. Это стало возможным бла-

годаря наличию у всех клеток живых организмов *плазматической мембраны и белков, способных находиться как в растворимом в цитоплазме состоянии, так и переходить в клетках из растворимого состояния в мембранно-связанное состояние*. Эти события и механизмы, участвующие в этих событиях, в свою очередь, могут приводить к увеличению объема шипиков дендритов, аксоно-дендритных связей, а также вызывать увеличение протяженности и объема активной зоны синапса [9–14, 53–87]. *Если эти события происходят в течение короткого времени (десятки минут), то они, как правило, связаны с перераспределением белков из растворимого в мембранно-связанное состояние, и, увеличением содержания ионов Na^+ , а вместе с ними и молекул H_2O , в клетках*. Такие события, как правило, связаны с реализацией механизмов пластичности и могут быть причастны к *механизмам кратковременной памяти*. Основанием для такого предположения послужили исследования, выполненные с участием двух групп участников/исследователей (возраст 18–22 года и 60+), которые анализировали друг у друга объем кратковременной памяти (запоминание и воспроизведение 10 случайных слов) до приема нитроглицерина и спустя 20–30 мин после приема этого соединения. Объем кратковременной памяти у молодых испытуемых (возраст 18–22 года) в среднем увеличивался с 7 ± 2 запоминаемых случайных слов до 8 ± 2 слов, запоминаемых через 20–30 мин после приема нитроглицерина. В период активного действия нитроглицерина (первые 5–10 мин), когда происходило расширение сосудов крови, объем кратковременной памяти у тех же испытуемых снижался до 5 ± 2 запоминаемых случайных слов. В таких же пределах объем кратковременной памяти был у исследователей/испытуемых в возрасте 60+ до приема нитроглицерина, а сам нитроглицерин у этих испытуемых существенно не влиял на объем кратковременной памяти. Результаты этих исследований впервые были доложены еще в 90-х гг. XX в. в присутствии академика П.В. Симонова, который сделал обобщающее резюме: «В нашем организме очень трудно что-либо улучшить. Особенно, если это касается памяти и деятельности мозга. Весь мой опыт в этой области свидетельствует о том, что повредить и нарушить можно легко, а улучшить и усовершенствовать – чрезвычайно сложно. Практически невозможно. Поэтому большинство научно-исследовательских работ построено на ингибировании процессов, связанных с памятью и обучением».

Если объемные изменения нейронов происходят в течение суток или несколько суток, то они, как правило, связаны с активацией генетического аппарата клеток и работой белоксинтезирующих систем [62]. Такие относительно долговременные процессы в нейронах могут быть частью механизмов долговременной памяти. Описанные механизмы отличаются от тех, которые приводят к увеличению объема кровеносных сосудов. Однако они не менее важные для понимания процессов, сопутствующих процессам обучения, памяти и мышления. Эти процессы протекают не только на ранних стадиях гипоксии/ишемии. Они легко наблюдаются при моделировании процессов воздействия токсических доз глутамата (Glu) и NO-генерирующих соединений [64–105]. Однако это не означает, что эти процессы не происходят при воздействии физиологических концентраций Glu и NO. Они протекают и при физиологических значениях концентраций Glu и NO. Однако в этих условиях их труднее обнаружить. Лишь зная, что происходит при гипоксии/ишемии и при воздействиях токсических концентраций Glu и NO, можно, понижая дозы Glu и NO-генерирующих соединений, проследить за указанными выше структурно-функциональными изменениями центрального звена передачи сигнала и подтвердить те выводы, которые наши коллеги, и мы, уже сделали в своих публикациях [64–118].

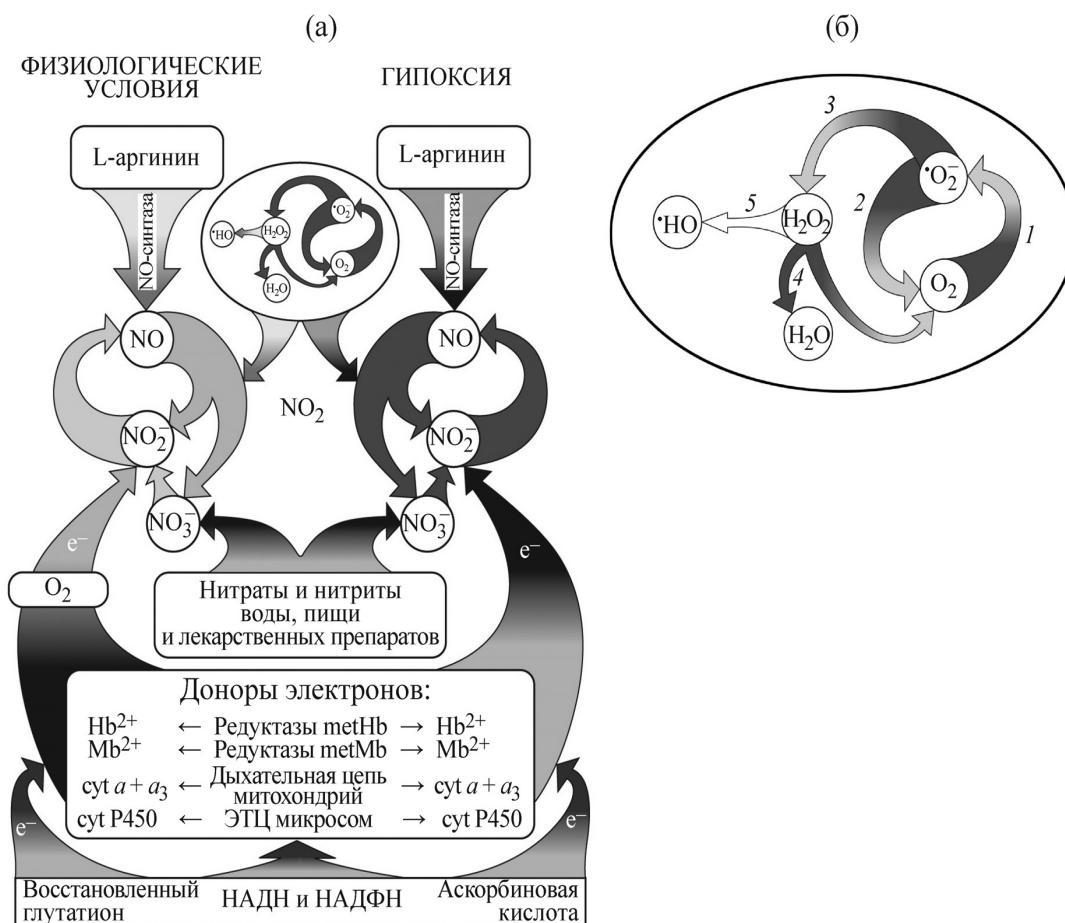


Рис. 1. Циклы оксида азота (а) и супероксидного анион-радикала (б).

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 NO₂⁻, образующиеся из L-аргинина, могут вновь при участии нитритредуктазных систем, включающих в себя гемоглобин (Hb), миоглобин (Mb) и цитохромы (cyt a+a₃, cyt P-450), замыкать в цикл цепочку (L-аргинин → NO → NO₂⁻/NO₃⁻). Кислород, связываясь с гемом, ингибирует нитритредуктазную активность этих белков. При гипоксии и функциональной нагрузке, когда гемсодержащие белки переходят в дезокси-форму, ионы NO₂⁻ начинают активно восстанавливаться, акцептируя электроны с этих гемсодержащих белков. В цикле супероксидного анион-радикала происходят: 1 – восстановление O₂ и образование супероксидного анион-радикала; 2 и 3 – реакции дисмутации супероксида, катализируемые супероксиддисмутазой; 4 – разложение пероксида водорода (H₂O₂) на воду (H₂O) и молекулярный кислород (O₂), осуществляемое ферментом каталазой; пероксид водорода (H₂O₂) 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 (NO₂) и пероксинитритов, вновь распадающихся на NO₂ и •ОН-радикалы, которые повреждают основные компоненты живых организмов.



Рис. 2. Шипики дендритов: при гипоксии/ишемии они увеличиваются в объеме, и, вследствие этого, улучшается их визуализация.

Явление улучшения визуализации шипиков дендритов, аксоно-дендритных связей и увеличение объема и протяженности активных зон синапсов впервые наблюдал Н.С. Косицын и соавторы [9–14], а механизмы этого явления были раскрыты в работах В.П. Реутова и соавторов [15–23].

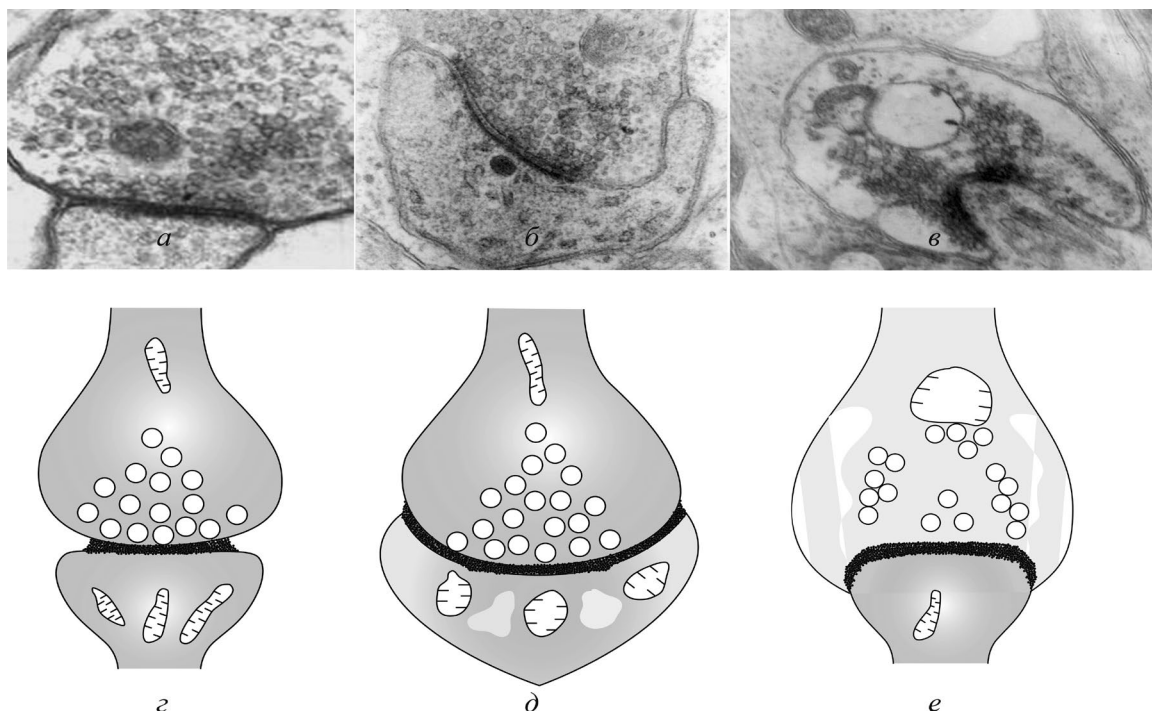


Рис. 3. Активные зоны синапса:

a – в норме активные зоны синапсов, как правило, имеют форму слегка выпуклую/вогнутую или близкую к прямолинейной; *б* – при токсическом воздействии Glu (1mM) на мозжечок лягушки *Rana Temporaria* активные зоны синапсов претерпевают объемные и линейные изменения, характеризующиеся значительными увеличениями объема и протяженности активной зоны синапса на фоне увеличения объема шипиков дендритов (Рис. 2). При этом линия изгиба активных зон синапса характеризовалась «выпуклыми» формами; *в* – в присутствии избытка NO-генерирующего соединения (1 mM NaNO₂) – наблюдаются значительные изменения объема бутона, инкапсулирующего шипики. Линия изгиба активной зоны синапса была «вогнутой» и имела «грибовидную» форму. Такая же линия изгиба активной зоны синапса в нейронах млекопитающих наблюдалась в опытах, проведенных совместно с В.М. Сердюченко, по выработке у животных «сверхупроченных» рефлексов после 3000 повторений. В настоящее время известно, что «грибовидные» шипики дендритов (Рис. 4) и синапсы, входящие в состав аксоно-дендритных связей, являются самыми стабильными межнейронными связями. Таким образом, явление возникновения «сверхупроченных» рефлексов получило биохимическое (участие NO) и морфологическое (образование «грибовидных» шипиков) обоснование, которые стали частью структурно-функциональной теории памяти.

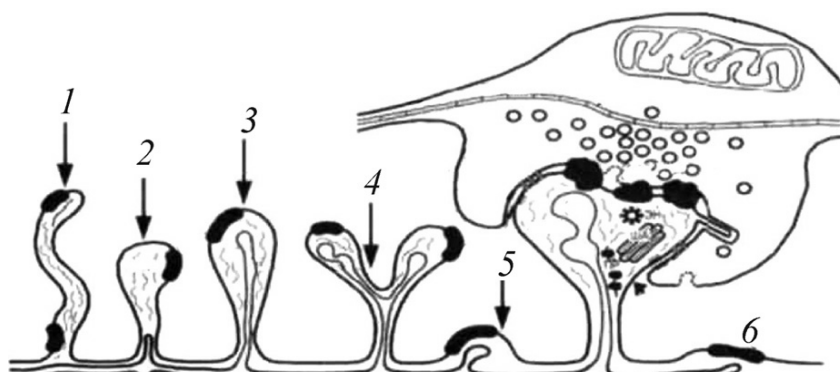


Рис. 4. Шипики дендритов и пресинаптический бутон, обволакивающий грибовидный шипик дендрита.

Шипики, как правило, имеют тонкую *дендритную шейку*, оканчивающуюся *шарообразной дендритной головкой*. Дендритные шипики присутствуют на дендритах большинства основных типов нейронов мозга. Шипики могут менять объем, форму и свое расположение в пространстве.

Шипики дендритов, участвующие в образовании синаптического соединения, могут иметь различную форму: 1 – филоподии; 2 – протошипики; 3 – тонкие шипики, 4 – разветвленные шипики; 5 – пеньковые шипики; 6 – «грибовидные» шипики. Последние характеризуются повышенной прочностью и возникают при гипоксии/ишемии, выработке сверхпроченных рефлексов, после воздействия умеренных концентраций NO-генерирующих соединений. Таким образом, увеличение объема шипиков дендритов, улучшение их визуализации при гипоксии/ишемии на фоне активации в этих условиях *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала* при функциональной нагрузке и обучении (образование «сверхпроченных условных рефлексов») было обнаружено в Институте высшей нервной деятельности АН СССР/РАН [9–14, 15–26, 54–61, 63–105]. В дальнейшем при участии сотрудников ИВНД и НФ РАН и Института проблем передачи информации имени А.А. Харкевича РАН (ИППИ РАН) были установлены механизмы их образования и включены в качестве составной части, так называемой структурно-функциональной теории памяти [15–26, 54–61, 63–105].

Итак, активация NO-синтазной компоненты связана а) с увеличением поступления внутрь нейронов (или других клеток) ионов Ca^{2+} на первой стадии Glu-воздействия, при гипоксии/ишемии; и, б) снижением активности Ca^{2+} -АТФ-аз на последующих ее стадиях, вследствие уменьшения содержания АТФ в клетках, других высокоэнергетических субстратов и митохондриального мембранного потенциала [27–50]. В результате этого явления происходят нарушения ионного гомеостаза – в первую очередь ионов Ca^{2+} – и ионов Na^+/K^+ [36–48]. При этом содержание одних ионов (например, ионов Ca^{2+}) выходит на плато (явление отсроченной кальциевой дисрегуляции – ОКД), а содержание других ионов – Na^+ – вместе с молекулами воды (H_2O) продолжает увеличиваться [48–50, 119–122]. Эти явления сопровождаются энергетическим дефицитом практически во всех клетках (в том числе в нейронах и глиальных клетках) на фоне развития набухания и отеков этих нервных (нейронов и глиальных клеток) или других клеток и тканей. Явление имеет неспецифический характер и характерно не только при воздействии токсическими концентрациями Glu и NO-генерирующих соединений; при гипоксии/ишемии. Отдельные стадии этого явления могут происходить при развитии многих патологических процессов.

Механизмы регулирования содержания воды в тканях и объема мозга имеет решающее значение для нормального функционирования центральной нервной системы (ЦНС). Это обусловлено тем, что мозг, окруженный твердым/жестким черепом, очень чувствителен к любому повышению внутричерепного давления. Изменения в гомеостазе ионов Na^+ и в распределении церебральной воды могут привести к набуханию нейронов и глии, известному как *цитотоксический отек мозга*. В последние десятилетия были проведены многочисленные исследования для выяснения молекулярных основ и патофизиологии отека мозга. Однако до сих пор мало, что известно о механизмах регулирования транспорта воды через гематоэнцефалический барьер, а также между вне- и внутри-клеточными компартментами паренхимы мозга. Открытие и характеристика семейства водных мембранных каналов аквапоринов (AQP) дало возможность понять некоторые молекулярные механизмы переноса воды через плазматические мембраны [121–124].

На фоне развития негативных процессов и реакций всегда развиваются компенсаторно-приспособительные механизмы, которые ограничивают зону повреждения тканей [64–105]. У молодых индивидуумов, как правило, мощности энергетических систем оказывается достаточно для того, чтобы полностью не допустить или эффективно ограничить развитие объемных зон повреждений. По мере старения организма снижается содержание высокоэнергетических соединений, в том числе и гликогена, столь важного для работы глиальных клеток, происходит снижение энергетической функции митохондрий или развитие митохондриальной дисфункции. Оценка *митохондриальной дисфункции* требует определения самого понятия *дисфункции митохондрий*.

Обычно это способность митохондрий соответствующим образом вырабатывать АТФ в ответ на потребность в энергии. Там, где необходим анализ других функций, требуются конкретные индивидуальные решения этого вопроса. Дисфункцию можно

оценить в изолированных митохондриях, в клетках или *in vivo*. Существует множество методов измерения функции и дисфункции митохондрий в этих системах. Как правило, измерения потоков энергии дают больше информации о способности производить АТФ, чем измерения промежуточных соединений и потенциалов. Для изолированных митохондрий лучший анализ функции/дисфункции – это митохондриальный респираторный контроль: увеличение частоты дыхания в ответ на добавление ADP в суспензии митохондрий. Для интактных клеток лучший анализ – это эквивалентное измерение клеточного респираторного контроля, которое сообщает о скорости производства АТФ, скорости утечки протонов, максимальной частоте дыхания, соотношении респираторного контроля и резервной респираторной емкости. Полезную дополнительную информацию дают измерения мембранного потенциала. Таким образом, измерение, как дыхания, так и мембранного потенциала во время соответствующих титрований позволяет идентифицировать первичные участки распределения энергетического баланса, что позволяет проводить более глубокий количественный анализ функции/дисфункции митохондрий [33–50]. Таким образом, при старении организма вместе с развитием дисфункции митохондрий увеличивается вероятность необратимых объемных изменений клеток и тканей, завершающиеся летальным исходом. Именно эти механизмы, согласно развиваемым нами представлениям, лежат в основе повреждения нейронов, глиальных клеток и кровеносных сосудов мозга [25, 119, 120].

Однако нельзя исключить и более сложные взаимоотношения между Glu нейротоксичностью, снижением содержания АТФ и гибелью нейронов [29–32]. В работе [29] на первичной культуре нейронов мозжечка было установлено, что активация каинатных и NMDA рецепторов вызывает снижение содержания АТФ. Glu вызывал быстрое истощение АТФ (снижение на 40% за 5 мин). После 60 мин инкубации с 1 М Glu содержание АТФ снизилось на 60–70%. Подобные эффекты были вызваны Glu, NMDA и каинатом, в то время как quisqualate, АМРА или транс-АСРD не влияли существенно на содержание АТФ. EC50 составлял приблизительно 6, 25 и 30 мкМ для Glu, NMDA и каината, соответственно. DNQX и AP-5, конкурентные антагонисты каинатных и NMDA рецепторов, соответственно, предотвращали дозозависимым образом вызванное Glu истощение АТФ. Эти результаты показывают, что вызванное глутаматом истощение АТФ опосредуется активацией каинатных и NMDA рецепторов [29].

Активация нитритредуктазной компоненты цикла оксида азота [15–23] обусловлена переходом гемсодержащих белков в дезокси-форму, в которой они приобретают способность восстанавливать ионы NO_2^- в NO (нитритредуктазную способность) [20, 23], поскольку кислород является ингибитором нитритредуктазной активности гемсодержащих белков [51]. При нормальных физиологических условиях *цикл оксида азота* вместе с его *NO-синтазной* и *нитритредуктазной компонентами* обеспечивает эффективную регуляцию содержания NO. Учитывая то обстоятельство, что *цикл оксида азота* и *цикл супероксидного анион-радикала* сопряжены друг с другом, то вместе они не допускают развития *оксидативного* и *нитрозативного стресса* до такой степени, которая завершается некрозом большого количества клеток и тканей, которые не совместимы с жизнью.

Оксид азота в кровеносных сосудах

Увеличение объема сосудов крови (кровеносных сосудов) наблюдали на протяжении тысячелетий во время тренировок, интенсивной физической работы и боевых сражений. Внимание на это явление обратил английский физиолог Уолтер Холбрук Гаскелл (W. H. Gaskell 1847–1914) [52]. Он описал это явление и назвал его рабочей гиперемией (1880) [52, 53]. Однако механизм увеличения объема и улучшение визуализации кровеносных сосудов оставался неизвестным. Ровно через 100 лет в 1980 г. Robert F. Furchgott вместе с J.V. Zavadsky опубликовали статью в Nature [1], в которой было установлено, что эндотелий сосудов выделяет биохимический/химический эндотели-

альный фактор релаксации сосудов – EDRF (Endotelium Derived Relaxing Factor). (Рис. 5).

Анализ данных литературы и результатов собственных исследований позволил авторам прийти к выводу, что EDRF выделяется в ответ на сдвиговое напряжение на эндотелий сосудов или при воздействии физиологически активных веществ, например, ацетилхолина. В дальнейшем было установлено, что таким фактором релаксации сосудов (EDRF) является **оксид азота (NO)**, который синтезируется из **L-аргинина (L-arginine)** [6–8], и воздействует на гладкомышечные элементы сосудов (**smooth muscle cells**) через активацию гемсодержащей растворимой гуанилатциклазы (**sGC**) и повышение концентрации **cGMP** (Рис. 5) [2–5]. Таким образом, оказалось, что расширить сосуды можно, как с помощью NO-генерирующих веществ, например, нитроглицерина, так и с помощью **ингибиторов фосфодиэстераз cGMP**, например, **Виагры**. Однако нельзя одновременно воздействовать NO-генерирующими соединениями и ингибиторами фосфодиэстераз cGMP, чтобы не вызвать неконтролируемого расширения сосудов и катастрофического для организма падения давления.

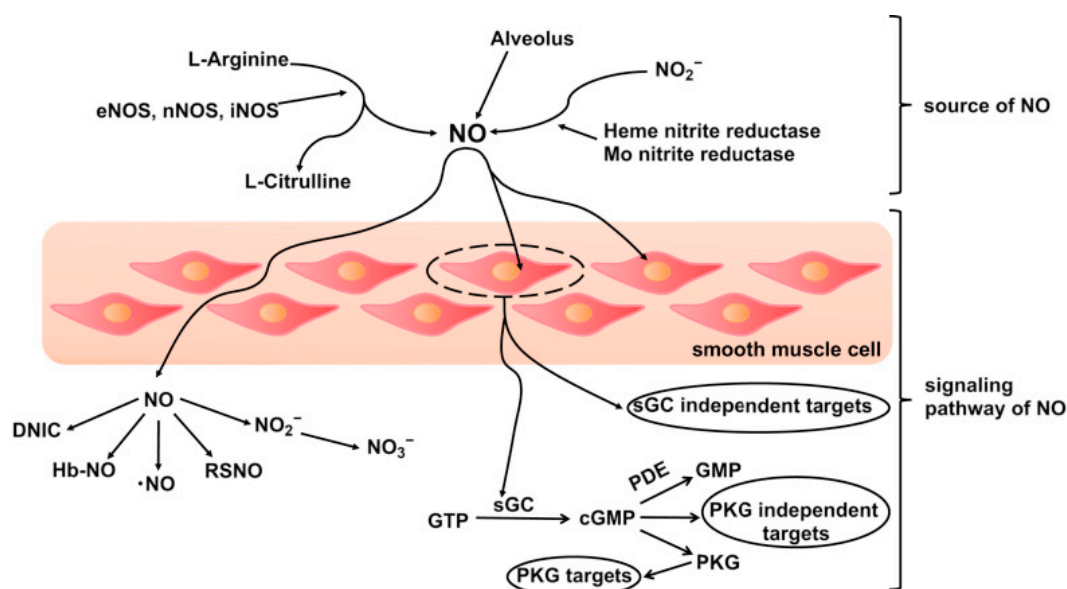


Рис. 5. Источники NO и сигнальные пути с участием NO [1–8].

Фактором релаксации сосудов (EDRF) является оксид азота (NO), который синтезируется из **L-аргинина (L-arginine)** [6–8], и воздействует на гладкомышечные элементы сосудов (**smooth muscle cells**) через активацию гемсодержащей растворимой гуанилатциклазы (**sGC**) и повышение концентрации **cGMP**

Оксид азота в мозге

С одной стороны – расширение сосудов под влиянием NO и cGMP [1–8]. Это всемирно известное достижение, отмеченное Нобелевской премией по физиологии и медицине (1998). С другой стороны – улучшение визуализации *шипов дендритов*, *аксоно-дендритных связей* и *увеличение протяженности активных зон синапса* [29–38]. Первое явление можно наблюдать визуально на макроуровне, второе лишь при использовании электронного микроскопа. Оказалось, что второе явление отчетливо наблюдается при кратковременной гипоксии/ишемии, например, через 30–60 мин после пережатия сонной артерии. Установлено также, что после таких воздействий кратковременной гипоксии/ишемии животные легче запоминают и быстрее обучаются. Именно в течение кратковременной гипоксии/ишемии активируется цикл оксида азота с его NO-синтазной и нитритредуктазной компонентами [15–25]. Если гипоксия/ишемия действует больше 60 мин, то концентрация L-аргинина в крови и тканях снижается [23],

поскольку в этих условиях L-аргинин расходуется на синтез новых пептидов, участвующих в гипоксическом прекондиционировании, и, включается в цикл Кребса на уровне α -кетоглутаратного комплекса для энергетических потребностей, связанных с синтезом сукцината/янтарной кислоты, которая активно используется для синтеза АТФ и повышения мембранного потенциала митохондрий, минуя первый пункт сопряжения окислительного фосфорилирования. В условиях гипоксии/ишемии, как и при других неблагоприятных условиях [125, 140, 141], прежде всего, выключается участок дыхательной цепи от NADH до коэнзима Q (первый пункт сопряжения окислительного фосфорилирования). Это объясняет данные тех исследований, когда авторы, используя модель хронической гипоксии/ишемии, наблюдали не увеличение синтеза NO, а, наоборот, снижение его образования [126–128].

Фармакодинамика L-аргинина

В настоящее время имеется достаточно большое количество работ (около 70000 в Pubmed), посвященных фармакодинамике L-аргинина [129–132] и анализу влияния L-аргинина на образование NO и течение сосудистых заболеваний в мозге и сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов, длительно принимающих L-аргинин (Рис.1) [130 – 132]. L-аргинин (2-амино-5-гуанидинпентановая кислота) – алифатическая основная α -аминокислота. Она оптически активна: существует в виде L- и D-изомеров. L-Аргинин входит в состав пептидов и белков. Особенно высокое содержание этой аминокислоты в пептидах и белках гистонах и протаминах (до 85%). Имеются основания считать, что активное и чрезмерное потребление L-аргинина иммунными и глиальными клетками, обычно защищающими нейроны мозга, может явиться одной из причин возникновения болезни Альцгеймера.

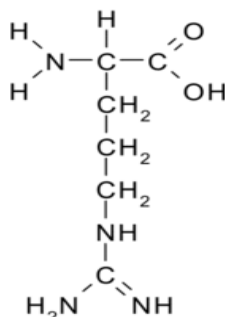


Рис. 6. L-аргинин синтезируется в организме из L-цитрулина (Рис. 7).

Молекула L-цитрулина с помощью ферментов аргининсукцинатсинтазы превращается в промежуточный продукт – аргининсукцинат, который расщепляется аргининсукцинатлиазой до аргинина и фумарата. Через фумарат осуществляется связь цикла превращения аргинина и образования NO с циклом трикарбоновых кислот. Таким образом, L-аргинин является субстратом для NO-синтаз: гуаниновые (H_2N) группировки L-аргинина являются источником для образования NO, после чего L-аргинин вновь превращается в L-цитрулин (Рис. 7). L-аргинин используется в клетках не только для синтеза NO, но и для синтеза белков, мочевины, креатинина, полиаминов, пролина, глутамата. Он также стимулирует секрецию инсулина и других гормонов, влияет на процесс фибринолиза и другие процессы, не связанные с образованием NO. L-аргинин участвует в образовании пептидов и включается на уровне α -кетоглутаратного комплекса в цикл трикарбоновых кислот в окисление с образованием сукцината (янтарной кислоты) [129–132].

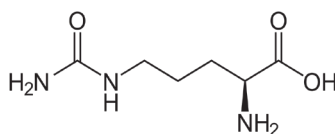


Рис. 7. L-цитрулин является субстратом для образования L-аргинина.

С помощью ферментов аргинин-сукцинатсинтазы молекула L-цитрулина превращается в промежуточный продукт – аргинин-сукцинат, который расщепляется аргинин-сукцинатлиазой до аргинина и фумарата (Рис. 8). Через фумарат осуществляется связь цикла превращения аргинина и образования NO с циклом трикарбоновых кислот.

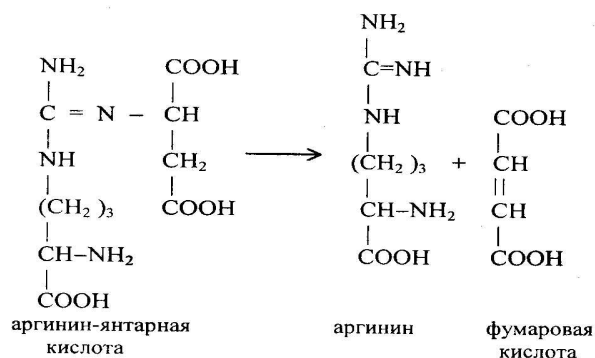


Рис. 8. Аргинин-сукцинат/аргинин-янтарная кислота расщепляется аргинин-сукцинатазой до аргинина и фумарата/фумаровой кислоты.

При нормальной западной диете ежедневно потребляется около 5–10 г L-аргинина. Уровни L-аргинина в плазме существенно не снижаются при большинстве болезненных состояний, за исключением гипоксии/ишемии и терминальной стадии почечной недостаточности во время лечения гемодиализом. Тем не менее, внутривенное или диетическое (пероральное) введение относительно больших доз L-аргинина, как было показано, приводит к усиленному образованию NO у субъектов с нарушенной функцией эндотелия на исходном уровне. В нескольких контролируемых клинических испытаниях было показано, что длительный прием L-аргинина улучшает симптомы сердечно-сосудистых заболеваний. Однако в других исследованиях L-аргинин не был полезен, а в недавнем исследовании авторы сообщили о более высокой смертности субъектов, получавших L-аргинин, чем у пациентов, получавших плацебо [131, 132].

Недавно стало ясно, что эндогенные уровни асимметричного диметиларгинина (ADMA), конкурентного ингибитора метаболизма L-аргинина, могут определять реакцию субъекта на добавление L-аргинина. L-аргинин, по-видимому, сам по себе не оказывает никакого эффекта у субъектов с низким уровнем ADMA. Однако у субъектов с высокими уровнями ADMA L-аргинин восстанавливает соотношение L-аргинин / ADMA до нормальных значений, и, тем самым, нормализует функцию эндотелия. В заключение следует отметить, что влияние добавок L-аргинина на физиологию человека оказывается многоцелевым и дозозависимым. Дозы 3–8 г / сут представляются безопасными, поскольку они не вызывают острых фармакологических эффектов у людей [131, 132].

Влияние L-аргинина и L-карнитина на течение нитрозативного и оксидативного стресса

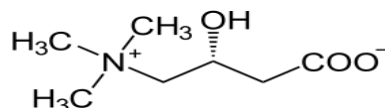


Рис. 9. L-карнитин [46] участвует в обеспечении транспорта длинно-цепочечных жирных кислот в митохондриях.

Транспорт этих жирных кислот в митохондрии осуществляется через внутреннюю мембрану митохондрий. В митохондриях происходит β-окисление длинноцепочечных молекул жирных кислот до ацетил-КоА, с последующей его утилизацией наряду с углеводами. Образование энергии из жиров зависит от согласованной работы множества ферментов и переносчиков. Конечной и одной из важнейших стадий этого процесса является окисление жирных кислот и синтез АТФ в митохондриях

Основными пищевыми источниками L-карнитина являются: мясо, рыба, птица, молоко, сыр и творог. Его название происходит от латинского «carnis» (родительный падеж слова «саго» – мясо). В США в настоящее время не установлено каких-либо ре-

комендуемых суточных доз карнитина, он не относится к незаменимым пищевым веществам/добавкам. Согласно современным представлениям, L-карнитин участвует в транспорте длинноцепочечных жирных кислот. Транспорт осуществляется через внутреннюю мембрану митохондрий. В митохондриях происходит β -окисление длинноцепочечных молекул жирных кислот до ацетил-КоА, с последующей его утилизацией наряду с углеводами. Образование энергии из жиров зависит от согласованной работы множества ферментов и переносчиков. Конечной и одной из важнейших стадий этого процесса является окисление жирных кислот и синтез АТФ в митохондриях [132].

В более древних органеллах – окисосомах и пероксисомах – карнитин обеспечивает челночный механизм по доставке ацетил-КоА в цитоплазму. В митохондриях, мембрана которых в обратном направлении непроницаема для L-карнитина, транспорт ацетил-КоА в цитоплазму осуществляется с помощью цитрата, а поступающий в митохондрии карнитин декарбоксилируется до β -метилхолина с последующим удалением. Исследования, предпринятые для того, чтобы выявить роль оксидативного и нитрозативного стресса, антиоксидантных ферментов, связанных с активными формами кислорода, оксида азота и глутатионом показали, что оксидативный/нитрозативный стрессы вносят свой вклад в патогенез повреждения ряда тканей (например, кишечника), вызванного гипоксией/реоксигенацией. При этом было установлено, что антиоксидантный окислительно-восстановительный цикл глутатиона играет существенную роль в защитном действии от повреждений кишечника, вызванного гипоксией/реоксигенацией. При этом добавки L-аргинина и L-карнитина улучшали гистологические признаки поврежденного кишечника, вызванные гипоксией/реоксигенацией и уменьшали перекисное окисление липидов. Однако они не изменяли активность антиоксидантных ферментов, связанных с глутатионом [132].

Ранее было указано, что если гипоксия/ишемия действует больше 60 мин, то концентрация L-аргинина в крови и тканях снижается [23], поскольку в этих условиях L-аргинин расходуется на синтез новых пептидов, участвующих в гипоксическом прекодиционировании, и, включается в цикл Кребса на уровне α -кетоглутаратного комплекса для окисления до молекул H_2O . В ходе этих процессов осуществляется образование сукцината/янтарной кислоты, которая активно используется для синтеза АТФ, минуя первый пункт сопряжения окислительного фосфорилирования, в условиях гипоксии/ишемии. Это объясняет данные тех исследований, когда авторы, используя модель хронической гипоксии/ишемии, наблюдали не увеличение синтеза NO, а, наоборот, снижение его образования [126–129].

С нашей точки зрения, это происходило вследствие истощения пула L-аргинина, снижения NO-синтазной активности, а вместе с ней и снижения нитритредуктазной активности из-за дефицита ионов NO_2^- . Проверить справедливость наших представлений можно, если исследовать на фоне длительной гипоксии/ишемии а) влияние введения доз L-аргинина в широком диапазоне концентраций (ежесуточное потребление L-аргинина европейским человеком находится в пределах 5–10 г); б) влияние ионов NO_2^- ($NaNO_2$ в дозах 0.5 и 5 мг/100 г массы тела); в) сочетанного воздействия различных доз L-аргинина и ионов NO_2^- . При этом необходимо учесть тот факт, что в этих исследованиях будет обязательно присутствовать экстремум – после положительного влияния L-аргинина и NO-генерирующих веществ ($NaNO_2$ в дозах 0.5 и 5 мг/100 г массы), на переживание гипоксии/ишемии будет всегда наступать такой момент, когда действие субстратов L-аргинина и ионов NO_2^- из положительного влияния будут оказывать отрицательное влияние на выживаемость животных. При этом концентрация NO и Hb-NO комплексов будет непрерывно увеличиваться. Однако, возможен и другой вариант, когда вводимый L-аргинин будет превращаться в асимметричный диметиларгинин (ADMA), который является конкурентным ингибитором метаболизма L-аргинина и образования NO. При этом все зависит от индивидуальных особенностей: при низком уровне эндогенного ADMA L-аргинин не будет ингибировать NO-синтазы, наоборот, он будет

субстратом для NO-синтаз и будет активировать образование NO. Однако при высоком эндогенном уровне ADMA L-аргинин может стать дополнительным источником образования ADMA и стать ингибитором NO-синтаз [129–132]. Таким образом, любое вещество, которое является активатором какого-либо процесса при определенных условиях и в отдельных индивидуумах может превращаться в своего антипода – ингибитора этого процесса или реакции. В этом, по-видимому, проявляется регуляторный дуализм практически всех реакций и процессов, участвующих в метаболизме живых организмов. Это очень напоминает известную формулу: «Каждое вещество может быть лекарством или ядом – все зависит от дозы вещества». То же самое можно сказать и об оксиде азота.

Действительно, NO может участвовать как в активации процессов запоминания, так и в его ингибировании [133–139]. Какие механизмы могут при этом включаться, мы обсудим ниже. Очевидно, что все эти механизмы участвуют в процессах, связанных с памятью, обучением, а, следовательно, и с мышлением. Можно предположить, что если явление расширения сосудов и механизмы, лежащие в основе этого явления, являются важнейшими достижениями физиологии и медицины конца XX в., то, наверное, и механизмы, лежащие в основе увеличения объема шипиков дендритов, аксоно-дендритных связей и увеличения протяженности активных зон синапса [10–14, 25, 26, 144–154], не менее важные для науки XX–XXI в. Тем более, что эти процессы связаны с механизмами, памяти, обучения и мышления.

Механизмы увеличения объема шипиков дендритов, аксоно-дендритных связей и протяженности активной зоны синапса при гипоксии/ишемии можно объяснить, используя концепции циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала

В середине 70-х гг. XX в. в работе одного из авторов этого обзора (Р.В.П.) было установлено, что кислород (O_2) является ингибитором нитритредуктазной активности гемоглобина. *В то время говорить и писать о гемоглобине в связи с его нитритредуктазной активностью, которая характерна для растений и микроорганизмов, было не принято.* В лучшем случае, можно было предполагать, что у гемоглобина, находящегося в дезокси-форме, имеется неспецифическая химическая активность, которая никак не могла быть связана, по мнению рецензентов, с физиологическими нитритредуктазными свойствами самого пигмента крови. Это обусловлено, так же по мнению рецензентов и большинства ученых того времени, тем обстоятельством, что гемоглобину, специализирующимся, прежде всего, на переносе O_2 и удалении CO_2 , такая функция не свойственна: гемоглобин и организм млекопитающих, согласно общепринятому в то время мнению, может обходиться без этой нитритредуктазной функции. В связи с этим статью *о нитритредуктазной активности дезоксигемоглобина* не публиковали более пяти лет. Потом предложили сместить акценты на *кислород*, и хотя бы по-другому ее назвать, например, «Кислород как ингибитор нитритредуктазной активности гемоглобина». Под таким названием статья была опубликована лишь в 1983 г [51]. Ровно через 20 лет почти с таким же названием в *Nature medicine* вышла статья американских ученых [141], которая стала продолжением нового направления исследований в науке. Причем не менее важным направлением исследований, чем с участием NO-синтазных реакций в живых организмах. В настоящее время имеется огромное количество работ, в которых установлено, что и другие гемсодержащие белки – миоглобин (Mb), цитохромоксидаза/цитохром $a+a_3$ и цитохром P-450 так же, как и Hb, способны восстанавливать ионы NO_2^- в NO.

Таким образом, концепция цикла оксида азота [15–21] была первой концепцией, которая позволила объединить между собой NO-синтазные и нитритредуктазные компоненты. В этом цикле действия конститутивных (нейрональной и эндотелиальной), индуцибельной NO-синтаз: L-аргинин \rightarrow NO \rightarrow NO_2^-/NO_3^- [6–8] и нитритредуктазные

реакции (реакции восстановления NO_2^- в NO) с участием гемсодержащих белков (рис. 1) были впервые представлены в виде единого регуляторного цикла [15–21, 23, 24]. Так появилась схема *цикла оксида азота* (в явном виде) с *циклом супероксидного анион-радикала* (в неявном виде) (Рис. 1а). Однако *цикл супероксидного-анион-радикала* был достаточно четко обозначен в самой схеме цикла NO (верхняя центральная часть рисунка). В дальнейшем два цикла – *оксида азота* и *супероксидного анион-радикала* – заняли равноправное место в дальнейших публикациях (Рис. 1 а, б) [144–154].

Анализ циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала с привлечением концепции принципа цикличности

На протяжении более 2500 лет философы и естествоиспытатели предчувствовали существование универсальных законов, которые по степени всеобщности не уступают закону или принципу атомарного строения вещества («все состоит из атомов»). Анализ *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала* привел нас к выводу, что причиной их существования может быть *принцип цикличности*. Этот принцип проявляет себя практически на всех структурно-функциональных уровнях живой и неживой природы. Он может проявлять себя в виде *спиралевидных пространственно организованных структур* от α -спирали белков и двойной спирали ДНК до спиралевидных галактик; и, в виде *временных циклов* – от *биохимических циклов* трикарбоновых кислот и мочевины, *клеточного цикла, жизненного цикла всех живых организмов* до циклов Бете-Вейцеккера в недрах Солнца и циклов существования галактик во Вселенной. Сам факт существования циклов в пространстве и во времени на всех структурно-функциональных уровнях свидетельствует о том, что эта закономерность является следствием действия другого универсального принципа – *голографического принципа*. Таким образом, в результате анализа и обобщения *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала* мы вышли на существование, по крайней мере, трех универсальных принципов, которые организуют неживую и живую природу в единую систему. Этими принципами являются *принцип цикличности, голографический принцип* и всем хорошо известный *принцип атомарного строения вещества* [24, 64–67]. Осознание самого факта наличия этих принципов и построение медико-биологического знания в соответствии с этими принципами может изменить существующую в XX в. и в начале XXI в. *парадигму медико-биологического знания*. Эти изменения настоятельно требуют от ученых найти такую форму концентрации медико-биологических знаний, которая бы позволила не только профессорско-преподавательскому составу с трудом поспевать за стремительным темпом накопления конкретного материала в области молекулярной биологии, биохимии, биофизики, физиологии и патофизиологии, но и студентам надеяться на получение полноценного знания. Использование указанных выше 3-х принципов может помочь в решении актуальной проблемы, стоящей перед биологами и медиками XXI в.

Регуляторные циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала

В основе поддержания биохимических параметров на физиологическом уровне, как известно, лежат регуляторные механизмы. Все они устроены таким образом, что сигнал с выхода регуляторной системы поступает на ее вход. Так реализуется *механизм отрицательной обратной связи*, ограничивающий параметры регулируемой/регуляторной системы в пределах необходимых значений. Для развития системы необходимо наличие *механизмов положительной обратной связи*. Взаимодействие механизмов положительной и отрицательной обратной связи обеспечивают регулируемой/регуляторной системе достижение *результата/результатов полезного действия* весьма экономичным способом с высоким коэффициентом полезного действия (КПД).

Циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала обеспечивают поддержание концентраций активных форм азота и кислорода в пределах физиологической нор-

мы [15–25, 59–67]. Нарушение или повреждение циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала ведет к тому, что оксид азота и супероксидный анион-радикал начинают с высокой скоростью взаимодействовать друг с другом с образованием диоксида азота (NO_2), анион-радикалов пероксинитритов (ONOO^-), которые после протонирования ($\text{ONOOH} \rightarrow \bullet\text{NO}_2 + \bullet\text{OH}$ -радикалы) распадаются с образованием NO_2 и OH -радикалов. Точками обозначены весьма агрессивные радикалы $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалы, способные разрушать практически все молекулярные и биохимические соединения, входящие в состав белков, нуклеиновых кислот и ненасыщенных жирных кислот – компонентов фосфолипидов мембран клеток и субклеточных структур. В результате чего NO способен выполнять физиологическую регуляторную роль, а NO_2 и продукты его метаболизма (ONOO^- , ONOOH , $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалы), наоборот, оказывают разрушающее действие на клетки [72].

Каким образом активация цикла NO при кратковременной гипоксии/ишемии увеличивает объем шипиков дендритов, аксоно-дендритных связей и протяженность активной зоны синапса?

В основе увеличения объема шипиков дендритов, аксоно-дендритных связей и протяженности активной зоны синапса лежат два явления. Первое явление связано со способностью NO образовывать свободные радикалы на белках и липидах, которые приводят к образованию белок-белковых и белок-липидных комплексов в примембранной области и переходу белков из растворимого состояния в состояние мембранно-связанное [22, 23, 26]. Второе явление обусловлено свойством NO взаимодействовать с цитохромоксидазой/цитохромом $a+a_3$ и способностью ингибировать электронно-транспортную цепочку [144, 145]. В результате этого снижается мембранный митохондриальный потенциал и уменьшается количество АТФ и других макроэргов в клетке, что приводит к снижению активности Na^+/K^+ -АТФ-аз и Ca^{2+} -АТФ-аз [33–50]. Нарушение ионного гомеостаза ведет к увеличению количества ионов Na^+ и Ca^{2+} внутри нервных клеток, что вызывает появление вокруг ионов Na^+ молекул H_2O , развитие процессов набухания, а затем и отека нейронов и глиальных клеток, иногда с локальным или полным разрушением клеток по механизму некроза [22, 23, 26]. Ионы Ca^{2+} приводят к дальнейшей деэнергизации митохондрий, что приводит к нарушению регуляторных циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала. В результате этих изменений и нарушений появляется возможность для взаимодействия NO и $\bullet\text{O}_2^-$ напрямую друг с другом с образованием указанных выше высокореакционных молекул $\bullet\text{NO}_2$ и продуктов его метаболизма (ONOO^- , ONOOH , $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалов) [155–161]. В дальнейшем развивается каскад реакций, приводящих к гибели нейронов по типу некроза или апоптоза. На первых этапах глиальные клетки действуют так, чтобы создать вокруг поврежденной зоны многорядные глиальные структуры-обкрутки [73–85]. Если на этом этапе развития патологического процесса удастся заингибировать каскад реакций с помощью локального охлаждения поврежденной области мозга, ингибиторов NO -синтаз, перевода пациента в искусственную кому с торможением/ингибированием всех физиологических процессов мозга, в крайнем случае, удаления зоны отека и повреждения головного мозга после тяжелой ЧМТ, то пациента можно спасти от развития ишемического/геморрагического инсульта, повреждения мозга в результате судорожно-эпилептического приступа, или тяжелой черепно-мозговой травмы и гибели нейронов мозга и глиальных клеток [160–164]. Полезными в этих случаях могут быть пептидные препараты (например, церебролизин, кортексин и др.) [148, 180–185], ингибиторы NO -синтаз, ингибиторы нитрозативного и оксидативного стресса, а также других свободно-радикальных процессов [165–179].

Заключение

Авторы данного обзора считают, что принципиально новыми в данной работе являются следующие положения. В результате действия регуляторных механизмов – *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала* – в нейронах активируются процессы, характерные для *механизмов пластичности, памяти и обучения*. Гипоксия/ишемия головного мозга запускает сложный каскад метаболических событий с участием активных соединений, которые показаны выделенным шрифтом. Некоторые из этих соединений включают образование свободных радикалов азота – активных форм азота (**АФА**) или Nitrogen Reactive Species (**NRS**) и активных форм кислорода (**АФК**) или Oxygen Reactive Species (**ORS**). Эти свободные радикалы вызывают большую часть повреждений, которые возникают после преходящей ишемии мозга (транзиторной ишемической атаки), а также в области полутени инфарктов, вызванных постоянной ишемией. **Оксид азота**, водорастворимый и жирорастворимый свободный радикал, образуется под действием **синтаз NO**. Гипоксия/ишемия вызывает «всплеск» активности **синтазы оксида азота 1** (нейрональной NO-синтазы – **NOS1**) в нейронах и, по некоторым данным, в глии, повышение активности **NOS3** в эндотелии сосудов, а затем повышение активности индуцибельной NO-синтазы – **NOS2** в ряде клеток, включая инфильтрирующие нейтрофилы и макрофаги, активированные в микроглии и астроцитах. Считается, что влияние гипоксии/ишемии на активность **NOS1**, Ca^{2+} -зависимого фермента, является вторичным по отношению к обратному захвату глутамата в синапсах, активации рецепторов **NMDA** и, как следствие, повышению внутриклеточного Ca^{2+} . Повышение активности **NOS2** опосредуется индукторами транскрипции. В контексте гипоксии/ишемии мозга активность **NOS1** и **NOS2** в целом вредна, а их ингибирование или инактивация является нейрозащитным. Однако продукция NO в кровеносных сосудах при участии эндотелиальной NO-синтазы – **NOS3**, которая, как и **NOS1**, зависит от Ca^{2+} , вызывает расширение сосудов и улучшает кровоток в *полутеновой области инфарктов/инсультов головного мозга*. Помимо синтеза NO, ишемия мозга приводит к образованию $\cdot O_2^-$ за счет действия синтаз NO, ксантинооксидазы, утечки электронов из митохондриальной цепи переноса электронов и других механизмов. **Оксид азота и супероксид** сами по себе обладают высокой реакционной способностью, но также могут взаимодействовать между собой с образованием диоксида азота (**NO₂**) и высокотоксичного аниона, **пероксинитрита**. Последний после протонирования вновь распадается на **NO₂** и **ОН-радикалы**. Токсичность свободных радикалов азота (**RNS**) и кислорода (**ROS**) и **пероксинитрита** возникает из-за их модификации макромолекул, особенно ДНК (прежде всего, гуаниновых оснований), а также в результате индукции механизмов **апоптоза** и **некроза** нейронов. Недавние исследования показали роль пероксинитритов и продуктов его распада (**NO₂** и **ОН-радикалов**) в возникновении **однонитевых разрывов в ДНК**, которые активируют **поли-(АДФ-рибозу) полимеразу (PARP)** – фермента, участвующего в репарации ДНК. Эти события и процессы катализируют расщепление а, следовательно, и потребление **NAD⁺** – источника энергии для многих жизненно важных клеточных процессов. Показано, что чрезмерная активация **PARP**, приводящая к истощению **NAD⁺**, вносит основной вклад в повреждение мозга после временной фокальной ишемии у экспериментальных животных. Накопление в нейронах **поли (АДФ-рибозы)**, конечного продукта активности **PARP**, было продемонстрировано после ишемии мозга у человека. Использование несколько терапевтических стратегий, для предотвращения **окислительного и нитрозативного повреждений** и их последствий после ишемии мозга и черепно-мозговых травм (ЧМТ) у человека оказались полезными для снижения смертности. В частности, перевод пациентов в состояние, близкое физиологическому сну, или перевод в состояние искусственной комы, уменьшил степень повреждения мозга и спас многих пострадавших от ЧМТ, ишемического или геморрагического инсульта. Ранние нейрохирургические операции, уменьшающие количество крови (особенно, сывороточного альбумина плазмы крови) в мозге

при ЧМТ и геморрагических инсультах оказались весьма перспективными для снижения смертности пострадавших пациентов. Некоторые препараты, использованные в ранних исследованиях, оказались неэффективными. Однако другие **антиоксидантные и пептидные препараты** (церебролизин, кортексин и др.) оказались весьма обнадеживающими. Результаты недавних исследований, проведенные на животных, вероятно, приведут к развитию дальнейших фармакологических стратегий для предотвращения нежелательных последствий у пациентов с травмами головного мозга и у пациентов с инсультами – **ишемическими и геморрагическими**.

Основной перспективный вывод. Обобщение данных литературы и собственных исследований позволяет сделать следующий вывод. В результате действия регуляторных механизмов – *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала* – в нейронах активируются процессы, способствующие развитию механизмов пластичности, памяти и обучения. При этом не развиваются процессы, характерные для *типового патологического процесса*. Если же они развиваются, то носят локальный характер, без летальных последствий для всего организма. При нарушении *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала* развивается каскад свободно радикальных реакций с участием **$\cdot\text{NO}_2$, пероксинитритов**, вновь распадающихся на **$\cdot\text{NO}_2$ и $\cdot\text{OH}$ -радикалы** вплоть до наступления необратимых изменений в мозге с летальным исходом. Этот основной перспективный вывод хорошо согласуется со многими основополагающими выводами классиков науки. Назовем лишь некоторые из них. «Мы мало считаемся с тем, что все процессы осуществляются циклически, и каждый процесс имеет свою цикличность» (Л.А. Орбели). «Не жизнь в ненормальных условиях, не нарушение как таковое вызывает болезнь, напротив, болезнь начинается с недостаточности регуляторного аппарата» (Р. Вирхов). Поскольку все регулирующие/регулируемые системы построены таким образом, что сигнал с выхода системы поступает на ее вход, и, тем самым, замыкает систему в цикл, то становится понятным важная роль систем с отрицательными и положительными обратными связями, и, роль регуляторных циклов в поддержании всех биохимических, биофизических и физиологических показателей в пределах физиологической нормы.

Работа выполнена при поддержке РАН. Частично она была поддержана грантами РФФИ 17-15-01487 и РФФИ 17-00-00106

Цитируемая литература

1. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980. *Volume*. 288. №5789. P.373–376. DOI: 10.1038/288373a0. PMID: 6253831.
2. Kots A.Y., Martin E., Sharina I.G., Murad F. A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(191):1-14. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_1. PMID: 19089322; PMCID: PMC3932363.
3. Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977. *Volume*. 74. P.3203–3207.
4. Katsuki S., Arnold W., Mittal C., Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium ni-troprussIDE, nitroglycerin and nitric oxIDE in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azIDE and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucl. Res*. 1977. *Volume*. 3. P.23–35.
5. Murad F., Mittal C.K., Arnold W.P., Katsuki S., Kimura H. Guanylate cyclase: activation by azIDE, nitro compounds, nitric oxIDE, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv. Cyclic. Nucl. Res*. 1978. *Volume*. 9. P.145–158.

6. *Moncada S., Higgs E.A.* Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991. Volume. 21. P. 361–374.
7. *Ignarro L.J.* Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* 1989. Volume. 3. P.31–36. PubMedGoogle Scholar
8. *Moncada S.* The first Robert Furchgott lecture: from endothelium-dependent relaxation to the l-arginine:NO pathway. *Blood Vessels.* 1990. Volume. 27. P.208–217.
9. *Kositsyn N.S.* ON THE MODES OF DISTRIBUTION OF THE SYNAPTIC ENDS OF A SEPARATE AXON SYSTEM ON A SINGLE NEURON. *Dokl. Akad Nauk SSSR.* 1964. Volume.159. P.648 – 651. PMID: 14311037
10. *Kositsyn N.S., Eliseeva Z.V.* Axo-dendritic associations of the pyramidal neurons of the sensorimotor cortex in the cat. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1966. Volume. 62. №8. P.101–103. PMID: 4317459.
11. *Kositzyn N.S., Eliseyeva Z.V.* Axo-dendritic relations of the pyramidal neurons of the sensorimotor cortex in the cat. *Brain Res.* 1967. Volume.6. № 3. P. 610–613. DOI: 10.1016/0006-8993(67)90070-4. PMID: 6076260.
12. *Kositsyn N.S.* [Axodendritic connections of the reticular formation of the brain stem in reptiles]. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 1969. Volume.187. №4. P. 942–944. PMID: 5397322.
13. *Kositsyn N.S.* Axodendritic synapses with a subsynaptic stria in the reticular formation of reptiles. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1969. Volume. 189. №6. P.1404-1406. PMID: 5398572
14. *Kositzyn N.S.* Axo-dendritic relations in the brain stem reticular formation. *The Journal of Comparative Neurology.*1964. Volume.122. №1. P.9–17.
15. *Реутов В.П.* Цикл окиси азота в организме млекопитающих // *Успехи биологической химии.* 1995. Т. 35. С. 189–228.
16. *Реутов В.П.* Биохимическое предопределение NO-синтазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота. *Биохимия.* 1999. Т. 64. № 5. С. 634–651.
17. *Реутов В.П.* Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала. *Вестн. РАМН.* 2000. № 4. С. 35–41.
18. *Реутов В.П.* Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности. *Биохимия.* 2002. Т. 67. № 3. С. 353–376.
19. *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.
20. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г.* NO-Синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота. *Биохимия.* 1998. Т. 63. № 7. С.1029–1040.
21. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г.* Проблема оксида азота в биологических системах: от NO-синтазных и нитритредуктазных систем в организме млекопитающих к циклу оксида азота, принципу цикличности и механизмам, лежащих в основе многочисленных заболеваний. *Евразийское Научное Объединение.* 2016. Т.1. №1(13). С.49-55.
22. *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.
23. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С.* Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука. 1998. 156 с.
24. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С., Охотин В.Е.* Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности. Ретроспективный анализ идей, принципов и концепций. Москва: УРСС. 2003. 96 с.
25. *Реутов В.П.* К вопросу о механизме ультраструктурных изменений в центральном звене передачи сигнала между нейронами – синапсе – при обучении, функциональной гипоксии, а также при гипоксии/ишемии, Восстанавливая традиции посмертной славы: памяти Николая Степановича Косицына (16.05.1934 – 19.08.2020) – неорди-

нарного ученого, человека, педагога и популяризатора науки. Евразийское Научное Объединение. 2020. №10 (68). С.183–214.

26. *Kayushin L.P., Reutov V.P., Sorokina E.G., Filippova N.A.* Mechanism of proteins redistribution from soluble to membrain-bound state in mammals cells. FEBS LETTERS: FEBS SPECIAL MEETING BIOLOGICAL MEMBRANES. Abstract books. 1994. P.300.

27. *Sorokina E., Salykina M., Storozhevykh T., Pinelis V., Reutov V.* The role of NO and nitrites in glutamate-induced changes of ATP in cerebellar granular cells. Nitric Oxide. 2009. Volume. 20. Supplement. P.S43.

28. *Sorokina E.G., Reutov V.P., Senilova Y.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. Bull Exp Biol Med. 2007. Volume. 143. (4). P.442 – 445. DOI: 10.1007/s10517-007-0151-6. PMID: 18214295.

29. *Marcaida G, Miñana MD, Grisolia S, Felipe V.* Lack of correlation between glutamate-induced depletion of ATP and neuronal death in primary cultures of cerebellum. Brain Res. 1995 Oct 16;695(2):146-50. doi: 10.1016/0006-8993(95)00703-s. PMID: 8556324.

30. *Bhardwaj A, Northington F.J., Martin L.J., Hanley D.F., Traystman R.J., Koehler R.C.* Characterization of metabotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo. J Cereb Blood Flow Metab. 1997 Feb;17(2):153-60. doi: 10.1097/00004647-199702000-00004. PMID: 9040494.

31. *Yamada K., Nabeshima T.* Modulation of nitric oxide production in vivo in the brain. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 1998. Volume. 20. №7. P.:601–605. DOI: 10.1358/mf.1998.20.7.485725. PMID: 9819805.

32. *Bhardwaj A., Northington F.J., Ichord R.N., Hanley D.F., Traystman R.J., Koehler R.C.* Characterization of ionotropic glutamate receptor-mediated nitric oxide production in vivo in rats. Stroke. 1997. Volume. 28. №4. P.850–856; discussion 856-857. DOI: 10.1161/01.str.28.4.850. PMID: 9099207.

33. *Nicholls D.G., Budd S.L., Ward M.W., Castilho R.F.* Excitotoxicity and mitochondria. Biochem. Soc. Symp. 1999. Volume. 66. P.55–67. DOI: 10.1042/bss0660055. PMID: 10989657.

34. *Efremov Y.M., Grebenik E.A., Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Kotova S.L., Akovantseva A.A., Bakaeva Z.V., Pinelis V.G., Surin A.M., Timashev P.S.* Viscoelasticity and Volume of Cortical Neurons under Glutamate Excitotoxicity and Osmotic Challenges. Biophys J. 2020 Nov 3;119(9):1712-1723. doi: 10.1016/j.bpj.2020.09.022. Epub 2020 Sep 28. PMID: 33086042; PMCID: PMC7677246

35. *Lyeth B.G.* Application of Novel Therapeutic Agents for CNS Injury: NAAG Peptidase Inhibitors. In: Kobeissy FH, editor. Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2015. Chapter 38. PMID: 26269888.

36. *Surin A.M., Gorbacheva L.R., Savinkova I.G., Sharipov R.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G.* Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. Biochemistry (Mosc). 2014. Volume. 79. №2. P.146–157. DOI: 10.1134/S0006297914020084. PMID: 24794730.

37. *Khodorov B.I.* Mechanisms of destabilization of Ca²⁺-homeostasis of brain neurons caused by toxic glutamate challenge. Membr. Cell. Biol. 2000. Volume. 14. №2. P.149 – 162. PMID: 11093577.

38. *Khodorov B.I., Storozhevykh T.P., Surin A.M., Yuryavichyus A.I., Sorokina E.G., Borodin A.V., Vinskaya NP, Khaspekov LG, Pinelis VG.* The leading role of mitochondrial depolarization in the mechanism of glutamate-induced disruptions in Ca²⁺ homeostasis. Neurosci Behav Physiol. 2002. Volume. 32. №5. P.:541–547. DOI: 10.1023/a:1019819925257. PMID: 12403008.

39. *Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Шарипов Р.Р., Ходоров Б.И., Пинелис В.Г.* Исследование изменений [АТФ] в цитозоле индивидуальных нейронов при

развитии глутамат-индуцированной дизрегуляции кальциевого гомеостаза. Биохимия. 2014. Т.79. №2. С.196-208.

40. Сорокина Е.Г., Черненко М.А., Реутов В.П., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Сурин А.М. Гиперстимуляция Glu-рецепторов нейронов мозжечка: влияние NO на уровень АТФ. В сборнике: Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции. под редакцией Е.Л. Глориозова. 2016. С. 140-153.

41. Vergun O., Keelan J., Khodorov B.I., Duchon M.R. Glutamate-induced mitochondrial depolarisation and perturbation of calcium homeostasis in cultured rat hippocampal neurons. J Physiol. 1999. Volume. 519. Pt 2(Pt 2). P.451–466. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1999.0451m.x. PMID: 10457062; PMCID: PMC2269520.

42. Surin A.M., Bolshakov A.P., Mikhailova M.M., Sorokina E.G., Senilova Y.E., Pinelis V.G., Khodorov B.I. Arachidonic acid enhances intracellular [Ca²⁺]_i increase and mitochondrial depolarization induced by glutamate in cerebellar granule cells. Biochemistry (Mosc). 2006 Aug;71(8):864-70. doi: 10.1134/s0006297906080074. PMID: 16978149.

43. Khodorov B, Pinelis V, Vergun O, Storozhevykh T, Vinskaya N. Mitochondrial deenergization underlies neuronal calcium overload following a prolonged glutamate challenge. FEBS Lett. 1996 Nov 18;397(2-3):230-4. doi: 10.1016/s0014-5793(96)01139-8. PMID: 8955353.

44. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. Biochem J. 2011 Apr 15;435(2):297-312. doi: 10.1042/BJ20110162. Erratum in: Biochem J. 2011 Aug 1;437(3):575. PMID: 21726199; PMCID: PMC3076726.

45. Noterman MF, Chaubey K, Lin-Rahardja K, Rajadhyaksha AM, Pieper AA, Taylor EB. Dual-process brain mitochondria isolation preserves function and clarifies protein composition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Mar 16;118(11):e2019046118. doi: 10.1073/pnas.2019046118. PMID: 33836587; PMCID: PMC7980376.

46. Ходоров Б.И., Сторожевых Т.П., Сурин А.М., Сорокина Е.Г., Юравичус А.И., Юородин А.В., Винская Н.П., Хаспеков Л.Г., Пинелис В.Г. Митохондриальная деполяризация играет доминирующую роль в механизме нарушения кальциевого гомеостаза, вызванного глутаматом. Биологические мембраны. 2001. Т.18. С.421.

47. Khodorov B.I., Storozhevykh T.P., Surin A.M., Yuryavichyus A.I., Sorokina E.G., Borodin A.V., Vinskaya N.P., Khaspekov L.G., Pinelis V.G. The leading role of mitochondrial depolarization in the mechanism of glutamate-induced disruptions in Ca²⁺ homeostasis. Neurosci. Behav. Physiol. 2002. Volume. 32. №5. P.541–547. DOI: 10.1023/a:1019819925257. PMID: 12403008.

48. Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca²⁺-дизрегуляции и последующей гибелью нейронов. Патогенез. 2014. Т.12. №4. С.40–46.

49. Сорокина Е.Г., Черненко М.А., Красильникова И.А., Реутов В.П., Пинелис В.Г., Сурин А.М. Влияние ингибирования поли (АДФ-рибозо) полимеразы-1 на уровень внутриклеточного кальция, АТФ и выживаемость культивируемых нейронов мозжечка крысы при гиперстимуляции глутаматных рецепторов. Патогенез. 2018. Т.16. №4. С.168–173.

50. Nicholls D.G. Mitochondria and calcium signaling. Cell Calcium. 2005. Volume 38. №3-4. P.311 – 317. DOI: 10.1016/j.ceca.2005.06.011. PMID: 16087232.

51. Reutov V.P., Azhipa Ya.I., Kaiushin L.P. Oxygen as an inhibitor of hemoglobin nitrite reductase activity. Izv. Akad. Nauk SSSR. Biol. 1983. №3. P. 408–418. PMID: 6875084.

52. Silverman M.E., Upshaw C.B. Jr. Walter Holbrook Gaskell. Clin Cardiol. 2008 Jul;31(7):340-1. doi: 10.1002/clc.20346. PMID: 18636532; PMCID: PMC6653270.

53. Gaskell W.H. On the tonicity of the heart and blood vessels. Journal of Physiology, vol. 3, pp. 48-75, 1880-82. Circ. Res. 1970. Volume. 26. №6. P.742. PMID: 4912435. (Classic pages).

54. *Kositsyn N.S., Babakova L.L., Chunaeva M.Z.* [Histochemical and electron microscopic studies of the presence and distribution of glycogen in reticular formation synapses]. Dokl Akad Nauk SSSR. 1970. V.194. №3. P. 698–700. PMID: 5482690.
55. *Kositsyn N.S.* Ultrastructure of branch nodes of central nervous system dendrites. Dokl Akad Nauk SSSR. 1971. V.200. №1. P.:215–217. PMID: 5117080.
56. *Kositsyn N.S.* Ultrastructural components of the cerebral cortex dendritic spine and their relation to synaptic active zones. Dokl Akad Nauk SSSR. 1973. V.211. №5. P.1199–1201. PMID: 4751323.
57. *Kositsyn N.S., Vorob'ev V.S.* Quantitative analysis of the spatial organization of microtubules in the cytoplasm of dendrites in different areas of the nervous system. Dokl Akad Nauk SSSR. 1973. V.213 №5. P.1181–1183. PMID: 4778360.
58. *Kositsyn N.S., Kolosov N.G.* Ultrastructural aspects of nonsynaptic interactions between neurons (interneuronal transport). Dokl Akad Nauk SSSR. 1976. V.230. №1. P.213–216. PMID: 185029.
59. *Kositsyn N.S.* Ultrastructural basis of trophic interactions in the central nervous system. Arkh Anat Gistol Embriol. 1978. V.74. №5. P.47–53. PMID: 666583.
60. *Kositsyn N.S.* [Endocytosis in the dendrites as a compensatory function of the nerve cells in extreme exposures]. Dokl Akad Nauk SSSR. 1983. Vol. 269. № 5. P.1203–1205. PMID: 6861609.
61. *Kositsyn N.S., Serdiuchenko V.M., Getmantsev S.V.* Reaction of pyramidal neuron apical dendrites in the sensorimotor cortex to prolonged rhythmic electric stimulation of a relay thalamic nucleus. Fiziol Zh. 1983. V.29. №2. P:148–151. PMID: 6840320.
62. *Хиден Х.* Нейрон. В кн.: Функциональная морфология клетки. Сб. статей. Изд-во Иностранной литературы. М. 1963. С.185–260.
63. *Балабан П.М., Захаров И.С.* Обучение и развитие: общая основа двух явлений. М.: Наука.1992. 150 с.
64. *Samosudova N.V., Reutov V.P., Larionova N.P., Kositsyn N.S.* Role of glycogen in processes of cerebellar glial cells under conditions of its damage with sodium nitrite. Bull Exp Biol Med. 2010. V.150. №2: P.247-250. DOI: 10.1007/s10517-010-1116-8. PMID: 21240384
65. *Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.В., Чайлахян Л.М.* Сравнительный анализ пластичности нейро-нейронных и нейро-глиальных инкапсулирующих взаимодействий молекулярного слоя изолированного мозжечка лягушки в условиях избытка L-глутамата и NO-генерирующего соединения. Докл. РАН. 2003. Т. 393. № 5. С. 698–702.
66. *Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.В., Чайлахян Л.М.* Два типа реакции глиальных клеток на стимуляцию параллельных волокон на фоне NO-генерирующего соединения как морфологическое проявление физиологической активности двух типов астроцитов в мозжечке лягушки. Докл. РАН. 2005. Т. 401. № 3. С. 419–423.
67. *Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.В., Чайлахян Л.М.* Glu- и NO-комплементарность межклеточного взаимодействия в главных синапсах изолированного мозжечка лягушки. Морфология. 2006. Т. 129. № 2. С. 53–54.
68. *Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.П., Чайлахян Л.М.* Нейроглиальный химический синапс в мозжечке взрослой лягушки. Докл. РАН. 2010. Т. 432. №2. С. 276–280.
69. *Ларионова Н.П., Самосудова Н.П., Реутов В.П., Чайлахян Л.М.* Сравнительное исследование изменения количественных характеристик структуры молекулярного слоя мозжечка лягушки *Rana Temporaria* под влиянием L-глутамата и NO-генерирующего соединения. Докл. РАН. 1999. Т. 369. № 6. С. 836 – 839.
70. *Ларионова Н.П., Самосудова Н.В., Реутов В.П., Чайлахян Л.М.* Сравнительное исследование изменений структуры нейрон-нейронного взаимодействия в молекуляр-

ном слое мозжечка под влиянием L-глутамата и NO-генерирующего соединения. Докл. РАН. 2001. Т. 376. № 5. С. 701–706.

71. Самосудова Н.В., Реутов В.П. Ультраструктурные изменения мозга лягушки в присутствии высоких концентраций глутамата и NO-генерирующего соединения. Биофизика. 2018. Т.63. №3. С.528–543.

72. 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.

73. Самосудова Н.В., Ларионова Н.П., Реутов В.П., Чайлахян Л.М. Изменение молекулярного слоя мозжечка лягушки *Rana temporaria* под влиянием NO-генерирующего соединения. Докл. РАН СССР. 1998. Т. 361. № 5. С. 704–708.

74. Самосудова Н.В., Реутов В.П. Аутотипические септальные контакты глиальных клеток мозжечка как компенсаторно-приспособительная реакция в условиях токсического воздействия глутамата и NO-генерирующего соединения // Биологические мембраны. 2013. Т.30. № 1. С.14-20.

75. Самосудова Н.В., Реутов В.П. Пластические перестройки ультраструктуры мозжечка при токсическом воздействии глутамата и NO-генерирующего соединения. Морфология. 2015. Т.148. №5. С. 32-37.

76. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Крушинский А.Л. и др. Влияние двигательной активности на ультраструктуру нейронов мозжечка, неврологические нарушения и выживаемость крыс линии Крушинского—Молодкиной при развитии у них геморрагического инсульта. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2012. Т. 153. № 6. С. 806–811.

77. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Оксид азота как модулятор контрастности основных элементов цитоскелета. Цитология. 2000. Т. 42. № 1. С. 72–78.

78. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Нейрон-глиальные взаимодействия в условиях повреждения нейронной сети мозжечка под влиянием глутамата и оксида азота. Известия ТГРУ. 2001. № 4. С. 369–370.

79. 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.

80. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Изменение ультраструктуры синаптических пузырьков глутаматергических синапсов под воздействием NO-генерирующего соединения NaNO_2 . Бюл. эксперим. биол. и мед. 2008. Т. 146. № 7. С. 13 – 17.

81. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Роль гликогена отростков глиальных клеток мозжечка в условиях его повреждения нитритом натрия. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2010. Т. 150. № 8. С. 212–215.

82. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Слияние клеток-зерен мозжечка лягушки при токсическом воздействии глутамата и NO-генерирующего соединения. Морфология. 2011. Т.140. № 4. С. 13–17.

83. Samosudova N., Reutov V. Neuron-glia interaction under NO-injury in the frog cerebellum. Nitric Oxide. 2009. V.20. Supplement. P. S42-S43.

84. Samosudova N.V., 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. №7. P.843-848.

85. Samosudova N.V., Reutov V.P. Ultrastructural Changes in the Frog Brain in the Presence of High Concentration of Glutamate and an NO-Generating Compounds. Biophysics. 2018. V.63. №3. P. 402–415. DOI: 10.1134/S0006350918030211.

86. Reutov V.P., Samosudova N.V., Sorokina E.G. A Model Glutamate Neurotoxicity and Mechanisms of the Development of the Typical Pathological Process. Biophysics. 2019. V.64. №2. P. 233 – 250. DOI: 10.1134/S0006350919020143.

87. *Samosudova N.V., Reutov V.P.* Plastic reorganization of the ultrastructure of synapses in the cerebellum due to toxic effects of glutamate and NO-generating compound. *Morfologiya*. 2015. 148 (5): 32-37. PMID: 26987215.

88. *Samosudova N., Reutov V., Krushinsky A., Kuzenkov V., Sorokina E.* The ultrastructure of cerebellar neurons of the rat Krushinsky-Molodkina strains in dependent of locomotor activity during development of hemorrhagic stroke. *Nitric Oxide*. 2013. 31. S Fifth International Meeting on the Role of Nitrite and Nitrate in Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics being held in Pittsburgh, PA on May 4-6, 2013.

89. *Samosudova N.V., Reutov V.P., Larionova N.P.* Fusion of frog cerebellar granule cells induced by toxic effects of glutamate and NO-generating compound. *Morfologiya*. 2011;140(4):13-17. PMID: 22171426.

90. *Samosudova N.V., Reutov V.P., Larionova N.P.* Role of glycogen in processes of cerebellar glial cells under conditions of its damage with sodium nitrite. *Bull Exp Biol Med*. 2010. 150(2):247-250. PMID: 21240384.

91. *Larionova N.P., Reutov V.P., Samosudova N.V., Chailakhyan L.M.* Neuroglial chemical synapses in the cerebellum of adult frog. *Dokl Biol Sci*. 2010 May-Jun;432:171-175. doi: 10.1134/S0012496610030026. PMID: 20665146.

92. *Samosudova NV, Reutov VP, Larionova NP.* Effect of NO-generating compound NaNO_2 on ultrastructure of synaptic vesicles of glutamatergic synapses. *Bull Exp Biol Med*. 2008. 146(1):9-13. PMID: 19145337.

93. *Samosudova N.V., Reutov V.P., Larionova N.P., Chailakhyan L.M.* Neuron-glial contacts formed in the cerebellum during electrical stimulation in the presence of an NO-generating compound. *Neurosci. Behav. Physiol*. 2008. 38(4):363-368. doi: 10.1007/s11055-008-0051-x. PMID: 18401727.

94. *Samosudova N.V., Reutov V.P., Larionova N.P., Chailakhian L.M.* Neuron-glial junction formation in cerebellum after electrical stimulation in presence of no-generating substance. *Morfologiya*. 2007.131(2):53-58. PMID: 17583010.

95. *Samosudova NV, Reutov VP, Larionova NP, Chailakhian LM.* Protective role of autotypic contacts under cerebellar neural net injury by toxic doses of NO-generative compounds. *Tsitologiya*. 2005.47 (3):214-219. PMID: 16706165.

96. *Larionova N.P., Reutov V.P., Samosudova N.V., Chailakhian L.M.* Two types of reactions of glial cells to the stimulation of parallel fibers in the presence of an NO-generating compound as a morphological expression of the physiological activity of two types of astrocytes in the frog cerebellum. *Dokl Biol Sci*. 2005. 401:95-99. PMID: 16003867.

97. *Larionova N.P., Reutov V.P., Samosudova N.V., Chailakhyan LM.* Comparative analysis of plasticity of neuro-neuronal and neuroglial encapsulating interactions of molecular layer of isolated frog cerebellum exposed to excess L-glutamate and NO-generating compound. *Dokl Biol Sci*. 2003. 393:515-519. PMID: 14994538.

98. *Samosudova N.V., Reutov V.P., Larionova N.P.* Nitric oxide as a contrast modulator of basic elements of the cytoskeleton. *Tsitologiya*. 2000.42(1):72-78. PMID: 10709256

99. *Samosudova N.V., Larionova N.P., Reutov V.P., Chailakhian L.M.* Changes in the structure of molecular layer of the *Rana temporaria* cerebellum after exposure to NO-generating compounds. 1. Impairment of integrity of membranes of cerebellar parallel fibers and buds and their fusion. *Dokl Akad Nauk*. 1998. 361(5):704-708. PMID: 9785021.

100. *Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.В., Чайлахян Л.М.* Сравнительный анализ пластичности нейро-нейронных и нейро-глиальных инкапсулирующих взаимодействий молекулярного слоя изолированного мозжечка лягушки в условиях избытка L-глутамата и NO-генерирующего соединения. *Докл. РАН*. 2003. Т. 393. № 5. С. 698–702.

101. *Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.В., Чайлахян Л.М.* Два типа реакции глиальных клеток на стимуляцию параллельных волокон на фоне NO-генерирующего соединения как морфологическое проявление физиологической актив-

ности двух типов астроцитов в мозжечке лягушки. Докл. РАН. 2005. Т. 401. № 3. С. 419–423.

102. *Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.В., Чайлахян Л.М.* Glu- и NO-комплементарность межклеточного взаимодействия в главных синапсах изолированного мозжечка лягушки. Морфология. 2006. Т. 129. № 2. С. 53–54.

103. *Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.П., Чайлахян Л.М.* Нейроглияльный химический синапс в мозжечке взрослой лягушки. Докл. РАН. 2010. Т. 432. №2. С. 276–280.

104. *Ларионова Н.П., Самосудова Н.П., Реутов В.П., Чайлахян Л.М.* Сравнительное исследование изменения количественных характеристик структуры молекулярного слоя мозжечка лягушки *Rana temporaria* под влиянием L-глутамата и NO-генерирующего соединения. Докл. РАН. 1999. Т. 369. № 6. С. 836 – 839.

105. *Ларионова Н.П., Самосудова Н.В., Реутов В.П., Чайлахян Л.М.* Сравнительное исследование изменений структуры нейрон-нейронного взаимодействия в молекулярном слое мозжечка под влиянием L-глутамата и NO-генерирующего соединения. Докл. РАН. 2001. Т. 376. № 5. С. 701–706.

106. *Сорокина Е.Г., Пинелис В.Г., Базарная Н.А. и др.* Нейроиммунологические аспекты острого и отдаленного периода черепно-мозговой травмы. Нейроиммунология. 2005. Т.3. №2. С. 152-153.

107. *Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Винская Н.П. и др.* Частичное ингибирование цитохромоксидазы митохондрий в нейронах мозжечка защищает их от повреждений при действии токсических доз глутамата и нитрита. Вести национальной академии наук Беларуси. Серия медико-биологических наук. 2003. №2. С.59-63.

108. *Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Гранстрем О.К. и др.* Возможная роль оксида азота в повреждении глутаматных рецепторов при эпилепсии. Вести национальной академии наук Беларуси. Серия медико-биологических наук. 2002. № 1. С.18–22.

109. *Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Гранстрем О.К. и др.* Изучение механизмов образования аутоантител при эпилепсии и гипоксии. Нейроиммунология. 2003. Т. 1. № 2. С. 137–138.

110. *Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Пинелис В.Г., Коршунова Т.С.* Взаимосвязь между содержанием окиси азота, циклического гуанозинмонофосфата и эндотелина в крови при нитритной гипоксии. Успехи физиологических наук. 1994. Т.25. №4. С.70-71.

111. *Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Пинелис В.Г. и др.* Роль оксида азота в образовании аутоантител к рецепторам глутамата. Нейроиммунология. 2002. Т.1. №1. С.267–269.

112. *Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Пинелис В.Г. и др.* Механизм потенцирующего действия альбумина при токсическом воздействии глутамата: возможная роль окиси азота. Биологические мембраны 1999. Т. 16. № 3. С. 318–323.

113. *Сорокина Е.Г., Реутов В.П., Сенилова Я.Е. и др.* Изменение содержания АТФ в зернистых клетках мозжечка при гиперстимуляции глутаматных рецепторов: возможное участие NO и нитритных ионов. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2007. №4. С. 419-422.

114. *Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Гранстрем О.К. и др.* Белок S100B и аутоантитела к нему в диагностике повреждений мозга при черепно-мозговой травме у детей. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010. Т. 110. № 8. С. 25–30.

115. *Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Алатырцев В.В. и др.* Нейромаркеры и аутоантитела к нейрофункциональным белкам в оценке тяжести и прогноза черепно-мозговой травмы у детей. Аллергология и иммунология. 2009. Т. 10. № 2. С. 280–281.

116. *Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Базарная Н.А. и др.* Аутоантитела к рецепторам глутамата и продукты метаболизма оксида азота в сыворотке крови детей в остром периоде черепно-мозговой травмы. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008. Т. 108. № 3. С. 67-72.

117. *Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Гранстрем О.К. и др.* Белок S100B и аутоантитела к нему в диагностике повреждений мозга при черепно-мозговой травме у детей. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010. Т. 110. № 8. С. 25–30.
118. *Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Карасева О.В. и др.* Повреждение и регенерация мозга при легкой и тяжелой черепно-мозговой травме у детей. В сборнике: Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции: Весенняя сессия. Под ред. Е.Л. Глориозова 2015. С.139-144.
119. *Реутов В.П., Черток В.М.* Новые представления о роли вегетативной нервной системы и систем генерации оксида азота в сосудах мозга. Тихоокеанский медицинский журнал. 2016. №2. С. 10-20.
120. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Самосудова Н.В., Захарчук Н.В.* Гемодинамика мозга: глутаматергическая система и цикл оксида азота в регуляции мозгового кровотока. Новая концепция. Тихоокеанский медицинский журнал. 2017. №3. С.38 – 46. DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.3.00–00.
121. *Han B.C., Koh S.B., Lee E.Y., Seong Y.H.* Regional difference of glutamate-induced swelling in cultured rat brain astrocytes. Life Sci. 2004. Volume. 76. №5. P.573–583. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.07.016. PMID: 15556169.
122. *Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA.* Astroglia in CNS injury. Glia. 1991;4(2):233-43. doi: 10.1002/glia.440040215. PMID: 1827781.
123. *Schneider GH, Baethmann A, Kempfski O.* Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. Can J Physiol Pharmacol. 1992;70 Suppl:S334-343. doi: 10.1139/y92-280. PMID: 1363532.
124. *MacAulay N.* Molecular mechanisms of brain water transport. Nat Rev Neurosci. 2021 Apr 12. doi: 10.1038/s41583-021-00454-8. Epub ahead of print. PMID: 33846637.
125. *Azhipa Ia.I., Filiashina G.A., Reutov V.P., Emel'ianenko I.* 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.
126. *Andrianov V.V., Pashkevich S.G., Yafarova G.G., Denisov A.A., Iyudin V.S., Bogodvid T.Kh., Dosina M.O., Kulchitsky V.A., Gainutdinov Kh.L.* Changes of Nitric Oxide Content in the Rat Hippocampus, Heart and Liver in Acute Phase of Ischemia. Appl. Magn. Reson. 2016. Volume. 47. P. 965–976. DOI 10.1007/s00723-016-0815-3
127. *Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S., Golubeva A.V., Davydova M.P., Jafarova G.G., Andrianov V.V., Koshelev V.B.* EPR Study of the Intensity of the Nitric Oxide Production in Rat Brain After Ischemic Stroke. Applied Magnetic Resonance. 2011. Vol. 40. P.267–278. DOI 10.1007/s00723-011-0207-7
128. *Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Яфарова Г.Г., Базан Л.В., Богодвид Т.Х., Пашкевич С.Г., Досина М.О., Замаро А.С., Денисов А.А., Кульчицкий В.А.* Изменение содержания оксида азота и меди в печени и гиппокампе крыс после моделирования ишемии головного мозга. Журнал технической физики, 2020, Т. 90, №9. С.1481–1486. DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49679.432-19.
129. *Barros C.D.S., Livramento J.B., Mouro M.G., Higa E.M.S., Moraes CT, Tengan CH.* L-Arginine Reduces Nitro-Oxidative Stress in Cultured Cells with Mitochondrial Deficiency. Nutrients. 2021 Feb 6;13(2):534. doi: 10.3390/nu13020534. PMID: 33562042; PMCID: PMC7914615.
130. *Böger R.H.* The pharmacodynamics of L-arginine. J Nutr. 2007. №6. P.137(Suppl 2):1650S-1655S. doi: 10.1093/jn/137.6.1650S. PMID: 17513442.
131. *Böger R.H.* The pharmacodynamics of L-arginine. Altern. Ther. Health Med. 2014. Volume 20. № 3. P.48–54. PMID: 24755570.
132. *Kabaroglu C., Akisu M., Habif S., Mutaf I., Turgan N., Parildar Z., Ozmen D., Bayindir O.* Effects of L-arginine and L-carnitine in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal

injury. *Pediatr Int.* 2005. Volume. 47. №1. P.10–14. DOI: 10.1111/j.1442-200x.2005.01999.x. PMID: 15693859.

133. Балабан П.М. Молекулярные механизмы модификации памяти // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2017. Т.67. №2. С. 131–140.

134. Балабан П.М. Принципы взаимодействия нейронов в мозге: взгляд физиолога // *Нейрокомпьютеры: разработка, применение.* 2017. №7. С.3–8.

135. Малышев А.Ю., Балабан П.М. Больше света на мозг: 30 лет спустя // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2017. Т.67. №5. С. 3–8.

136. Балабан П.М., Коршунова Т.А. Сетевые, клеточные и молекулярные механизмы пластичности в простых нервных системах. *Успехи физиологических наук.* 2011. Т.42. №4. С. 3–19.

137. Балабан П.М., Роцин М.В., Коршунова Т.А. Двуликый оксид азота необходим и для стирания и для формирования памяти. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 2011. Т.61. №3. С.274–280.

138. Bal N.V., Rysakova M.P., Vinarskaya A.K., Ivanova V., Zuzina A.B., Balaban P.M. Cued memory reconsolidation in rats requires nitric oxide. *European Journal of Neuroscience.* 2017. Volume. 45. № 5. P. 643–647.

139. Maltsev A.V., Bal N.V., Balaban P.M. LTP suppression by protein synthesis inhibitors is NO-dependent. *Neuropharmacology.* 2019. Volume.146. P. 276–288.

140. Reutov V.P., Azhipa Ya.I., Kaiushin L.P. Oxygen as an inhibitor of hemoglobin nitrite reductase activity. *Izv. Akad. Nauk SSSR. Biol.* 1983. №3. P.408–418. PMID: 6875084.

141. Cosby K., Partovi K.S., Crawford J.H., et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 2003. Volume. 9. P.1498–1505.

142. Reutov V.P., Sorokina E.G., Shvaley V.N., Kosmachevskaya O.V., Krushinskiy A.L., Kuzenkov V.S., Svinov M.M., Kositsyn N.S. The possible role of nitrogen dioxide produced in the field of bifurcation of vessels, in the processes of their damage in hemorrhagic strokes, and the formation of atherosclerotic plaques. *Usp Fiziol Nauk.* 2012. V.43. №4. P.73–93. PMID: 23227723.

143. Reutov V.P., Okhotin V.E., Shuklin A.V., Sorokina E.G., Kositsyn N.S., Gurin V.N. Nitric oxide (NO) and NO cycle in myocardium: molecular, biochemical and physiological aspects. *Usp Fiziol Nauk.* 2007. V.38. №4. P.39–58. PMID: 18064907.

144. Реутов В.П. Изучение механизмов восстановления нитритных ионов в окись азота в крови и митохондриях печени млекопитающих: Автореф. ... дис. канд. биол. наук. М: Московский Ордена Ленина, Ордена Октябрьской революции и Ордена Трудового Красного Знамени Государственный Университет имени М.В. Ломоносова. Биологический факультет. 1988. 18 с.

145. Реутов В.П. Исследование механизмов регуляторного и токсического действия нитритов и NO-генерирующих веществ в биологических системах: Автореф. дис. докт. биол. наук. М.: Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. 2004. 79 с.

146. Реутов В.П. О Л.А. Блюменфельде – ученом, педагоге, поэте и человеке и о проблеме оксида азота, начало которой было положено в его лаборатории. *Успехи физиологических наук.* 2003. Т.34. №2. С. 103–128.

147. Реутов В.П. Роль гемсодержащих белков в системах внутриклеточной сигнализации в норме и при инсультах. *Евразийское научное объединение.* 2015. Т.1. №11. С.57–63.

148. Реутов В.П., Байдер Л.М., Куроптева З.В. и др. Экспериментальный геморрагический инсульт: влияние пептидного препарата кортексина на образование Hb-NO комплексов и других парамагнитных центров в крови // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2011. Т. 111. № 8. Вып. 2. С. 56–61.

149. *Реутов В.П., Гоженко Е.А., Охотин В.Е. и др.* Роль оксида азота в регуляции работы миокарда: цикл оксида азота и NO-синтазные системы в миокарде // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2007. Т. 10. №4. С. 89–112.
150. *Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г.* Физиологическая роль цикла окиси азота в организме человека и животных // Физиология человека. 1994. Т.20. №3. С.165-174.
151. *Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г.* Цикл окиси азота как адаптационный механизм при гипоксии организма // Успехи физиологических наук. 1994. Т.25. №4. С.36.
152. *Реутов В.П., Шехтер А.Н.* Как в XX в. физики, химики и биологи отвечали на вопрос: что есть жизнь? Успехи физических наук. 2010. Т.180. №4. С.393–414.
153. *Reutov V.P., Schechter A.N.* How in the XXth century physics, chemists and biologists answered the question: what is life? *Physics-USpekhi*. 2010. Volume. 53. Number. P.377–396.
154. *Reutov V.P., Sorokina E.G., Sukmansky O.I.* Cycles of Nitric Oxide (NO), Super Oxide Radical Anion (O_2^-) and Hydrogen Sulfur/Sulfur Dioxide ($\text{H}_2\text{S}/\text{SO}_2$) in mammals. *Curr. Res. Biopolymers*. 2020. 2: 112. DOI: 10.29011/CRBR-112.000012.
155. *Lundberg J.O., Gladwin M.T., Ahluvalia A. et al.* Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat. Chem. Biol*. 2009. Volume. 5. Number 12. P.865–869. DOI: 10.1038/nchembio.260. PMID: 19145337.
156. *Khan MA, Alam K, Zafaryab M, Rizvi MMA.* Peroxynitrite-modified histone as a pathophysiological biomarker in autoimmune diseases. *Biochimie*. 2017 Sep;140:1-9. doi: 10.1016/j.biochi.2017.06.006. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28619676.
157. *Tejero J, Shiva S, Gladwin MT.* Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):311-379. doi: 10.1152/physrev.00036.2017. PMID: 30379623; PMCID: PMC6442925.
158. *Schulman IH, Hare JM.* Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. Volume. 1820. №6. P.752–762. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.04.002. Epub 2011 Apr 16. PMID: 21536106; PMCID: PMC5509026.
159. *Ahsan H.* 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol*. 2013. Volume. 74. №10. P.1392–1399. doi: 10.1016/j.humimm.2013.06.009. Epub 2013 Jun 15. PMID: 23777924.
160. *deBoer T.R., Palomino R.I., Mascharak P.K.* Peroxynitrite-Mediated Dimerization of 3-Nitrotyrosine: Unique Chemistry along the Spectrum of Peroxynitrite-Mediated Nitration of Tyrosine. *Med One*. 2019. 4:e190003. DOI: 10.20900/mo.20190003. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30972371; PMCID: PMC6453144.
161. *Ahmad R., Hussain A., Ahsan H.* Peroxynitrite: cellular pathology and implications in autoimmunity. *J Immunoassay Immunochem*. 2019. Volume. 40. №2. P.123–138. DOI: 10.1080/15321819.2019.1583109. PMID: 30843753.
162. *Love S.* Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol*. 1999. Volume. 9. №1. P.119–131. PMID: 9989455.
163. *Love S.* Apoptosis and brain ischaemia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2003. Volume. 27. №2. P.267–282. DOI: 10.1016/S0278-5846(03)00022-8. PMID: 12657366.
164. *Akamatsu Y, Hanafy KA.* Cell Death and Recovery in Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*. 2020. Volume. 17. №2. P.446–456. DOI: 10.1007/s13311-020-00840-7. PMID: 32056100; PMCID: PMC7283441.
165. *Sorokina E.G., Reutov V.P., Senilova Ya.E., Khodorov B.I., Pinelis V.G.* Changes in ATP content in cerebellar granule cells during hypers stimulation of glutamate receptors: possible role of NO and nitrite ions. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2007. Volume. 143. №4. P. 442–445.

166. *Krushinsky A.L., Kuzenkov V.S., Dyakonova V.E., Reutov V.P.* “Inhibitors of neuronal and inducible nitric oxide synthase enhance the protective effect of short-term adaptation to hypoxia in Krushinsky-Molodkina rats”. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 2015. Volume. 42. №1. P. 67 - [doi](https://doi.org/10.1134/S1062359015010057) : 10.1134/S1062359015010057. [WEB OF SCIENCE™](#)
167. *Kuzenkov V.S., Krushinskii A.L., Reutov V.P.* Effect of cation type and concentration of nitrates on neurological disorders during experimental cerebral ischemia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. Volume. 155. №6. P.748–751. PMID: 24288757.
168. *Salykina M.A., Sorokina E.G., Krasilnikova I.A., Reutov V.P., Pinelis V.G.* Effects of selective inhibitors of neuronal and inducible NO-synthase on ATP content and survival of cultured rat cerebellar neurons during hyperstimulation of glutamate receptors. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. Volume. 155. №1. P.40–43. PMID: 23667868.
169. *Kuzenkov V.S., Krushinskii A.L., Reutov V.P.* The effect of nitrates on the outcome of acute experimental ischemic stroke. *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S.S. Korsakova.* 2012. Volume. 112. №12. Pt. 2. P.35–39. PMID: 23388604.
170. *Krushinskii A.L., Kuzenkov V.S., D'yakonova V.E., Reutov V.P.* Effect of inhibitors of inducible and neuronal NO synthases on the development of audiogenic stress-induced damage in Krushinskii-Molodkina rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2010. Volume. 150. №1. P.32–35. DOI: 10.1007/s10517-010-1060-7.
171. *Fadiukova O.E., Kuzenkov V.S., Reutov V.P., Krushinskii A.L., Buravkov S.V., Koshelev V.B.* Antistress and angioprotective influence of nitric oxide in epilepsy-prone rats of Krushinskii-Molodkina strain. *Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* 2005. Volume. 91. №1. P. 89–96. PMID: 15773584
172. *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. Volume. 143. №4. P. 442–445.
173. *Kuzenkov V.S., Krushinskii A.L., Reutov V.P.* Effect of cation type and concentration of nitrates on neurological disorders during experimental cerebral ischemia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. Volume. 155. №6. P.748–751. PMID: 24288757.
174. *Salykina M.A., Sorokina E.G., Krasilnikova I.A., Reutov V.P., Pinelis V.G.* Effects of selective inhibitors of neuronal and inducible NO-synthase on ATP content and survival of cultured rat cerebellar neurons during hyperstimulation of glutamate receptors. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. Volume. 155. №1. P.40–43. PMID: 23667868.
175. *Kuzenkov V.S., Krushinskii A.L., Reutov V.P.* The effect of nitrates on the outcome of acute experimental ischemic stroke. *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S.S. Korsakova.* 2012. Volume. 112. (№12. Pt 2). P.35–39. PMID: 23388604.
176. *Krushinskii A.L., Kuzenkov V.S., D'yakonova V.E., Reutov V.P.* Inhibitors of neuronal and inducible NO-synthases enhance the effect of short-term adaptation to hypoxia in rats of Krushinsky-Molodkina strain. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2015. №1. P. 77–84. PMID: 25872403.
177. *Samosudova N.V., Reutov V.P.* Plastic reorganization of the ultrastructure of synapses in the cerebellum due to toxic effects of glutamate and NO-generating compound // *Morfologiya.* 2015. Volume. 148. №5. P. 32–37. PMID: 26987215.
178. *Krushinsky A.L., Kuzenkov V.S., Dyakonova V.E., Reutov V.P.* Inhibitors of neuronal and inducible nitric oxide synthase enhance the protective effect of short-term adaptation to hypoxia in Krushinsky-Molodkina rats. *Biol Bull Russ Acad Sci*, 42:1 (2015). 67 [doi](https://doi.org/10.1134/S1062359015010057) :10.1134/S1062359015010057. [WEB OF SCIENCE™](#)
179. *Krushinskii A.L., Kuzenkov V.S., D'yakonova V.E., Reutov V.P.* The influence of inhibitors of neuronal and inducible NO-synthases on experimental hemorrhagic stroke // *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S.S. Korsakova.* 2014;114 (8 Pt 2):21-27. PMID:25345640.

180. *Есипов Д.С., Горбачева Т.А., Реутов В.П.* Влияние умеренной гипоксии на изменение уровня 8-оксо-dG в ДНК, выделенной из печени крыс в присутствии кортексина и нитритов // Физиологический журнал (Киев). 2008. Т.54. №4. С. 68.

181. *Есипов Д.С., Есипова О.В., Зиневич Т.В. и др.* Анализ содержания 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в ДНК клеток мозга крыс при изучении защитного действия кортексина // Вестник МИТХТ. 2012. Т.7. № 1. С. 59-63.

182. *Есипов Д.С., Сидоренко Е.В., Есипова О.В. и др.* Определение отношения 8-оксо-2'-дезоксигуанозина к 2'-дезоксигуанозину в ДНК с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ в сочетании с амперометрической детекцией. Вестник МИТХТ. 2010. Т.5. №3. С.69-74.

183. *Реутов В.П., Самосудова Н.В., Филиппова Н.А. и др.* Кортексин и нитрит в сочетании с кортексином уменьшают отек и разрушение нейронов мозжечка при геморрагическом инсульте. Докл. РАН. 2009. Т.426. №3. С.410-413.

184. *Реутов В.П., Самосудова Н.В., Филиппова Н.А. и др.* Нитрит в сочетании с кортексином и кортексин уменьшают отек и разрушение нейронов мозжечка при геморрагическом инсульте. Нейроиммунология. 2009. Т.7. №1. С.88-89.

185. *Реутов В.П., Самосудова Н.В., Филиппова Н.А. и др.* Кортексин и нитрит в сочетании с кортексином уменьшают отек и разрушение нейронов мозжечка при геморрагическом инсульте. Докл. РАН. 2009. Т.426. №3. С.410-413.

Сведения об авторах

Валентин Палладиевич Реутов

д-р биол. наук, вед. науч. сотр.

Эл. почта: valentinreutov@mail.ru

ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Москва, РФ

Елена Геннадьевна Сорокина

канд. биол. наук, вед. науч. сотр.

Эл. почта: sorokelena@mail.ru

ФГАУ Национальный научно-практический центр здоровья детей Министерства здравоохранения РФ

Москва, РФ

Information about authors

Valentin Palladievich Reutov

PhD, Doct. Biol Sci., Leading Researcher

E-mail: valentinreutov@mail.ru

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS;

Moscow, Russia

Elena Gennad'evna Sorokina

PhD, Leading Researcher

E-mail: sorokelena@mail.ru

National scientific-practical center of children's health of the Ministry of health of the RF

Moscow, Russia

УДК 546.72-06 +546.72+548.3

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.22

Н.А. Санина

ФГБУН Институт проблем химической физики РАН

МИМЕТИКИ НИТРОЗИЛЬНЫХ ФЕРРЕДОКСИНОВ – ИНГИБИТОРЫ ФОСФОДИЭСТЕРАЗ: СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И АКТИВНОСТЬ *IN VITRO*

В работе представлены и обсуждаются экспериментальные данные по синтезу, исследованию строения и свойств в твердой фазе и в растворах новых низкомолекулярных динитрозильных комплексов железа с *N,S*-лигандами ряда 1,2,4-*H*-триазола семейства “*g*=2.03” – доноров оксида азота (NO), как эффективных ингибиторов фосфодиэстераз цГМФ.

Ключевые слова: монооксид азота, динитрозильные комплексы железа, 3-меркапто-1,2,4-триазолфосфодиэстеразы цГМФ, рентгеноструктурный анализ, Мессбауэровская спектроскопия, ЭПР спектроскопия, амперометрия, электроспрей масс-спектрометрия.

NITROSYL FERREDOXINES MIMETICS AS PHOSPHODIESTERASE INHIBITORS: SYNTHESIS, STRUCTURE AND ACTIVITY *IN VITRO*

The paper presents and discusses experimental data on the synthesis, study of the structure and properties in the solid phase and in solutions of new low-molecular-weight iron dinitrosyl complexes with N,S-ligands of the 1,2,4 -1-H-triazole N,S-ligands of the "g = 2.03" family, nitric oxide (NO) donors, and effective inhibitors of cGMP phosphodiesterases.

Keywords: *nitrogen monoxide, dinitrosyl iron complexes, 3-mercapto-1,2,4-triazole, cGMP, phosphodiesterase, X-ray structural analysis, Mössbauer spectroscopy, EPR spectroscopy, amperometry, electrospray mass spectrometry.*

Введение

Регулярное пополнение семейств терапевтических агентов подразумевает создание и развитие принципиально новых стратегий, направленных на активный поиск эффективных иммуотропных лекарств, действующих через различные клеточные факторы и изменяющих внутриклеточные сигнальные пути. Вторичные мессенджеры - циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) и циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), являются сигнальными молекулами, изменение уровня которых вызывает различные клеточные эффекты в ряду патологий центральной нервной системы, сердечно-сосудистой системы, воспалительных процессов, процессов, влияющих на клеточный цикл, пролиферацию и др. Единственными известными отрицательными регуляторами циклических нуклеотидов являются семейства ферментов, называемых фосфодиэстеразами (PDE), которые гидролизуют циклические нуклеотиды в аденозинмонофосфат (АМФ) или гуанозинмонофосфат (ГМФ). Циклические нуклеотидные фосфодиэстеразы (PDE) представляют собой важный класс ферментов, играющий основную роль в контроле сигнала на различных уровнях фосфорилирования и взаимодействия белок/белок, что определяет их важную роль в иммунных реакциях и в контроле воспалительных процессов. Известно, что уровень циклических нуклеотидов в клетке контролируется также через активацию фермента гуанилатциклазы другой сигнальной молекулой – оксидом азота (NO), который можно регулировать с помощью введения внешних доноров NO. В последнее десятилетие растет интерес к поиску малотоксичных и водорастворимых экзогенных доноров NO, комплементарных человеческому организму, которые могут легко доставлять NO к биологическим мишеням. Дизайн соединений, содержащих природный $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ фрагмент, становится все более важным в связи с обнаружением их важных свойств для медицины [1]. Показана их активность как вазодилляторов, противовоспалительных агентов, химиотерапевтических антинеопластических соединений – индукторов апоптоза опухолевых клеток человека различного гистогенеза, антибактериальных агентов, активность которых сравнима и/или превышает таковую для использующихся в клинике антибиотиков.

В качестве лигандов для синтеза ДНКЖ, в основном, используются алифатические и ароматические тиолы. ДНКЖ на основе меркаптотриазолов практически не известны. Однако, полученные нами ранее данные показывают, что комплексы на основе меркаптотриазола обладают PDE ингибирующей активностью [2]. Меркаптотриазолы, являясь ингибиторами фосфодиэстеразы PDE4, вызывают функциональные ответы в воспалительных клетках, например, подавляют продукцию $\text{TNF}\alpha$ [3,4], эффективно ингибируют активацию эозинофилов *in vitro*, что дает основание проводить многочисленные исследования по разработке ингибиторов PDE4 [5-8] и PDE7 [9] в качестве противовоспалительных препаратов для лечения астмы и хронической обструктивной болезни легких. Известны меркаптотриазолы с двойным: противовоспалительным и ингибирующим, действием на PDE1, демонстрирующие терапевтический эффект при болезни

Паркинсона и др. [10]. Таким образом, меркаптотриазолы могут быть перспективны для создания новых ингибиторов фосфодиэстераз, и в составе молекулы ДНКЖ могут проявлять синергизм противоинфекционных, противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств

Цель работы состояла в разработке методов синтеза и исследовании физико-химических характеристик ранее неизвестных типов ДНКЖ с 1,2,4-триазол-тиолами в твердой фазе и в растворах, включая теоретическое и экспериментальное исследование их PDE ингибирующей активности.

Синтез димеров ДНКЖ (далее – соединения **1-9**) осуществляли по схеме 1. Все операции по приготовлению, смешиванию и хранению растворов проводили в атмосфере аргона.

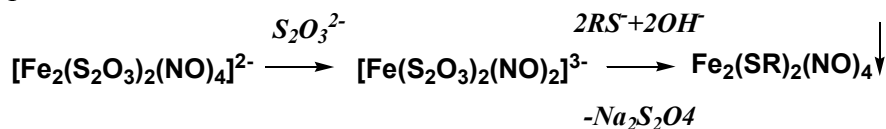
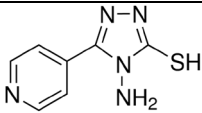
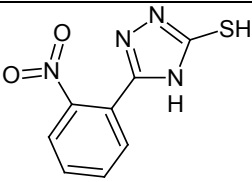
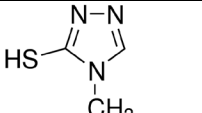
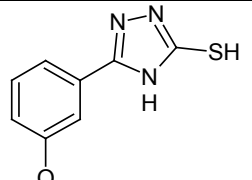
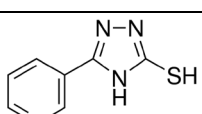
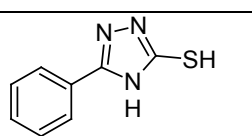
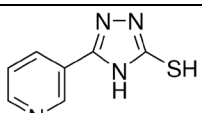
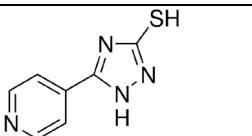
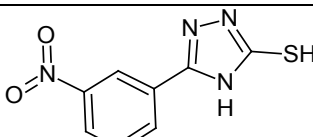


Схема 1

В результате проделанной работы получено девять новых соединений при использовании в качестве исходных лигандов как коммерческих меркаптотриазолов (Sigma-Aldrich, США) (ДНКЖ **1-4**, **9** в таблице 2, лиганды **L1**, **L2**, **L3**, **L9**, соответственно), так и синтезированных на этапе 2020 года (ДНКЖ **5-8** в таблице 1, лиганды **L5-L8**, соответственно).

Таблица 1 – Характеристики димеров ДНКЖ на основе N,S-лигандов ряда 1,2,4-триазола

Соединение	Структура лиганда	Соединение	Структура лиганда
1 Fe ₂ (C ₇ H ₆ N ₅ S) ₂ (NO) ₄		6 Fe ₂ (C ₈ H ₅ N ₄ SO ₂) ₂ (NO) ₄	
2 Fe ₂ (C ₃ H ₄ N ₃ S) ₂ (NO) ₄		7 Fe ₂ (C ₉ H ₈ N ₃ SO) ₂ (NO) ₄	
3 Na[Fe(C ₇ H ₅ N ₄ S) ₂ (NO) ₂]		8 Fe ₂ (C ₈ H ₆ N ₃ S) ₂ (NO) ₄	
4 [Fe(NO) ₂ (C ₇ H ₅ N ₄ S) ₂] ₂ Fe(H ₂ O) ₂ ·4H ₂ O		9 Fe ₂ (C ₇ H ₃ N ₄ S) ₂ (NO) ₄	
5 Fe ₂ (C ₈ H ₅ N ₄ SO ₂) ₂ (NO) ₄		-	-

Элементный анализ **1, 2, 5–9** выполнен в АЦКП ИПХФ РАН на CHNS/O элементном анализаторе Vario MICRO cube (Elementar, Германия). На основании полученных результатов были определены составы НКЖ **1, 2, 5–9**.

ИК-спектры всех синтезированных НКЖ были сняты на Фурье-спектрометре Bruker ALPHA в интервале частот от 400 до 4000 см^{-1} в режиме НПВО. В ИК-спектрах **1, 2, 5–9** были идентифицированы синфазные колебания группы NO в области 1809–1784 см^{-1} ($\nu_{\text{NO-сим}}$) и противофазные колебания группы NO в области 1759–1719 см^{-1} ($\nu_{\text{NO-асим}}$). Дублет валентных NO колебаний, интенсивность которых на порядок и более превосходит интенсивность других линий, являются преобладающими в спектрах димеров ДНКЖ **1–9**. Параметр $\Delta\nu_{\text{NO}}$ является эффективным инструментом для определения структурного типа соответствующего димера ДНКЖ. Среднее значение разницы $\nu_{\text{NO-сим}}$ и $\nu_{\text{NO-асим}}$ в НКЖ **1, 2, 5–9** составляет 60 см^{-1} . Этот факт позволяет предположить, что их молекулярные структуры близки и относятся к известному « μ -NCS» структурному типу парамагнитных биядерных тетранитрозильных комплексов железа, в которых Fe...Fe расстояние составляет $\sim 4,0 \text{ \AA}$ [11].

Подтверждением того, что синтезированные димеры ДНКЖ являются парамагнитными комплексами μ -N-C-S структурного типа являются данные ЭПР спектроскопии. Спектры ЭПР порошков НКЖ **1, 4, 8 и 9** регистрировали при комнатной температуре на спектрометре SE/X 2544 (Познань, Польша). Порошки помещали в 5 мм ампулы, растворы в 1 мм ампулы. Доля парамагнитных комплексов N определяли сравнением второго интеграла спектров ЭПР образца и стандарта. В качестве стандарта использовали либо порошок $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, либо раствор нитроксильного радикала в воде. Для определения g-фактора образца использовали боковой образец ДФПГ с g-фактором 2,0036. Для поликристаллов исследованных НКЖ **1, 4, 8 и 9** не наблюдается СТС в твердой фазе из-за усреднения обменного взаимодействия электронных спинов соседних близко расположенных комплексов. Значения среднего числа спинов на один биядерный комплекс свидетельствуют об антиферромагнитном обменном взаимодействии неспаренных электронов двух атомов железа.

Мессбауровские спектры поглощения соединений **3, 4, 8 и 9** снимали на установке WissEl (Wissenschaftliche Elektronik GmbH, Германия), работающей в режиме постоянного ускорения. Источником γ -квантов служил Co^{57} в матрице Rh, находящийся при комнатной температуре. Измерения спектров при низких температурах проводили с помощью проточного гелиевого криостата CF-506 (Oxford Instruments) с регулируемой температурой. Обработку мессбауровских спектров проводили методом наименьших квадратов в предположении лоренцевой формы составных линий поглощения. ^{57}Fe Мессбауровские спектры поликристаллов **1, 2, 5–9** представляют собой одиночные дублеты с параметрами (изомерный сдвиг (δ_{Fe}) и квадрупольное расщепление (ΔE_Q)), близкими к таковым для комплекса с 3-амино-5-меркапто-1,2,4-триазолом (μ -N-C-S типа). Для НКЖ **3** параметры δ_{Fe} , =0,149 (2) мм/с, ΔE_Q , =0,937 (1) мм/с и Γ =0,287 (3) мм/с при $T=85 \text{ K}$ близки к таковым для ДНКЖ с 3-меркапто-1,2,4-триазолом. В соединении **4** существуют два спиновых центра $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}$ с $S=1/2$ каждый. Внутри молекулы обменное взаимодействие между спинами очень слабое, поскольку связь между динитрозильными фрагментами осуществляется через немагнитный Fe^{2+} и на большом расстоянии. Железов динитрозильных фрагментах **4**, имеют заряд $1+$. Электронейтральность **4** реализуется при условии, что центральный атом железа имеет заряд $2+$, что подтверждается данными ЯГР. Атом Fe^{2+} в структуре **4**, согласно данным РСА, находится в окружении четырех атомов кислорода воды и двух атомов азота пиридиллов лиганда и является низкоспиновым ($S=0$).

Для изучения NO донорной активности НКЖ **1–9** в растворах использовали сенсорный электрод amINO-700 системы inNO Nitric Oxide Measuring System (Innovative

Instruments, США). Установлено, что при гидролизе **1-9** генерируют NO без дополнительной активации (фото-, термо- или редокс-агентов). Выделение NO при разложении комплексов наблюдается уже в первые секунды после растворения. Кинетические зависимости для **1, 2, 4-9** выходят на «плато» через ~500 сек. после начала эксперимента. Максимальные количества генерированного комплексами NO в аэробных растворах представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Количество NO, генерированно 1–9 (концентрация $0,4 \cdot 10^{-5}$ М) в 1 % водных растворах DMSO (аэробные условия, pH=7,0, T=25 °C)

ДНКЖ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NO, нМ	6,2	13,0	18,2	8,8	19,4	12,4	10,7	9,0	2,9

Активность ФДЭ цГМФ определяли по количеству образующегося в процессе ферментативной реакции ГМФ, которое, в свою очередь, равно количеству неорганического фосфата, образовавшегося из ГМФ при добавлении нуклеотидазы. Согласно полученным данным (таблица 4), в диапазоне концентраций от 0,1 до 0,001 мМ все исследованные комплексы проявляют модулирующее действие на активность ФДЭ цГМФ. При этом **4** и **8** являются лидерами в данном ряду, они тормозят активность фермента в концентрации 0,1 мМ более, чем на 70 %. Эффективность **3** и **1** при данной концентрации немного ниже и составляет 50–60 %, а **2** оказывает на функции фермента заметно меньшее ингибирующее действие (38 ± 4 %).

Таблица 4 – Ингибирование ФДЭ цГМФ (в % от контроля) при действии НКЖ 1–4, 8 и их лигандов

Соединение	Концентрация соединений, мМ		
	0,1	0,01	0,001
1	51,6±5	24,2±2	14,6±2
2	38±4	15±2	15±2
L2	20±2	13,5±1	10±1
3	59±6	29±3	20,2±2
L3	18,6±2	17,9±2	15,5±2
4	76±8	60±6	26±3
8	72±7	59±6	17±2

Примечание – Данные представлены в виде среднего значения и среднего квадратического отклонения по результатам как минимум трех повторностей.

Кроме того, в работе сопоставлено действие двух исследуемых ДНКЖ с их лигандами на активность фермента. Для **3** и его лиганда **L3** в концентрации 0,1 мМ наблюдается значительная разница во влиянии на активность ФДЭ цГМФ: лиганд тормозит ферментативную функцию более, чем в три раза хуже ($18,6 \pm 2$ % против 59 ± 6 %). При снижении исходной концентрации **3** и его лиганда **L3** разница уменьшается. Комплекс **2** также ингибирует фермент эффективнее своего лиганда **L2**, но разница значительно меньше (38 ± 4 % против 20 ± 2 % в 0,1 мМ концентрации), чем в предыдущей паре. Комплексы являются более эффективными ингибиторами ФДЭ цГМФ, чем их лиганды и не уступают по активности теofilлину, который тормозит активность фермента в концентрациях 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М на 63 ± 8 %, 45 ± 5 %, 30 ± 3 %, соответственно [12].

Автор считает, что обнаруженная способность ряда комплексов к ингибированию ферментативной активности ФДЭ цГМФ позволяет прогнозировать их высокую терапевтическую активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант «Медицинская химия в создании лекарств нового поколения для лечения социально-значимых заболеваний» (Соглашение № 075-15-2020-777 от 01 октября 2020 г)).

Литература:

1. Hsiao H., Chung C., Santos J.H., Villaflores O.B., Lu T.-T. Fe in biosynthesis, translocation, and signal transduction of NO: toward bioinorganic engineering of dinitrosyl iron complexes into NO-delivery scaffolds for tissue engineering, Dalton Trans. 2019. Vol. 48. P. 9431–9453.
2. Tat'yanenko L.V., Dobrokhotova O.V., Kotel'nikov A.I., Sanina N.A., Kozub G.I., Kondrat'eva T.A., Aldoshin S.M., Effect of Iron Nitrosyl Complexes, No Donors, on the Activity of Ca²⁺-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum and Phosphodiesterase of Cyclic Guanosine Monophosphate, Pharm. Chem. J. 2013. Vol. 47. P. 455–458.
3. Beavo J. A., Reifsnnyder, D. H., Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors, Trends Pharmacol. Sci. 1990. Vol.11. 4. P.150-155.
4. Caron S., Vazque E., The Synthesis of a Selective PDE4/TNF α Inhibitor, Org. Process Res. Dev. 2001. Vol.5. 6. P. 587–592.
5. Boland S., Alen J., Bourin A., Castermans K., Boumans N., Panitti I., Vanormelingen J., Leysen D., Defert O., Novel Roflumilast analogs as soft PDE4 inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014. Vol. 24, P. 4594-4597.
6. Gewald R., Grunwald C., Egerland U., Discovery of triazines as potent, selective and orally active PDE4 inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013. Vol. 23.15. P. 4308-4314;
7. Gorja, D. R., Shiva Kumar K., Kandale A., Meda C.L., Parsa K.V., Mukkanti K., Pal M., Design and synthesis of 4-alkynyl pyrazoles as inhibitors of PDE4: a practical access via Pd/C-Cu catalysis, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012. 22. 7. P.2480-2487.
8. Bihel, F. J. J., Justiniano H., Schmitt M., Hellal M., Ibrahim M.A., Lugnier C., Bourguignon J.J., New PDE4 inhibitors based on pharmacophoric similarity between papaverine and tofisopam, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011. 21. P. 6567-6572.
9. Grewal A.S., Kumar P., Dua J.S., Lather V., Synthesis, Docking and Anti-Inflammatory Activity of Some Newer Triazole Derivatives as Potential PDE7 Inhibitors, Journal of Medicinal Chemistry & Toxicology. 2017. Vol.2. 2. P. 55- 61.
10. Laddha S.S., Bhatnagar S.P., A new therapeutic approach in Parkinson's disease: some novel quinazoline derivatives as dual selective phosphodiesterase 1 inhibitors and anti-inflammatory agents, Bioorg. Med. Chem. 2009. Vol. 17. 19. P. 6796–6802.
11. Sanina N.A., Korchagin D.V., Shilov G.V., Kulikov A.V., Shestakov, A.F., Sulimenkov, I.V., Aldoshin S.M., Structures of bis(1-methyltetrazole-5-thiolato)(tetranitrosyl)diiron and its intermediates in solutions, Russ. J. Coord. Chem. 2010. Vol. 36. P. 876–886.
12. Татьянаенко Л.В., Богданов Г.Н., Доброхотов, О.В., Фадеев М.А., Федоров Б.С., Модуляция активности фосфодиэстеразы циклического аденозинмонофосфата под влиянием производных пиридинкарбоновых кислот и металлокомплексов Pt (IV) на их основе, Биомедицинская химия. 2006. Т. 52. № 2. С. 174–179.

Сведения об авторе**Наталья Алексеевна Санина**

д.х.н., проф., главный научный сотрудник
ФГБУН Институт проблем химической физики Российской академии наук (ИПХФ РАН)
Черноголовка, Московская область, Россия
Эл. почта: sanina@icp.ac.ru

Information about author**Natalia Sanina**

Dr., Ph.D., Prof., Chief Scientist
FGBUN Institute for Chemical Physics at the Russian Academy of Sciences (IPHF RAS)
Moscow Region, Russia.
E-Mail: sanina@icp.ac.ruElena

УДК 577.152.3
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.23

В.П. Дерягина¹, Н.И. Рыжова¹, Л.А. Савлучинская¹,
Л.В. Кривошеева¹, К.И. Кирсанов^{1,2}
¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА (NO) И МЕХАНИЗМЫ ЕГО РЕАЛИЗАЦИИ

В обзоре обсуждаются литературные данные и результаты собственных исследований о роли оксида азота в канцерогенезе. Анализируется противоопухолевый потенциал классических NO-доноров как цитотоксических соединений и модуляторов сигнальных онкогенных путей.

Ключевые слова: оксид азота, доноры NO, противоопухолевая активность

V.P. Deryagina¹, N.I. Ryzhova¹, L.A. Savluchinskaya¹,
L.V. Krivosheeva¹, K. Kirsanov^{1,2}
¹FSBI N.N. Blokhin NMRCO;
²Peoples' Friendship University of Russia

ANTITUMOR EFFECT OF NITRIC OXIDE (NO) DONORS AND MECHANISMS OF ITS IMPLEMENTATION

The review discusses literature data and the results of our own studies on the role of nitric oxide in carcinogenesis. The antitumor potential of classical NO donors as cytotoxic compounds and modulators of signaling oncogenic pathways is analyzed.

Keywords: nitric oxide, NO donors, antitumor activity.

Цель работы: краткий обзор роли оксида азота в канцерогенезе, а также анализ противоопухолевых эффектов NO-доноров и механизмов их реализации.

Введение. Оксид азота (NO) представляет собой свободный радикал, газообразную сигнальную молекулу, легко диффундирующую в клетках и тканях, которая участвует во многих физиологических и патологических процессах, в том числе в онкогенезе на разных стадиях его развития: инициации, промоции и прогрессии. Роль NO в опухолевом процессе в настоящее время интенсивно исследуется и обсуждается. К настоящему моменту стало понятно, что NO в злокачественных опухолях демонстрирует разнонаправленную активность – может как стимулировать опухолевый рост, так и вызывать противоопухолевые эффекты.

Противопухолевое действие NO. Высокие концентрации NO, продуцируемые иммунными или опухолевыми клетками в результате активации NO-синтаз (NOS), способствуют образованию химически активных производных NO (N₂O₃, ONNO⁻, NO₂, NO₂⁻ и др.), которые вызывают повреждение ДНК тремя возможными механизмами: 1) образованием канцерогенных нитрозаминов (R1R2N-NO); 2) прямой модификацией ДНК (дезаминирование гуанина, цитозина и аденина *in vivo*, нитрование оснований, окислением нуклеиновых кислот); 3) ингибированием систем, вовлеченных в репарацию повреждённых ДНК, в том числе алкилтрансфераз, ДНК-гликозилаз, посредством их модификации нитрованием тирозина и нитрозированием или нитрозилированием тиольной группы белков [1-8]. NO изменяет экспрессию и активность критических белков, участвующих в регуляции клеточного цикла и апоптоза [9]. В условиях низких концентраций NO 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 [10]. NO в малых концентрациях (<100 nM) стимулирует ангиогенез за счет увеличения пролиферации и миграции эндотелиальных клеток с участием sGC-cGMP сигнального пути [11-13]. Низкие концентрации NO, продуцируемые eNOS, активируют лимфоангиогенез и лимфатическое

метастазирование. Совсем недавно показана роль NO как эпигенетического регулятора экспрессии генов, действие которого опосредовано посттрансляционной модификацией гистонов (PTMs). NO изменяет PTMs гистонов за счет прямого ингибирования каталитической активности JmjC-домена, содержащего гистоновые деметилазы [13,14].

Противоопухолевое действие NO. При продолжительной сверхпродукции NO действует как проапоптотический модулятор, активируя протеазы семейства каспаз, способствуя высвобождению митохондриального цитохрома *c* в цитоплазму, повышая накопление и экспрессию p53, p38MAPK, снижая каталитическую активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и изменяя экспрессию белков семейства Bcl-2 [15-18]. Высокие концентрации NO подавляют ангиогенез, ингибируя фосфорилирование белков активаторов – PKC, ERK и JUN и вызывая арест клеточного цикла, а также гибель клеток вследствие некроза [19-22]. Генерируемый макрофагами, клетками Купфера, натуральными киллерами, эндотелиальными клетками и другими типами клеток NO оказывает цитостатическое и цитотоксическое действие на опухолевые клетки [23, 24].

Более ясное понимание роли NO в биологии рака инициировало значительный прогресс в изучении влияния NO-доноров на опухолевый процесс в экспериментальной онкологии и в клинической практике в борьбе с онкологическими заболеваниями. В настоящей работе будут рассмотрены ряд новых синтезированных или часто исследуемых, проявивших свою противоопухолевую эффективность NO-доноров, а также молекулярные механизмы, посредством которых NO-доноры реализовали свой противоопухолевый потенциал. Основные классы экзогенных NO-доноров, тестируемые в экспериментальных моделях включают: 1) Органические нитраты; 2) NO-металло комплексы (нитропруссид натрия); 3) S-нитрозотиолы; 4) Сиднонимины; 5) N-диазениумдиолаты (NONOаты); 6) гибриды лекарств, включающих NO. Механизм активации высвобождения NO из NO-доноров может быть химическим или ферментативным. Химическое высвобождение – это высвобождение NO при взаимодействии доноров NO с тиолами и другими восстановителями, такими как аскорбиновая кислота. Ферментативные пути охарактеризованы пока не в полной мере. Известно, что из нитроглицерина и IS-K высвобождение катализируется глутатион-S-трансферазой, а в некоторых производных N-диазениумдиолатов высвобождение активируется лизилоксидазой, уровень этого фермента достигает существенных величин в опухолях трижды негативного рака молочной железы. Оба способа генерации NO реализуются для производных сиднонимин, натрия нитропруссид, нитритов, S-нитрозотиолов [25, 26].

Значительное число работ посвящено изучению антипролиферативной активности и механизмам её реализации донора NO – JS-K [*O*²-(2,4-dinitrophenyl)1-[(4-ethoxycarbonyl)piperazin-1-yl]diazene-1,2-diolate]. JS-K относится к классу диазениумдиолатов (NONO-аты), является пролекарством, которое активируется в результате взаимодействия с глутатион-S-трансферазой (GST) и сопровождается высвобождением NO. GST является ключевым ферментом детоксикации ксенобиотиков и часто сверхэкспрессируется в опухолевой ткани. Противоопухолевая активность JS-K продемонстрирована в многочисленных экспериментах *in vitro* и *in vivo* для широкого спектра опухолей: гепатом, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака лёгких, глиом, множественной миеломы и другое (табл. 1). Донор NO, JS-K вызывает двухцепочечные разрывы ДНК, ингибирование ферментов репарации ДНК, инициацию гибели опухолевых клеток путем некроза, апоптоза, активируя каспазы -3, -8 и -9 и высвобождение митохондриального цитохрома *c*. [27-34]. Необходимо добавить, что JS-K хорошо переносится и увеличивает выживаемость мышей с ксенотрансплантатами множественной миеломы [35].

Недавно были синтезированы несколько соединений доноров NO, которые относятся к классу N-диазениумдиолатам, активация которых происходит с участием GST. Наиболее активное из синтезированных соединений *O*²- (производные сульфонилэтил) диазениумдиолата, соединение 6, высвобождало относительно высокие уровни NO и ингибировало пролиферацию клеток меланомы B16, причем его антипролиферативная

активность превосходила аналогичный показатель для JS-K. Важно отметить, что соединение 6 проявляло в 8 раз меньшую ингибирующую активность при действии на нормальные эпителиальные клетки. Это соединение значительно замедляло рост ксено-трансплантатов B16 у мышей. Полученные данные обнадеживают и соединение 6 может иметь терапевтический потенциал в отношении меланомы [36].

DETA/NO ((Z)-1-[2-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate) – донор NO, отличается от других доноров NO спонтанной диссоциацией и прогнозируемым высвобождением NO в зависимости от pH и температуры, что приемлемо при использовании соединения в экспериментальных исследованиях [37]. Впервые на клеточных линиях рака эндометрия изучали влияние DETA/NO на пролиферацию и инвазию опухолевых клеток. DETA/NO индуцировал снижение жизнеспособности опухолевых клеток, активацию каспазы-3 и остановку клеточного цикла в фазе G0/G1, снижение количества стволовых клеток CD133. Секвенирование РНК (RNA-seq) обработанных DETA/NO опухолевых клеток выявило увеличение активности генов опухолевых супрессоров: ингибитора циклин-зависимой киназы – CDKN1A и RASSF1A – изоформа A семейства доменов RAS-ассоциации 1. Авторы полагают, что соединение DETA/NO может оказаться эффективным при терапии рака эндометрия [38].

Разработана новая стратегия, позволяющая избирательно высвобождать NO при активации NO-донора (O2-3-аминопропилдиазениумдиолата) лизилоксидазой, экспрессированной в клетках трижды негативного рака молочной железы (TNBC) при их инкубации с соединением. Наиболее активное соединение 3f способно селективно высвобождать большие количества NO в клетках TNBC, ингибировать пролиферацию клеток и уменьшать адгезию, инвазию и миграцию клеток TNBC *in vitro*. Кроме того, 3f значительно подавлял рост и метастазирование имплантированного TNBC *in vivo* за счет уменьшения образования микровезикул путем эпигенетической модификации экспрессии miR-203/RAB22A. Таким образом, доноры NO ингибируют канцерогенез, в том числе, за счет эпигенетической модуляции экспрессии генов при высокометастатическом трижды негативном раке молочной железы [39].

Натрий нитропруссид (NP) содержит нитрозогруппу, которая в организме трансформируется в NO, активирует гуанилатциклазу и увеличивает образование cGMP. Было показано, что ингибирующий эффект NP на рост карциномы Эрлиха (КЭ) зависел от дозы и пути введения. Подкожное введение NP в дозе 80 µg/kg ингибировало опухолевый рост, тогда как внутривнутрибрюшинное введение высокой дозы на второй и третий день после перевивки не только не ингибировало, но стимулировало опухолевый рост на 124% [40].

RRx-001, производное динитроазетидина, является новым противоопухолевым соединением, которое генерирует активные формы кислорода, NO и его активные формы, которые вызывают изменения редокс-статуса в клетке, запускают апоптоз, приводят к эпигенетическим изменениям в опухолевых клетках [41]. Показано, что RRx-001 значительно снижал экспрессию ДНК метилтрансфераз (DNMT1 и DNMT3A) в опухолевых клетках SCC VII мышей и индуцировал деметилирование генов, вовлеченных в сигнальные пути онкогенеза [42]. При монотерапии RRx-001 мышей с опухолями, соединение в условиях гипоксии демонстрировало большую цитотоксичность, чем цисплатин или тирапазамин и подавляло рост опухоли в отсутствие системной токсичности. RRx-001 проходит оценку во второй фазе клинических исследований как химиотерапевтический препарат, повышающий чувствительность опухолей к химио-, радио- и иммунотерапии. Пока известны результаты о снижении экспрессии протуморогенного маркера M2CD206 на периферических моноцитах положительно коррелирующего с повышенным ответом и выживаемостью у больных, получавших RRx-001 [43].

Вновь синтезированное соединение RRx-001 класса динитроазетидинов – 1-бромацетил-3,3 динитроазетидин (ABDNAZ), активируется при гипоксии и ионизирующей радиации [44]. Метаболизм ABDNAZ включает высвобождение нитрогруппы,

ведущую к образованию NO. Клетки SCCVII были более чувствительны к действию препарата при гипоксии, чем при нормоксии. Исследование терапевтической эффективности соединения в опыте на мышах показало, что при действии комбинации ABDNAZ и радиации ингибирующий эффект в отношении SCCVII у мышей был синергичным. Торможение роста опухолей зависело от временного интервала между введением и облучением [45].

Обращает на себя внимание работа по созданию и исследованию противоопухолевых свойств новых биомиметиков с фармакологически активными лигандами на основе динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). Известно, что образующиеся в клетках человека ДНКЖ с тиолсодержащими лигандами выполняют функцию хранения и транспортировки NO [46, 47]. Изучение *in vitro* антипролиферативной активности катионного комплекса ДНКЖ с функциональным серосодержащим лигандом N-этилтиомочевинной на клеточных линиях различного типа опухолей обнаружило высокую избирательную токсичность синтезированного соединения по отношению к клеткам глиобластомы A-172. Клетки глиобластомы проявляют высокую чувствительность к катионному комплексу: доза IC₅₀ для клеток A-172 была в 500-1500 раз ниже по сравнению с клетками других типов, включая нормальные клетки. Высокая антипролиферативная активность низких концентраций катионного комплекса по отношению к клеткам глиомы является надежным обоснованием в целесообразности дальнейших исследований [48].

В качестве противоопухолевого соединения был исследован источник NO – S-нитрозоглутатион (GSNO). Внесение в культуру клеток нейробластомы N2a мыши GSNO приводило к умеренному снижению (на 20-25%) выживаемости клеток и препятствовало образованию колоний. Жизнеспособность фибробластов дермы человека (HDFa), идентично обработанных GSNO, сохранялась, что может указывать на различный отклик опухолевых и нормальных клеток. Авторы указывают на перспективность применения GSNO в качестве адьювантного терапевтического средства при нейробластоме [49].

Лекарственные растения в настоящее время рассматриваются как перспективные источники при поиске действующих веществ, которые могли бы применяться при лечении солидных опухолей. При открытии противоопухолевых препаратов широко и успешно применяется стратегия гибридизации, которая заключается в химическом включении двух или более фармакофоров с аналогичной биоактивностью для создания нового более активного соединения. Бетулиновая кислота (ВА) – пентациклический три-терпеноид, который содержится в корне *Pulsatilla chinensis* и обладает противоопухолевой активностью. Для усиления противоопухолевых свойств ВА был синтезирован гибрид ВА с фрагментом, высвобождающим NO – ВА-78. На разных типах клеточных линий было продемонстрировано, что ВА-78 обладает более высоким антипролиферативным потенциалом, чем ВА. ВА-78 вызывал остановку клеточного цикла в фазе G₁, усиливал апоптоз, увеличивая экспрессию проапоптотических белков Bax, Bid, а также цитохрома C и снижал уровни экспрессии антиапоптотических белков – Bcl-2 и Bcl-xl [50].

Другой пример также подтверждает успешное использование гибридного соединения для повышения противоопухолевой эффективности. Известно, что производные 8-оксихинолина (8-HQ) обладают противоопухолевой активностью [51]. Для создания нового прохелатора на основе 8-HQ с усиленной противоопухолевой активностью был использован фуроксан (донор NO). Полученный конъюгат HQ-NO модифицировали фрагментом, реагирующим с АФК. Вновь синтезированное пролекарство HQ-NO-11 проявляло сильную и избирательную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток *in vitro*. В условиях *in vivo* HQ-NO-11 в большей степени, чем 8-HQ ингибировал рост ксенотрансплантата SW1990 [52].

Вызывает интерес синтезированное на основе фуроксана синтетическое производное бифендата – донор NO бифендат-NO (DDB-NO). Это соединение эффективно подавляло жизнеспособность клеток хронического миелоидного лейкоза (K562,

K562/A02), НЕК293-трансфицируемых сублиний клеток НЕК293/Vec, НЕК293/ABCC1 и НЕК293/ABCG2, а также клеток опухоли печени HepG2 (до 80%), которым свойственна множественная лекарственная устойчивость (МЛУ). Цитотоксичность соединения проявлялась при сравнительно низкой концентрации DDB-NO и была опосредована индукцией апоптоза, подавлением экспрессии NIF-1 α , протенкиназы B (АКТ), ERK, а также снижением активации транскрипционного фактора NF- κ B. Учитывая, что развитие множественной лекарственной устойчивости к донорам NO является труднодостижимой из-за его физико-химических свойств, соединение DDB-NO может представлять интерес в плане более глубокого изучения с целью применения его в терапии резистентных к препаратам опухолей [53].

Источником экзогенного NO могут также являться 5-членные гетероциклы, например, производные фурана, имидазола, тиазола, способные в процессе метаболизма отщеплять нитрогруппу в виде нитрит-аниона, который далее трансформируется в NO. В эксперименте на мышах с подкожно перевитой КЭ было изучено действие 7 синтетических соединений, относящимся к производным 3-нитробензофурана, 3-нитроиндола и нитровинилгидрохинона. Показано, что два соединения, относящихся к 3-нитробензофуранам в низких дозах (200-400 мкг/кг) достоверно ингибировали рост КЭ (39-67%), причем эффект сохранялся на поздних сроках и был подтвержден достоверным снижением массы опухолей на 24% [54].

Синтез новых соединений, блокирующих или уменьшающих МЛУ, является областью интенсивных исследований. Вновь синтезированные соединения, полученные конъюгированием доксорубина с нитроокси- или 3-фенилсульфонилфуроксановыми фрагментами доноров NO, способны накапливаться в резистентных к доксорубину клетках опухолей толстой кишки человека (HT29-dx) и вызывать выраженную цитотоксичность. Механизм устойчивого цитотоксического эффекта новых соединений связывают с ингибированием активности ассоциированного с МЛУ белка MRP3, которое опосредовано нитрованием остатков тирозина MRP3 [55].

Вызывают интерес производные кумарина, синтезированные на основе фуроксана, показавшие свою антипролиферативную активность в низких концентрациях. Шестнадцать новых соединений были оценены на наличие антипролиферативной активности с использованием семи опухолевых клеточных линий. Большинство производных обладали антипролиферативной активностью. Одно из них (8b) при низких значениях IC₅₀ (14-140 нМ) проявило самую сильную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток всех линий, в том числе к клеткам, устойчивым к химиопрепаратам: A2780/CDDP, MDA-MB-231/Gem и SKOV3/CDDP. Исследования показали, что 8b вызывал инициацию апоптоза, остановку клеточного цикла в фазе G2/M и нарушение фосфорилирования MEK1 и ERK1 в опухолевых клетках. Способность высвобождать NO и ингибировать передачу сигналов пути ERK/MAPK может объяснять мощную противоопухолевую активность этих соединений [56].

В другом исследовании синтезированные новые соединения-гибриды фуроксан/кумарин (10a-k) проявляли сильную антипролиферативную активность по отношению к опухолевым клеткам человека пяти линий (HepG2, SW620, HCT116, HeLa, MCF-7) *in vitro*. В частности, соединение 10i обладало наивысшей цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам молочной железы MCF-7 и шейки матки человека HeLa. Еще более важно то, что другое соединение 10f избирательно ингибировало пролиферацию только колоректальных опухолевых клеток, но не нормальных клеток. Тестируемые соединения-гибриды фуроксан/кумарин, с учетом их существенной противоопухолевой активности, заслуживают дальнейшего исследования в качестве кандидатов для лечения карцином [57].

Вновь синтезированные гибридные NO-высвобождающие производные скополетина на основе фенилсульфонил фуроксана показали значимую антипролиферативную активность по отношению к опухолевым клеткам линий: MDA-MB-231, MCF-7,

HspG2 и A459 и низкую цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам LO2 печени. Уровень внутриклеточного NO в соединении 47 положительно коррелировал с его антипролиферативной активностью на культуре клеток MDA-MB-231. Показано, что это соединение блокирует пролиферацию клеток MDA-MB-231, активируя путь митохондриального апоптоза и останавливая клеточный цикл в фазе G2/M [58].

Исследована антипролиферативная активность гибридного соединения Celastrol/донор NO, в состав которого входит донор NO. Известно, что Celastrol – пентациклический нортритерпенхинон, обладает противоопухолевой активностью, ингибируя NF- κ B и белки шапероны Hsp90. Оценка серии вновь синтезированных гибридных соединений Celastrol/донор NO выявила линейную положительную зависимость между количеством высвобождаемого NO и выраженностью ингибирования пролиферации опухолевых клеток карциномы лёгких человека A549. Соединение 11b демонстрировало самую высокую эффективность ($IC_{50} = 0,48 \pm 0,06 \mu M$), вызывая нарушение регуляции Akt и Cdk4, апоптоз и остановку клеточного цикла в фазе G0/G1. В целом, способность высвобождать NO и ингибировать передачи сигналов пути Hsp90 может объяснять мощную антипролиферативную активность этих соединений [59].

Контроль за пространственно-временным высвобождением NO при биотрансформации NO-доноров остается проблемой не до конца решенной, и подходы, которые применяют в биоортогональной химии могут содействовать решению этой задачи. Биоортогональная химия широко используется для активации белков или пролекарств. В качестве новых биоортогональных предшественников NO исследованы соединения класса O2-3-изоцианопропилдиазениумдиолатов (3a-f), которые могут эффективно выводиться из клетки посредством реакций расщепления связи тетразином. Реакция сопровождается высвобождением NO в опухолевых клетках. Соединение 3a и тетразин BTZ были инкапсулированы в отдельные липосомы. Одновременное введение двух липосом вызывало высвобождение больших количеств NO в имплантированных раковых клетках у рыбок Данио и подавляло рост опухолей *in vivo* [60].

Заключение. Результаты исследований подтверждают, что эндогенный синтез избыточных количеств NO и образование его активных производных вызывают химические модификации и двухцепочечные разрывы ДНК, которые могут наследоваться в форме мутаций и могут быть причиной онкогенной трансформации клеток. С другой стороны, собственное цитотоксическое действие NO, вызывающее арест клеточного цикла, гибель клеток вследствие инициации апоптоза и некроза может приводить к ингибированию опухолевого роста. Обзор данных литературы показал, что большинство соединений, доноров NO, различных по химической структуре, свойствам, метаболизму в организме, обладают антипролиферативной и противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo*. Доставка экзогенных доноров NO в опухоль рассматривается как целесообразный подход, позволяющий вызвать гибель опухолевых клеток. В тоже время, высокая химическая активность производных NO, затрудняет достижение требуемых локальных концентраций, необходимых для проявления противоопухолевого эффекта. Остановимся лишь на нескольких свойствах NO, препятствующих достижению определенных локальных концентраций NO и его производных. Например, в результате реакции NO с O_2^- образуется высокореакционный пероксинитрит (вызывает повреждение ДНК и перекисное окисление липидов), что приводит к снижению концентрации NO. Короткое время жизни NO (несколько секунд) серьезно ограничивает эффективность NO. Взаимодействие NO с оксигенированным гемоглобином и миоглобином приводит к быстрому связыванию NO и служит механизмом для поддержания гомеостаза NO в сосудистом русле. В связи с этим, разработка и синтез соединений – доноров NO, которые могли бы обеспечить целевую доставку NO в необходимой дозе, побудило исследователей к разработке терапевтических стратегий, основанных на конкретных технологиях [61, 62]. В последние годы технический прогресс позволил получить производные

Противоопухолевое действие доноров NO и механизмы его реализации

№ n/n	Доноры NO	Линии опухолевых клеток, опухолевые модели in vivo	Противоопухолевое действие	Действие на молекулярные мишени	Литература
1.	JS-K (diazenium diolate, NO-NO _{ax})*	Клетки глиомы U 87; Ксенографты U 87	Ингибирование пролиферации, опухолевого роста. Усиление некроза, апоптоза	Активация каспазы -3, -8, -9. Увеличение высвобождения цитохрома С, индукция ERK, JNK	Weyerbrock A., 2012
2.	O ² - (сульфонилэтил производные) диазениидиолатов	Клетки меланомы B16, ксенотрансплантаты B16	Ингибирование пролиферации, опухолевого роста.		Huang Zh., 2018
3.	Гибрид бетулиновой кислоты с NO (NO-BA-78)*	Клеточные линии: B16F10, MCF-7, HCT-116, A549, Hep G2, Hef	Антипролиферативное действие	Индукция апоптоза, увеличение экспрессии Bax, Bid, цитохрома С, и снижение экспрессии Bcl-2, Bcl-xl. Остановка клеточного цикла в фазе G1.	Zhang L., 2018
4.	Комбинация 1-бромацетил-3,3 динитроазетидин (ABDNAZ) с радиацией	Сквамно клеточная карцинома SCCVII у мышей	Усиление ингибирующего эффекта		Ning Sh., 2012
5.	RRx-001, производное динитроазетидина	Клетки множественной миеломы (ММ), ксенографты ММ	Ингибирование роста клеток и роста ксенографтов. Пролонгирование выживаемости мышей с ММ	Арест клеточного цикла в фазе G1, повреждение ДНК, стимуляция апоптоза. Ингибирование роста клеток, индуцированного BMSCs* и pDCs*; ингибирование метилтрансферазы	Das D.Sh., 2016
6.	Донор NO: катионный комплекс ДНКЖ с N-этилглютаминной	Клетки молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы, глиобластомы A-172	Высокая избирательная цитотоксичность к клеткам A-172		Sanina N., 2017
7.	Донор NO: GSNO*	Клетки нейробластомы N2a	Снижение выживаемости клеток, уменьшение количества колоний		Gordon J.L., 2020
8.	HQ-NO-11*	Ксенотрансплантаты SW 1990	Ингибирование роста опухолей. Цитотоксичность		Zhang Y., 2021
9.	DDB-NO*	Клетки хронического миелоидного лейкоза K562. K562/A02. клетки печени Hep G2	Цитотоксичность	Индукция апоптоза, подавление экспрессии HIF-1a. AKT. ERK, NF-kB	Ren Zh., 2016
10.	DETA-NO*	Клетки рака эндометрия	Антипролиферативное действие	Активация каспазы-3, остановка клеточного цикла в фазе G0/G1, снижение CD133, активирование генов опухолевых супрессоров	Waheed S., 2019
11.	Конъюгированный доксорубин с нитроокси- и фенилсульфонилфуроксановыми фрагментами доноров NO	Опухолевые клетки HT29-dx	Выраженная цитотоксичность	Ингибирование активности MRP3, ассоциированного с MLY	Chegaev K., 2011
12.	Доноры NO: производные 3-нитробензофурана	Карцинома Эрлиха	Ингибирование роста опухолей на 61-67%, снижение массы опухолей		Дерягина В.П., 2009
13.	Производные кумарина на основе фураксана	Клеточные линии: A549, HeLa, A2780, A2780/CDDP, MDA-MB-231/Gem, SKOV3/CDDP	Антипролиферативное действие	Индукция апоптоза, арест клеточного цикла в фазе G2/M, ингибирование ERK/MAPK пути	Liu M-M., 2014
14.	Производные кумарина на основе фураксана	Клеточные линии: HepG2, SW620, HCH116, HeLa, MCF-7	Антипролиферативное действие		Zhang Zh., 2018
15.	Производные скополетина на основе фенилсульфонифураксана	Клеточные линии: MDA-MB-231, MCF-7, HepG2 и A459	Антипролиферативное действие	Активация пути митохондриального апоптоза, арест клеточного цикла в фазе G2/M	Shi Zh., 2020
16.	Гибриды, включающие в свой состав Celastrol/донор NO	Опухолевые клетки карциномы лёгких человека A549	Антипролиферативное действие	Нарушение регуляции Akt и Cdk4, апоптоз и остановка клеточного цикла в фазе G0/G1	Li N., 2018
17.	Производные O2-3-аминопропилдiazениумдиолата	Опухолевые клетки трижды негативного рака молочной железы человека; перевиваемая опухоль TNBC	Антипролиферативное действие, уменьшение адгезии, инвазии и миграции клеток; ингибирование роста и метастазирование опухоли	Эпигенетическая модификация экспрессии miR-203/RAB22A	Kang F., 2018

Примечание. * JS-K – O²-(2,4-dinitrophenyl)-1-[(4-ethoxycarbonyl)piperazin-1-yl]diazene-1-ium-1,2-diolate; GSNO – S-нитрозоглутатин; HQ-NO-11 – производное 8-гидроксиинолина; DDB-NO – бифендат-NO; DETA-NO – (Z)-1-[2-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate, донор NO; BMSCs – стромальные клетки костного мозга; pDCs – плазмацитоподобные дендритные клетки.

N-дiazениумдиолатов (NONOаты), которые генерируют большие количества NO, а самый перспективный из них IS-K активируется GST, которая часто сверхэкспрессируется в опухолях. В данном случае контролируется и увеличивается полезная нагрузка высвобождающегося NO на опухолевые клетки. Заслуживает внимания соединение S-нитрозоглутатин, проявившее антипролиферативные свойства и относительную стабильность. Известно, что S-нитрозотиолы, обеспечивающие сохранение, перенос и доставку NO, характеризуются нестабильностью. Тем не менее, обсуждается возможность

добиться локального синтеза NO с использованием природных пролекарств NO, которыми являются RSNO. В последнее время идентифицировали ферменты или имитаторы ферментов, с помощью которых возможно обеспечение локального синтеза NO посредством каталитического превращения RSNO. Еще один важный путь - разработка гибридных, высвобождающих NO лекарств, включающих два или более биоактивных фармакофора. Многочисленные вновь синтезированные гибридные высвобождающие NO производные показали антипролиферативную и противоопухолевую активность, вызывая арест клеточного цикла в фазах G0/G1, G1, G2/M, инициацию апоптоза за счет увеличения экспрессии проапоптотических белков Bax, Bid и снижения экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xl, а также в результате ингибирования сигнального пути ERK/MAPK, подавления HIF-1 α , ингибирования NF-kB, эпигенетической регуляции экспрессии генов и т.д. В целом, многообещающие результаты, полученные в экспериментальных исследованиях, свидетельствуют в пользу целесообразности применения NO доноров в терапии рака.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: обобщение и анализ данных, подтверждающих противоопухолевую активность NO доноров, модулирующих онкогенные сигнальные пути, что позволяет считать их использование перспективным в терапии опухолей.

Литература

1. Wink D.A., Vodovotz Y., Laval J. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*. 1998; 19(5): 711-721. PMID: **9635855**. DOI:10.1093/carcin/19.5.711.
2. 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. PMID: **1557408**. DOI: 10.1073/pnas.89.7.3030.
3. 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. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2019-6-1-18-36>.
4. Laval F. and Wink D.A. Inhibition by nitric oxide of repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis* 1994; 15: 443-447. PMID:**8118926**. DOI: **10.1093/carcin/15.3.443**.
5. **Jaiswal M., LaRusso N.F., Nishioka N. et al. Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res*. 2001; 61. 6388-93. PMID:11522631.**
6. Дерягина В.П., Н.И. Рыжова Н.И., Кривошеева Л.В., Голубева И.С., Савлучинская Л.А., Хоченков Д.А. Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов NO при росте опухолей разного гистогенеза. *Успехи Мол онкологии*. 2016; С. 73-80. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80.
7. Jones L.E., Ying Jr. L., Hofseth A.B. et al. Differential effects of reactive nitrogen species on DNA base excision repair initiated by the alkyladenine DNA glycosylase. *Carcinogenesis*. 2009; 30(12): 2123-2129. DOI: 10.1093/carcin/bgp256.
8. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин И.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. 156 с.
9. Choudhary Sh. K., Chaudhary M., Bagde S. et al. Nitric oxide and cancer: a review. *Word J Oncol*. 2013; 11:118. PMID: **23718886**. DOI:10.1186/1477-7819-11-118
10. 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. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020.
11. Fukumura D., Kashiwagi S., Jain R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 521-534. DOI: 10.1038/nrc1910.

12. Oliveira C.J.R., Schindler F., Ventura A.M. et al. Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35:381-396. PMID: 12899940. DOI: 10.1016/s0891-5849(03)00311-3.
13. Ziche M., Morbidelli L. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. *Eur. Cytokine Netw.* 2009; 20(4): 164-70. DOI: 10.1684/ecn.2009.0169.
14. 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. DOI: 10.1158/0008-5472. CAN-15-1582.
15. Hara M.R., Snyder S.H. Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. *Cellular & Molecular Neurobiology.* 2006; 26:527-538. PMID: **16633896**. DOI: 10.1007/s10571-006-9011-6.
16. Krishnan A., Iyer V., Azad N. et al. Role of S-Nitrosylation in Apoptosis Resistance and Carcinogenesis. *Nitric Oxide.* 2008; 19(2): 146-151. PMID:18474261. DOI: 10.1016/j.niox.2008.04.019.
17. Hofseth L.J., Saito S., Hussain S.P. et al. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2003; 100:143-148. PMID: **12518062**. DOI: 10.1073/pnas.0237083100.
18. Li C.Q., Pang B., Kiziltepe T. et al. Threshold effects of nitric oxide-induced toxicity and cellular responses in wild-type and p53-null human lymphoblastoid cells. *Chem Res Toxicol.* 2006; 19: 399-406. PMID: **16544944**. DOI:10.1021/tx050283e.
19. Hanahan D., Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86: 353-364. PMID:8756718. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80108-7.
20. Ridnour L.A., Isenberg J.S., Espey M.G. et al. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2005; 102(37). 13147-13152. DOI: 10.1073/pnas.0502979102.
21. 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.
22. Lala P.K. and Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression. *Lancet Oncol.* 2001; 2: 149-156.
23. Li L.M., Kilbourn R.G., Adams J. and Fidler I.J. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res.* 1991; 51:2531-35.
24. Xiao L., Eneroth P.H.E. and Qureshi G.A. Nitric oxide synthase pathway may mediate human natural killer cell cytotoxicity. *Scand J Immunol.* 1995; 42: 505-511. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1995.tb03687.x.
25. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота [NO]. М: Вузовская книга. 2004. 360 с.
26. Huerta S., Chilka S., Bonavida B. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics. *Inter J Oncology.* 2008; 33: 909-27.
27. Laschak M., Spindler R-D., Schrader A.J., Hessenauer A., Streicher W., Schrader M., Cronauer M.V. JS-K, a glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide releasing prodrug inhibits androgen receptor and WNT-signaling in prostate cancer cells. *BMC Cancer.* 2012; 30; 12:130. DOI: 10.1186/1471-2407-12-130.
28. Shami P.J., Saavedra J.E., Wang L.Y., Bonifant C.L., Diwan B.A., Singh S.V., et al. JS-K, a glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide donor of the diazeniumdiolate class with potent antineoplastic activity. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2: 409-417.
29. Shami P.J., Saavedra J.E., Bonifant C.L., Chu J., Udupi V., Malaviya S., et al. Antitumor activity of JS-K [O2-(2,4-dinitrophenyl) 1-[(4-ethoxycarbonyl) piperazin-1-yl] diazenium-1,2-diolate] and related O2-aryl diazeniumdiolates in vitro and in vivo. *J Med Chem.* 2006; 49: 4356-4366.

30. Maciag A.E., Chakrapani H., Saavedra J.E., Morris N.L., Holland R.J., Kosak K.M., et al. The nitric oxide prodrug JS-K is effective against non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo: involvement of reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 336: 313-320.
31. Weyerbrock A., Osterberg N., Psarras N., Baumer B., Kogias E., Werres A., et al. JS-K, a glutathione S-transferase-activated nitric oxide donor with antineoplastic activity in malignant gliomas. *Neurosurgery.* 2011; 70: 497- 510.
32. Kiziltepe T., Hideshima T., Ishitsuka K., Ocio E.M., Raje N., Catley L., et al. JS-K, a GST-activated nitric oxide generator, induces DNA double-strand breaks, activates DNA damage response pathways, and induces apoptosis in vitro and in vivo in human multiple myeloma cells. *Blood.* 2007; 110: 709-718.
33. Ren Z., Kar S., Wang Z., Wang M., Saavedra J.E., Carr B.I. JS-K, a novel non-ionic diazeniumdiolate derivative, inhibits Hep 3B hepatoma cell growth and induces c-Jun phosphorylation via multiple MAP kinase pathways. *J Cell Physiol.* 2003;197(3):426–434.
34. Udupi V., Yu M., Malaviya S., Saavedra J.E., Shami P.J. JS-K, a nitric oxide prodrug, induces cytochrome c release and caspase activation in HL-60 myeloid leukemia cells. *Leuk Res.* 2006; 30(10):1279–1283. 2006. 1224.
35. Liu J., Li C., Qu W., et al. Nitric oxide prodrugs and metallochemotherapeutics: JS-K and CB-3-100 enhance arsenic and cisplatin cytolethality by increasing cellular accumulation. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(6): 709–714.
36. Huang Zh., Wu J., Zou Y., Yuan H., Zhang Y., Fei Y., Bhardwaj A., Kaur J., Knaus E.E., Zhang Y. Glutathione S-Transferase π -Activatable O²-(Sulfonylethyl Derived) Diazeniumdiolates Potently Suppress Melanoma in Vitro and in Vivo. *J. Med. Chem.* 2018; 61(5): 1833–1844. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01178>.
37. Li B., Ming Y., Liu Y., Xing H., Fu R., Li Z., Ni R., Li L., Duan D., Xu J., Li Ch., Xiang M., Song H. and Chen J. Recent Developments in Pharmacological Effect, Mechanism and Application Prospect of Diazeniumdiolates. *Front. Pharmacol.*, 2020; <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00923>.
38. Waheed S., Cheng R.Y.S., Casablanca Y., Maxwell G.L., Wink D.A. and Syed V. Nitric oxide donor DETA/NO inhibits the growth of endometrial cancer cells by upregulating the expression of RASSF1 and CDKN1A. *Molecules.* 2019; 24(20): 3722. PMID: 31623109. DOI: 10.3390/molecules24203722.
39. Kang F., Zhu J., Wu J., Lv T., Xiang H., Tian J., Zhang J., Huang Zh. O²-3-Aminopropyl diazeniumdiolates suppress the progression of highly metastatic triple-negative breast cancer by inhibition of microvesicle formation via nitric oxide-based epigenetic regulation. *Chem Sci.* 2018; 9(34):6893-6898. PMID:30210764. DOI:10.1039/c8sc00167g.
40. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Golubkina N.A. Production of nitrogen oxide derivatives under the influence of NO-synthase inhibitors and natural compounds in mice with transplanted tumors. *Exp Oncol.* 2012; 34 (1):29-33. PMID: 22453145.
41. Das D.S., Ray A., Das A., Song Y., Tian Z., Oronsky B., Richardson P., Scicinski J., Chauhan D., Anderson K.C. A novel hypoxia-selective epigenetic agent RRx-001 triggers apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma cells. *Leukemia.* 2016; 30(11): 2187-2197. DOI: 10.1038/leu.2016.96.
42. Zhao H., Ning S., Scicinski J., Oronsky B., Knox S.J., Peehl D.M. Epigenetic effects of RRx-001: a possible unifying mechanism of anticancer activity. *Oncotarget.* 2015; 6(41):4372-43181.
43. Lee MJ., Tomita Y., Yuno A., Lee S et al. Results from a biomarker study to accompany a phase II trial of RRx-001 with reintroduced platinum-based chemotherapy in relapsed small cell carcinoma. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2021. 30(5) DOI:10.1080/13543784.2021.1863947

44. Knox S.J., Cannizzo L., Warner K., Wardle R., Velarde S., Ning S, inventors; RadioRx, Inc., Alliant Techsystems Inc., assignees. Cyclic nitro compounds, pharmaceutical compositions thereof and uses thereof. United States patent US7507842B2.2009.
45. Ning Sh., Bednarski M., Oronsky B., Scicinski J., Saul G., and Knox S.J. Dinitroazetidines Are a Novel Class of Anticancer Agents and Hypoxia-Activated Radiation Sensitizers Developed from Highly Energetic Materials. *Cancer Res.* 2012; 72(10). DOI: 10.1158/0008-5472.
46. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физикохимия, биология, медицина. - М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2015. 220 с.
47. Vanin A.F., Sanina N.A., Serezhenkov V.A, Burbaev D.S., Lozinsky V.I., Aldoshin S.M. Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands: Spatial and electronic structures. *Nitric Oxide.* 2007; 16(1): 82-93.
48. [Sanina N.](#), [Shmatko N.](#), [Stupina T.](#), [Balakina A.](#), [Terent'ev A.](#) NO-Donor Iron Nitrosyl Complex with N-Ethylthiourea Ligand Exhibits Selective Toxicity to Glioma A172 Cells. *Molecules.* 2017; 22(9):1426. PMID:28850075 DOI:10.3390/molecules22091426.
49. Gordon J.L., Reynolds M.M. and Brown M.A. Nitric Oxide as a Potential Adjuvant Therapeutic for Neuroblastoma: Effects of NO on Murine N2a Cells. *Vet Sci.* 2020; 7(2): 51. DOI: 10.3390/vetsci7020051. PMID: 32340209.
50. [Zhang L.](#), [Hou Sh.](#), [Li B.](#), [Pan J.](#), [Jiang L.](#), [Zhou G.](#), [Gu H.](#), [Zhao C.](#), [Lu H.](#), and [Ma F.](#) Combination of betulinic acid with diazen-1-ium-1,2-diolate nitric oxide moiety donating a novel anticancer candidate. *Onco Targets Ther.* 2018; 11: 361–373. DOI: 10.2147/OTT.S154412. PMID: 29391813.
51. [Chan S.H.](#), [Chui Ch.H.](#), [Chan Sh.W.](#), [Lun-Kok S.H.](#), On [Tang J.Ch.](#) et.al. Synthesis of 8-hydroxyquinoline derivatives as novel antitumor agents. *ACS Med Chem Lett* 2012; 4(2):170-4. PMID: **24900641**. DOI: 10.1021/ml300238z.
52. Zhang Y., Yang J., Meng T., Qin Y. et.al. Nitric oxide- donating and reactive oxygen species-responsive prochelators based on 8-hydroxyquinoline as anticancer agents. *Europ J Med Chem.* 2021; 212. 113153. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021;113153>.
53. [Ren Zh.](#), [Gu X.](#), [Lu B.](#), [Chen Y.](#), [Chen G.](#), [Feng J.](#), [Lin J.](#), [Zhang Y.](#), [Peng H.](#) Anticancer efficacy of a nitric oxide-modified derivative of bifendate against multidrug-resistant cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2016; 20(6):1095-105. DOI: 10.1111/jcmm.12796. PMID: 26864945.
54. Дерягина В.П., Любчанская В.М., Рыжова Н.И. и др. Динамика роста карциномы Эрлиха у мышей F1 под воздействием доноров NO – производных 3-нитробензофурана и 3-нитроиндола. *Российский Биотерапевтический журнал.* 2009; 1: 60-63.
55. [Chegaev K.](#), [Riganti Ch.](#), [Lazzarato L.](#), [Rolando B.](#), [Guglielmo S.](#), [Campia I.](#), [Frutero R.](#), [Bosia A.](#) and [Gasco A.](#) Nitric Oxide Donor Doxorubicins Accumulate into Doxorubicin-Resistant Human Colon Cancer Cells Inducing Cytotoxicity. *ACS Med Chem Lett.* 2011; 2(7): 494–497. DOI: [10.1021/ml100302t](https://doi.org/10.1021/ml100302t).
56. [Liu M-M.](#), [Chen X-Y.](#), [Huang Y-Q.](#), [Feng P.](#), [Guo Y-L.](#), [Yang G.](#), [Chen Y.](#) Hybrids of Phenylsulfonylfuroxan and Coumarin as Potent Antitumor Agents. *J. Med. Chem.* 2014; 57(22): 9343–9356. <https://doi.org/10.1021/jm500613m>.
57. [Zhang Zh.](#), [Bai Zh-W.](#), [Yong Ling](#), [Li-Qin He](#) L-Q., [Huang P.](#), [Gu H-X.](#), [Hu R-F.](#) Design, synthesis and biological evaluation of novel furoxan-based coumarin derivatives as antitumor agents. *Med Chem Res.* 2018; 27:1198–12052018.
58. Shi Zh., Li N., Chen Ch., Wang Y., Lei Zh., LiChen L., Sun J. Novel NO-releasing scopoletin derivatives induce cell death via mitochondrial apoptosis pathway and cell cycle arrest *Eur J Med Chem.* 2020; **V 200**,112386. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112386>.

59. Li N., Xu M., Bao N., Shi W., Li Q., Zhang X., Sun J., Chen L. Discovery of novel NO-releasing celastrol derivatives with Hsp90 inhibition and cytotoxic activities [Eur J Med Chem.](#) 2018; 160: 1-8. DOI:10.1016/j.ejmech.2018.10.013.

60. [Wu J.](#), [Sun T.](#), [Yang Ch.](#), [Lv T.](#), [Bi Y.](#), [Xu Y.](#), [Ling Y.](#), [Zhao J.](#), [Cong R.](#), [Zhang Y.](#), [Wang J.](#), [Wen H.](#), [Jiang H.](#), [Li F.](#), [Huang Zh.](#) Tetrazine-mediated bioorthogonal removal of 3-isocyanopropyl groups enables the controlled release of nitric oxide in vivo. *Biomater Sci.* 2021; 10;9(5):1816-1825. PMID:33458722. DOI: 10.1039/d0bm01841d.

61. [Yang T.](#), [Zelikin A.N.](#), [Chandrawati R.](#) Progress and Promise of Nitric Oxide-Releasing Platforms. *Adv Sci (Weinh).* 2018; 5(6): 1701043. DOI:10.1002/advs.201701043.

62. Bonavida B. Sensitizing activities of nitric oxide donors for cancer resistance to anticancer therapeutic drugs. *Bioch. Pharmacol.* 2020; 176. <https://doi.org/10.101>

Сведения об авторе

Валентина Петровна Дерягина

к.б.н., с.н.с.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ
Москва, Россия

Эл. почта: derygina@inbox.ru

Наталья Ильинична Рыжова

к.б.н., с.н.с.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ
Москва, Россия

Эл. почта: 1124415@mail.ru

Людмила Александровна Савлущинская

к.б.н., н.с.

Эл. почта: blood-research@yandex.ru

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ
Москва, Россия

Лейла Владимировна Кривошеева

к. б. н., в. н. с.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ
Москва, Россия

Эл. почта: lvkrivosheeva@mail.ru

Кирилл Игоревич Кирсанов

д.б.н., рук. лаборатории канцерогенных веществ

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ
Москва, Россия

Эл. почта: Kkirsanov85@mail.ru

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ
Москва, Россия

ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов»
Москва, Россия

Москва, Россия

Information about author

Valentina Petrovna Deryagina

Ph.D., Ph.D.

FSBI N.N. Blokhin NMRCO
Moscow, Russia

E-Mail: derygina@inbox.ru

Natalia Ilyinichna Ryzhova

Ph.D., Ph.D.

FSBI N.N. Blokhin NMRCO
Moscow, Russia

E-Mail: 1124415@mail.ru

Lyudmila Savluchinskaya

Ph.D., Ph.D.

FSBI N.N. Blokhin NMRCO
Moscow, Russia

E-Mail: blood-research@yandex.ru

Leila Vladimirovna Krivosheev

Ph.D., Ph.D.

FSBI N.N. Blokhin NMRCO
Moscow, Russia

E-Mail: lvkrivosheeva@mail.ru

Kirill Kirsanov

D.B., hands. Laboratory of Carcinogenic Substances of the

FSBI N.N. Blokhin NMRCO

Moscow, Russia

E-Mail: Kkirsanov85@mail.ru

FSBI N.N. Blokhin NMRCO

FGAU VO "Russian University of Peoples Friendship"

Moscow, Russia

УДК 616.062
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.24

Е.Г. Сорокина¹, Ж.Б. Семенова², О.В. Карасева²,
В.И., Лукьянов², В.П. Реутов³, С.А. Афанасьева¹,
Л.М. Рошаль², В.Г. Пинелис¹

¹ФГАУ Научный Медицинский исследовательский центр
здоровья детей

²НИИ неотложной детской хирургии и травмы

³Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана

⁴ФГБУН Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РАННИХ И ОТДАЛЕННЫХ ИСХОДОВ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У ДЕТЕЙ

У детей с легкой и тяжелой черепно-мозговой травмой (ЧМТ) исследовали роль различных нейромаркеров повреждения/репарации в исходах перенесенной травмы. Показано, что в первые дни после ЧМТ при неблагоприятных исходах наблюдается значительное увеличение NSE, S100b, продуктов NO и снижение содержания BDNF и аутоантител к NMDA(NR2) рецепторам глутамата (Glu) в сыворотке крови. Спустя 6 мес. при неблагоприятных исходах отмечалось увеличение содержания aAb к S100b и снижение BDNF.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, нейромаркеры повреждения/регенерации аутоантитела к рецепторам глутамата, оксид азота, нитротирозин

E.G. Sorokina¹, Zh.B. Semenova², O.V. Karaseva², V.I. Lukianov²,
⁴ V.P. Reutov⁴, S.A. Afanasieva¹, L.M. Roshal², V.G. Pinelis¹

¹Scientific Medical Research Center of Children's Health

²Research Institute of emergency pediatric surgery and trauma

³Federal Scientific Center for Hygiene. F.F. Erisman

⁴Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS

BIOCHEMICAL PREDICTORS OF EARLY AND LONG-TERM OUTCOMES OF TRAUMATIC BRAIN INJURY IN CHILDREN

In children with mild and severe traumatic brain injury (TBI), the role of various damage/repair neuromarkers in the outcomes of trauma was studied. It has been shown that in the first days after TBI with adverse outcomes, there was a significant increase in NSE, S100b, NO products and a decrease in the content of BDNF and autoantibodies to NMDA (NR2) glutamate receptors (Glu) in the blood serum. After 6 months with unfavorable outcomes, there was an increase in aAb to S100b and a decrease in BDNF.

Keywords: traumatic brain injury, neuromarkers of damage/regeneration, autoantibodies to glutamate receptors, nitric oxide, nitrotyrosine

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) на протяжении многих лет остается ведущей патологией, принося государству огромный социальный и материальный ущерб. Диагностические возможности магнитно-резонансной томографии (МРТ) и компьютерной томографии (КТ) ограничены высокими капитальными затратами и часто не дают информации, которая может предсказать последствия и исход ЧМТ, особенно при легкой ЧМТ. Многие повреждения при легкой ЧМТ остаются незамеченными из-за недостаточной оценки начального неврологического дефицита. Поиск информативных маркеров повреждения головного мозга остается важной задачей для создания прогноза исхода и лечения детей с ЧМТ. Проблемы поиска адекватных маркеров мозга включают потребность в нейромаркерах, которые отражают самую раннюю реакцию мозга и поражения, предшествующие развитию вторичного повреждения после ЧМТ. Необходимо также знание о количественном присутствии в крови больных с различными исходами тяжелой ЧМТ различных

нейромаркеров в отдаленном периоде после травмы. Изучению патогенеза ЧМТ посвящено много обзоров, но роль иммунной системы и окислительного стресса остается недооцененной [1, 2]. Окислительный стресс и повреждение глутаматных рецепторов (GluRc) с развитием аутоиммунного ответа на фрагменты GluRc играют важную роль в патологической цепи реакций вторичного повреждения [3, 4]. Наряду с традиционными нейромаркерами (S100b, NSE), маркеры повреждения головного мозга, такие как аутоантитела (aAb) к GluRc, оксид азота (NO) и его продукт 3-нитротирозин (NT), могут быть полезны для понимания патогенеза ЧМТ и могут указывать на развитие гипоксии и нейровоспаления. Большое значение в исходах ЧМТ может иметь мозговой нейротрофический фактор BDNF [5], а также факторы ревазуляризации - фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и ангиогенин (Ang) [6]).

Материал и методы. У детей, перенесших легкую ЧМТ (ЛЧМТ, 65), среднетяжелую ЧМТ (СТЧМТ, 40) и тяжелую ЧМТ (ТЧМТ, 29) в первые дни и в отдаленном периоде (через 3-6 мес. после травмы) определены аАТ к NR2(NMDA) GluRc, NSE, S100b, аАТ к S100b, BDNF, VEGF-A, Ang, NOx(нитраты+нитриты) и 3-NT. Все показатели определялись иммуноферментными и колориметрическими методами соответствующих тест-систем: аАТ - ООО ДРД (Сколково и Герофарм, Россия) и CIS Biotech (USA), NSE и S100b – CanAg (Швеция), NT - Hycult biotech (USA), NO (NOx = нитраты+нитриты) - Calbiochem (USA), BDNF, VEGF-A и Ang (R&D, USA). Тяжесть ЧМТ определялась по шкале комы Глазго (ШКГ): ЛЧМТ – ШКГ 14-15, СТЧМТ – ШКГ 9-13, ТЧМТ – ШКГ < 9. Исход ЧМТ оценивался по шкале исходов Глазго (ШИГ): полное восстановление – ШИГ 5, инвалидизация легкой и тяжелой степени – ШИГ 4 и ШИГ 3 соответственно, вегетативный статус – ШИГ 2, смерть – ШИГ 1.

Статистическая оценка полученных результатов проведена с помощью программ Statistica v.6 StatSoft Inc., программы Excel Microsoft Corp. и Prizm 6. Проверка на соответствие нормальному закону распределения количественных данных проведена с помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса. В работе определены коэффициенты корреляции (коэффициент гамма непараметрической статистики), проведен дисперсионный непараметрический анализ Kruscal-Wallis Anova Ranks и построены ROC кривые (оценка исхода) для показателей. Статистически достоверными различиями величин считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Травматическое повреждение мозга имеет множество причин и имеет различные по тяжести отдаленные последствия, выражающиеся в расстройстве поведения, развитии судорог и нейродегенеративных заболеваний [7]. ЧМТ причисляют к заболеваниям, при которых происходит быстрое развитие нейродегенерации. Наличие в анамнезе ЧМТ считается риск-фактором для развития болезни Альцгеймера [8]. Установлено, что после ЧМТ у человека отмечалось характерное для болезни Альцгеймера накопление амилоида (A β) в аксонах [9]. Амилоидные бляшки обнаруживаются у 30% пациентов с ЧМТ и, что особенно важно то, что развитие подобной амилоидной бляшки происходит достаточно рано - в течение 3х часов после травмы мозга [10].

Данные, представленные в таблице 1 показывают, что у всех детей, независимо от тяжести ЧМТ, в первые дни увеличивается содержание традиционных маркеров повреждения мозга – NSE и S100b. В наших исследованиях показано, что неблагоприятные исходы тяжелой ЧМТ характеризуются длительным повышением этих показателей, в то время как при легкой ЧМТ нормализация их уровня наступает через 3-6 дней [11]. Точность прогноза для выживаемости пациентов с тяжелой ЧМТ составила 76% (0,76) при уровне белка S100b $\leq 0,25$ мкг/л и уровне NSE < 19 мкг/л [12]. В таблице 2 показано, что, чем тяжелее ЧМТ и менее благоприятный исход, тем выше уровень продуктов NO в крови - NOx и 3-NT. В противоположность указанным

показателям, при неблагоприятных исходах тяжелой ЧМТ отмечался низкий уровень BDNF и аАТ к (NR2)NMDA GluRc (таблица 2 и рис. 1).

Таблица 1. S100b and NSE в сыворотке крови при легкой и тяжелой ЧМТ у детей в первые 15 дней после ЧМТ

(в скобках верхняя граница допустимого уровня в контрольной группе; * - $p < 0,05$ контролем)

ШКГ	ШИГ	Дни после ЧМТ	S100b (< 0,125 мкг/л)	NSE (< 13,0 мкг/л)
Легкая ЧМТ ШКГ 14-15	ШИГ 5 (n= 65)	1	0,25 ± 0,04*	19,07 ± 4,86*
		2-3	0,08 ± 0,01	9,41 ± 2,02
		5-7	0,05 ± 0,01	5,71 ± 0,57
		10-15	0,04 ± 0,01	7,42 ± 0,90
Среднетяжелая ЧМТ ШКГ 9-13	ШИГ 5 (n= 19)	1	0,23 ± 0,044*	20,08 ± 5,01*
		2-3	0,13 ± 0,020	7,42 ± 0,91
		10-15	0,08 ± 0,03	6,52 ± 0,05
	ШИГ 4 (n= 3)	1	0,26 ± 0,09*	32,52 ± 12,29*
		2-3	0,13 ± 0,06	4,9 ± 1,68
		10-14	0,12 ± 0,05	6,87 ± 1,27
Тяжелая ЧМТ ШКГ < 9	ШИГ 5 (n= 7)	1	0,32 ± 0,09*	24,11 ± 8,7*
		2-3	0,11 ± 0,05	5,35 ± 0,60
		5-7	0,12 ± 0,05	7,44 ± 1,60
		10-15	0,06 ± 0,01	6,90 ± 1,50
	ШИГ 4 и 3 (n= 14)	1	0,30 ± 0,10*	26,0 ± 7,70*
		2-3	0,08 ± 0,02	6,30 ± 0,62
		5-7	0,06 ± 0,02	11,3 ± 5,37
		10-15	0,04 ± 0,01	7,43 ± 1,03
	ШИГ 2 (n= 5)	1	0,35 ± 0,15*	28,4 ± 21,2*
		2-3	0,06 ± 0,03	8,4 ± 1,20
		5-10	0,04 ± 0,01	6,5 ± 0,87
		15-75	0,04 ± 0,03	7,27 ± 0,72
	ШИГ 1 (n= 8)	1	0,50 ± 0,29*	25,0 ± 10,0*
		2-3	0,83 ± 0,39*	39,0 ± 17,0*
		5-7	0,98 ± 0,30*	42,9 ± 17,0*
		10-15	0,56 ± 0,30*	23,0 ± 10,0*

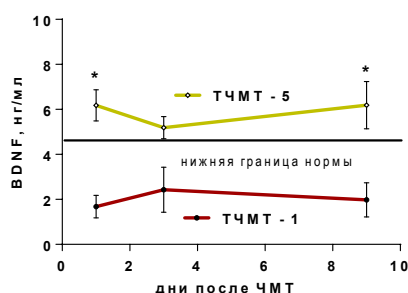


Рис. 1. Содержание нейротрофического фактора BDNF в сыворотке крови при разных исходах тяжелой ЧМТ. ТЧМТ - 5 благоприятный исход, ТЧМТ - 1 неблагоприятный исход; * $p < 0,05$ с ТЧМТ - 1

Таблица 2. Продукты метаболизма NO и аутоантитела к NR2(NMDA) подтипу глутаматных рецепторов в зависимости от тяжести и исходов ЧМТ у детей при различных исходах ЧМТ различной степени тяжести в первые 2 дня после ЧМТ

Показатели в сыворотке/плазме крови	Легкая ЧМТ ШКГ 15 (35)	Среднетяжелая ЧМТ ШКГ 9-13 (21)	Тяжелая ЧМТ ШКГ < 9 (29)
NOx (nitrates+nitrates), $\mu\text{mol/l}$ plasma (10 ± 5 $\mu\text{mol/l}$)	19 ± 2*	32 ± 7*#	90 ± 9,0*# (ШИГ 1) 31 ± 11* (ШИГ 3,4) 14 ± 3 (ШИГ 5)

3-Nitrotyrosine, nmol/l plasma (0 nmol/l/plasma)	13 ± 5*	17 ± 6*	574 ± 60*# (ШИГ 1) 15 ± 6* (ШИГ 2) 152 ± 77*# (ШИГ 3,4) 23 ± 3* (ШИГ 5)
aAT NR2(NMDA), ng/ml serum (< 2,0 ng/ml)	13,13 ± 1,58*	4,57 ± 0,54*#	2,75 ± 1,01# (ШИГ 1) 6,38 ± 1,32*# (ШИГ 3,4) 10,04 ± 2,34* (ШИГ 5)

Таблица 3. Корреляция (по Spearman) содержания нейромаркеров в отдаленном периоде черепно-мозговой травмы с исходом тяжелой ЧМТ (данные представлены в Гамма-коэффициентах; *- достоверная корреляция при $p < 0,05$ выделена жирным красным шрифтом; ШИГ предполагает благоприятный исход)

Показатели	S100b	NSE	BDNF	aAT S100	aAT NR2	VEGF	Ang	ШИГ
S100b	1,000	0,065	0,170	0,023	0,209	0,321*	0,157	-0,013
NSE	0,065	1,000	0,012	0,049	0,062	0,357*	0,050	-0,005
BDNF	0,170	0,012	1,000	-0,381*	0,077	0,194	0,192	0,348*
aAT S100	0,023	0,049	-0,381*	1,000	0,442*	-0,060	0,055	-0,354*
aAT NR2	0,209	0,062	-0,077	0,442*	1,000	-0,029	0,040	-0,024
VEGF	0,321*	0,357*	0,194	-0,060	-0,029	1,000	0,085	-0,105
Ang	0,157	0,050	0,192	-0,055	-0,040	0,085	1,000	-0,050
ШИГ	-0,013	-0,005	0,348*	-0,354*	-0,024	-0,105	-0,050	1,000

Анализируя результаты исследований корреляции между содержанием различных нейромаркеров у детей с тяжелой ЧМТ через 3-6 мес. после травмы мозга, видно, что положительной корреляцией с благоприятным исходом обладает только BDNF, а отрицательной – aAT к S100b (таблица 3, рис. 2). Показано, что, чем выше концентрация NSE и S100b, тем больше возрастает фактор ангиогенеза VEGF-A. Сосудистые нарушения после ЧМТ могут быть связаны с вторичной гипоксией, глутаматной нейротоксичностью с увеличением продуктов оксида азота и нарушений в циклах оксида азота и супероксидного радикала [13, 14].

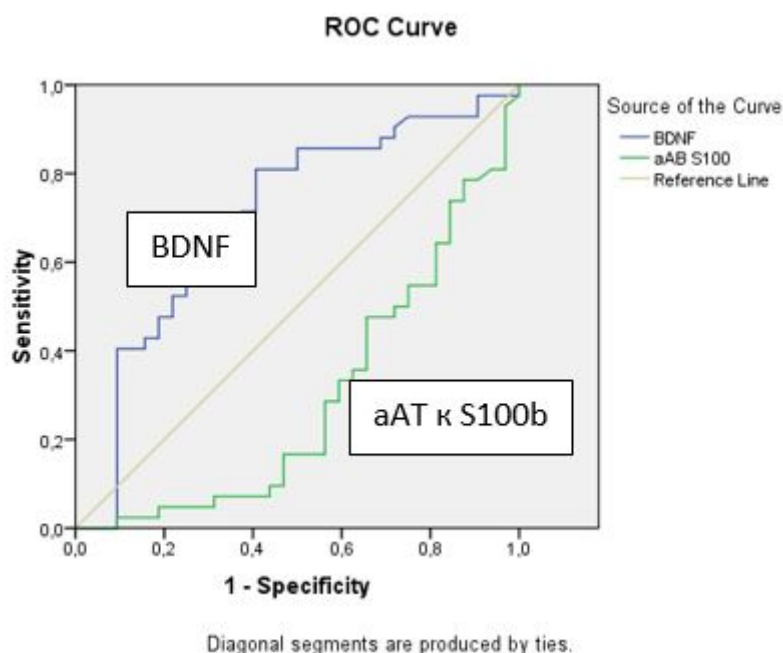


Рис. 2. Показатели (BDNF и aAT к S100b) в ROC кривых, обладающие наибольшей прогностической значимостью в отдаленном периоде черепно-мозговой травмы у детей

Практически у всех детей с тяжелой ЧМТ (95%) в отдаленном периоде отмечается достоверное повышение аАТ к рецепторам глутамата (аАТ NR2), что коррелирует с повышением уровня аАТ к S100b в крови. Мы связываем этот факт с наличием гипоксии мозга, активацией аутоиммунных процессов и повышением проницаемости ГЭБ у детей с тяжелой ЧМТ. В значительной степени развитию аутоиммунного ответа со стороны рецепторов глутамата и повышению проницаемости ГЭБ может способствовать увеличение образования NO, интенсификация окислительных процессов и модификация тирозиновых остатков белков в ходе свободно радикального нитрования тирозина диоксидом азота (NO₂) и образования нитротирозина, что показано в наших предыдущих исследованиях [15, 16, 17]. Поскольку NO₂ является одним из самых активных свободно радикальных соединений, способных окислять/повреждать практически все биохимические соединения, в том числе SH-группы и тирозиновые остатки белков, гуаниновые основания ДНК и ненасыщенные жирные кислоты (окисление осуществляется по двойным химическим связям между атомами углерода –C=C–), то эти повреждения могут иметь отдаленные последствия и приводить к повреждению ГЭБ, а в дальнейшем служить причиной ранних инфарктов миокарда и инсультов мозга.

Авторы считают, что в данной работе получены новые данные о маркерах, имеющих прогностическое значение в раннем и отдаленном периоде ЧМТ у детей. В первые дни после ЧМТ маркерами неблагоприятных исходов при тяжелой ЧМТ являются низкий уровень аАТ к NR2(NMDA) GluRc, увеличение содержания продуктов NO и стойко высокий уровень NSE и S100b. В отдаленном периоде после тяжелой ЧМТ при неблагоприятных исходах в крови обнаруживается низкий уровень BDNF и высокий уровень аАТ к S100b белку, коррелирующий с повышенным содержанием аАТ к NR2(NMDA) GluRc.

Работа поддержана Министерством Здравоохранения России ААА-А19-119012590190-6 травма и частично грантами РНФ и РФФИ

Литература

1. Kumar A, Loane D.J.) Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun.* 2012. V. 26. P 1191–1201.
2. Needham E.J., Helmy A., Zanier E.R., Jones J.L., Coles A.J., Menon D.K. The immunological response to traumatic brain injury. *J Neuroimmunol.* 2019. V. 332. P. 112-125.
3. Mendes Arent A, de Souza L.F., Walz R., Dafre A.L. Perspectives on molecular biomarkers of oxidative stress and antioxidant strategies in traumatic brain injury. *Biomed Res Int.* 2014;2014:723060. doi: 10.1155/2014/723060. Epub 2014 Feb 13.
4. Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Глоба О.В., Карасева О.В., Реутов В.П., Игнатъева Г.А., Афанасьева С.А., Овчаренко Д.С., Хунтеев Г.А., Рошаль Л.М., Пинелис В.Г. Аутоиммунный ответ глутаматных рецепторов и оксид азота при эпилепсии и черепно-мозговой травме. статья в сборнике «Материалы Международной конференции. NT + M&Ec`2020. (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2020. Весенняя сессия. Под редакцией проф. Е.Л. Глоризова). 2020. С. 109–114. DOI: 10.47501/978-5-6044060-0-7.23.
5. Luo, W., Liu, T., Li, S. et al. The serum BDNF level offers minimum predictive value for motor function recovery after stroke. *Transl. Stroke Res.* 2019. V.10. P. 342–351. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0648-5>.
6. Баканов М.И., Васильева Е.М., Санфирова В.М., Семенова Ж.Б., Карасева О.В., Рошаль Л.М. Изменения концентрации в сыворотке крови ключевых факторов ангиогенеза при различных исходах сочетанной травмы у детей. *Ж. Неврологии и психиатрии.* 2017. № 11. С. 79-83.

7. Kovacs S.K., Leonessa F., Ling G.S.F. Blast TBI models, neuropathology, and implications for seizure risk. *Frontiers in Neurology*. 2014. V.5. Article 47. P. 1-11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00047>.
8. Nemetz P.N., Leibson C., Naessens J.M., Beard M., Kokmen E., Annegers J.F., Kurland L.T. Traumatic brain injury and time to onset of Alzheimer's disease: a population-based study. *American Journal of Epidemiology*. 1999. V. 149(1). P.32-40. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009724>
9. Smith D.H., Chen X.H., Iwata A. and Graham D.I. Amyloid beta accumulation in axons after traumatic brain injury in humans. *J. Neurosurg*. 2003. V. 98. P.1072-1077. doi: <https://doi.org/10.3171/jns.2003.98.5.1072>.
10. Roberts G.W., Gentleman S.M., Lynch A., Murray L., Landon M., Graham D.I. Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of the Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1994. V. 57. P. 419-425. <https://doi.org/10.1136/jnnp.57.4.419>.
11. 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. 131. P. 103-107. *Intracranial Pressure and Neuromonitoring XVII* (eds. B. Depreitere et al. Springer Nature Switzerland AG 2021). https://doi.org/10.1007/978-3-030-59436-7_22.
12. Meshcheryakov S.V., Semenova Zh.B., Lukianov V.I., Sorokina E.G., Karaseva O.V. Prognosis of Severe Traumatic Brain Injury Outcomes in Children. *Acta Neurochir*. 2018. Suppl. 126. P. 11-16. doi: 10.1007/978-3-319-65798-1_3.
13. Реутов В.П., Самосудова Н.В., Сорокина Е.Г. Модель глутаматной нейротоксичности и механизма развития типового патологического процесса. *Биофизика*. 2019. Т. 64. С. 316-336.
14. 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.
15. Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Bazarnaya N.A., Meshcheryakov S.V., Reutov V.P., Goryunova A.V., Pinelis V.G., Granstrem O.K., Roshal L.M. Autoantibodies to glutamate receptors and products of nitric oxide metabolism in serum in children in the acute phase of craniocerebral trauma. *Neurosci Behav Physiol*. 2009. V.39(4). P.329-334. <https://doi.org/10.1007/s11055-009-9147-1>.
16. Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Гранстрем О.К., Карасева О.В., Мещеряков С.В., Реутов В.П., Сушкевич Г.Н., Пинелис В.Г., Рошаль Л.М. Белок S100B и аутоантитела к нему в диагностике повреждений мозга при черепно-мозговой травме у детей. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2010;(8): 25-30.
17. Закиров Р.Ш., Сорокина Е.Г., Карасёва О.В., Семёнова Ж.Б., Петричук С.В., Рошаль Л.М., Пинелис В.Г. Функциональное состояние лимфоцитов периферической крови при черепно-мозговой травме у детей. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015. Т. 70. № 6. С. 710-717.

Сведения об авторах

Елена Геннадьевна Сорокина
канд. биол. Наук, вед. науч. сотр.
ФГАУ «Научный Медицинский исследовательский центр здоровья детей»
Москва, Россия
Эл. почта: sorokelena@mail.ru

Information about authors

Elena Gennadievna Sorokina
Ph.D., leading researcher
Scientific Medical Research Center of Children's Health
Moscow, Russia
E-mail: sorokelena@mail.ru

Жанна Борисовна Семенова

д-р мед. наук, проф., рук. отд. Нейротравмы
НИИ неотложной детской хирургии и травмы

Москва, Россия

Эл. почта: j.seman@mail.ru

Валерий Иванович Лукьянов

старший научный сотрудник

НИИ неотложной детской хирургии и травмы

Москва, Россия

Эл. почта: vallukianov@yandex.ru

Ольга Витальевна Карасева

д-р мед. Наук, зав. отд. Реанимации

НИИ неотложной детской хирургии и травмы

Москва, Россия

Эл. почта: karaseva.o@list.ru

Софья Анатольевна Афанасьева

лаборант-исследователь

ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»

Москва, Россия

Эл. почта: afsonia11@yandex.ru

Валентин Палладиевич Реутов

д-р биол. наук, вед. науч. сотр.

ФГБУН Институт высшей нервной деятель-
ности и нейрофизиологии РАН

Москва, Россия

Эл. почта: valentinreutov@mail.ru

Леонид Михайлович Рошаль

д-р мед. наук, проф., президент института

НИИ неотложной детской хирургии и травмы

Москва, Россия

Эл. почта: lmroshal@mail.ru

Всеволод Григорьевич Пинелис

д-р биол. наук, профессор, главн. науч. сотр.

ФГАУ «Научный Медицинский исследова-
тельский центр здоровья детей» Минздрава
России

Москва, Россия

Эл. почта: pinelis@mail.ru

Zhanna Borisovna Semenova

MD, professor

Research Institute of emergency pediatric surgery and
trauma

Moscow, Russia

E-mail: j.seman@mail.ru

Valery Ivanovich Lukianov

senior researcher

Research Institute of emergency pediatric surgery and tra-
ma

E-mail: vallukianov@yandex.ru

Olga Vital'evna Karaseva

MD, head of the intensive care unit

Research Institute of emergency pediatric surgery and
trauma

Moscow, Russia

E-mail: karaseva.o@list.ru

Sofya A. Afanasieva

research assistant

Scientific Medical Research Center for Children's
Health

Moscow, Russia

e-mail: afsonia11@yandex.ru

Reutov Valentin Palladievich

Dr. biol. Sciences, leading researcher

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiol-
ogy RAS

Moscow, Russia

E-mail: valentinreutov@mail.ru

Leonid Michailovich Roshal

Dr. med. Sciences, Professor, President of the Institute

Research Institute of emergency pediatric surgery and trauma

Moscow, Russia

E-mail: lmroshal@mail.ru

Vsevolod Grigorievich Pinelis

Professor

Chief Researcher

Scientific Medical Research Center of Children's
Health" Ministry of Health of Russia

Russia, Moscow

E-mail: pinelis@mail.ru

СОЗДАНИЕ РОССИЙСКИХ ОРИГИНАЛЬНЫХ АНТИАРИТМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ III КЛАССА: ОТ СУБСТАНЦИИ ДО ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

В статье сообщается о разработке отечественных антиаритмических препаратов III класса.

Ключевые слова: Нибентан, ниферидил, рефралон, антиаритмические препараты III класса

N. Davydova

A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds RAS

DISCOVERY OF RUSSIAN ORIGINAL CLASS III ANTIARRHYTHMIC DRUGS: FROM ACTIVE INGREDIENT TO PHARMACEUTICAL FORM

This paper summarizes data on research and development of Russian original class III antiarrhythmic drugs.

Keywords: Nibentan, niferidyl, refralon, class III antiarrhythmic drugs

Медикаментозное лечение аритмии сердца является одной из наиболее актуальных проблем современной кардиологии.

С конца 80-х годов XX-го века начался поиск антиаритмических препаратов (ААП) III класса, обусловленный появлением данных об увеличении риска смертности пациентов из-за развития угрожающих жизни побочных аритмогенных эффектов при применении ААП I класса [1].

Все существующие в то время ААП проявляли и другие значимые побочные эффекты. Например, амиадорон, обладающий свойствами всех четырех классов ААП, был рекомендован только для лечения опасных для жизни аритмий из-за высокой вероятности развития множества экстракардиальных и других побочных эффектов [2].

Отсутствие эффективных и безопасных антиаритмических средств послужило поводом к многочисленным исследованиям в последующие годы, в результате которых были синтезированы и исследованы ААП III класса: дофетилид, сематилид, ибутилид и многие другие [3-5]. Но существенных результатов достигнуто не было в связи с трудностью получения препаратов селективного действия, что позволило бы избежать проаритмических побочных эффектов в виде полиморфной желудочковой тахикардии.

Целью проводимых в России исследований было создание ААП III класса, обладающих высокой эффективностью, безопасностью и избирательностью действия.

Нами были разработаны, внедрены в производство и медицинскую практику оригинальные ААП III класса нибентан (гидрохлорид (RS)-4-нитро-N-[1-фенил-5-(диэтиламино)пентил]бензамида (1), рис.1) [6-10] и ниферидил (гидрохлорид 4-нитро-N-[(1RS)-1-(4-фторфенил)-2-(1-этилпиперидин-4-ил)этил]бензамида (2), рис.1), зарегистрированный под торговым названием Рефралон (рег. № ЛП-002510 от 24.06.2014) [11-13].

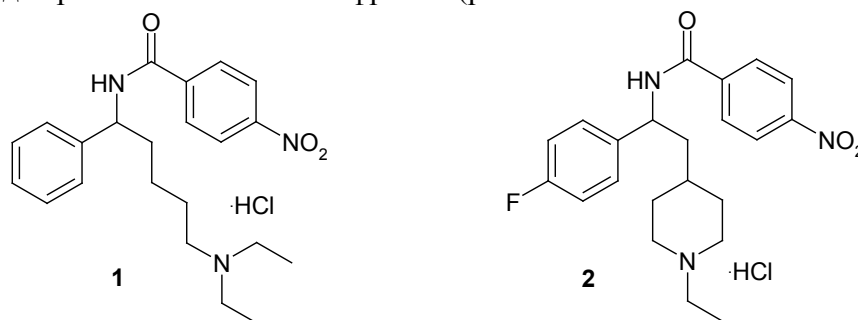


Рис.1. Структурные формулы субстанций нибентана (1) и ниферидила (2)

Электрофизиологический механизм антиаритмического действия нибентана и ниферидила, как и других ААП III класса, основан на подавлении выходящего калиевого тока замедленного выпрямления I_K , вследствие чего увеличивается продолжительность фазы реполяризации потенциала действия кардиомиоцитов и происходит удлинение рефрактерных периодов предсердий и желудочков сердца без влияния на проводимость.

Первичное исследование антифибрилляторной активности нибентана и ниферидила проведено на модели порога электрической фибрилляции сердца на кошках обоего пола массой 2-3,5 кг, наркотизированных этиминал-натрием (40 мкг/кг внутривенно). Фибрилляцию сердца вызывали по стандартной методике путем нанесения на поверхность миокарда левого желудочка электрического раздражения (20 стимулов, по 20 мс каждый, 50 Гц, стимулятор HSE 215, Германия). За исходный порог фибрилляции

принимали минимальное значение электрического тока в мА, которое вызывает фибрилляцию. Дефибрилляцию осуществляли с помощью дефибриллятора ДИ-03. Фибрилляцию желудочков регистрировали по ЭКГ. Порог фибрилляции желудочков определяли многократно до его стабилизации на уровне 1-2 мА до введения изучаемых соединений и известных ААП III класса [12,13].

Сравнительная антифибрилляторная активность и длительность действия нибентана, ниферидила и препаратов сравнения: сематилида и дофетилида, в дозах от 5 до 100 мг/кг, представлена на рис. 2. Только одно вещество вводилось одному животному. Порог фибрилляции левого желудочка измеряли до введения и через 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 мин. после внутривенного введения веществ. В контрольной группе животных, получавших плацебо (1 мл физиологического раствора), порог фибрилляции практически не изменялся.

Таким образом, доза ниферидила, при которой начинает изменяться порог фибрилляции, в 100 раз меньше, чем у сематилида, в 25 раз меньше, чем у нибентана, и сопоставима с дофетилидом.

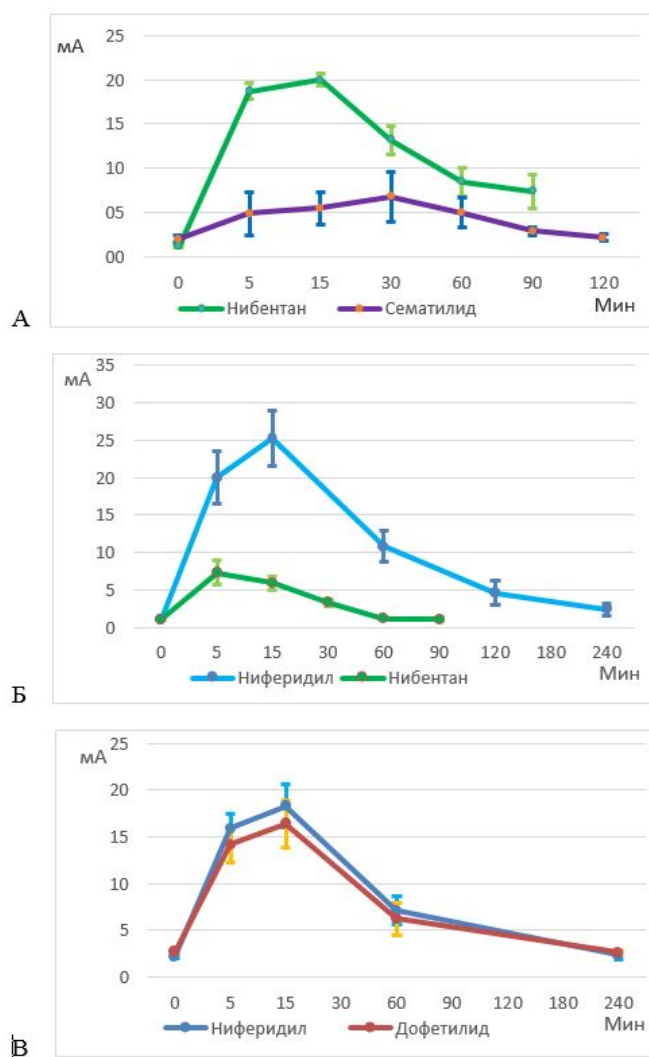


Рис.2. Сравнительная антифибрилляторная активность при внутривенном введении препаратов у наркотизированных кошек: А – нибентана и сематилида (доза 100 мг/кг), Б - ниферидила и нибентана (доза 25 мг/кг), В – ниферидила и дофетилида (доза 5 мг/кг)

Ниферидил обладает более высокой антиаритмической активностью и меньшей токсичностью, чем нибентан (табл.1), не проявляет алергизирующих свойств, не канцерогенен, не обладает мутагенными и тератогенными свойствами и эмбриотоксическим действием, что открывает возможности для его выпуска не только в инъекционной, но и в твердой лекарственной форме [13-18].

Таблица 1. Антиаритмическая активность и острая токсичность нибентана и ниферидила [18]

Соединение (n – число животных)	Доза, мг/кг	Продолжительность действия, мин.	LD ₅₀ , мыши, мг/кг
Нибентан n=16	25.0	60	37.0
Ниферидил n=18	5.0	> 240	76.0

Ниферидил в дозе 20 мкг/кг увеличивает рефрактерность предсердий на 40-45 мс, тогда как нибентан увеличивает рефрактерность предсердий на 15-20 мс в дозе 125 мкг/кг [12]. Таким образом, ниферидил в меньшей дозе, чем нибентан, в 2-3 раза увеличивает рефрактерность и влияет преимущественно на рефрактерность предсердий, в результате чего вероятность возникновения проаритмических побочных эффектов уменьшается.

После завершения доклинических и клинических исследований на базе ФГБУ "НМИЦ кардиологии" Минздрава России нибентан и ниферидил были внедрены в медицинскую практику для восстановления синусового ритма при фибрилляции и трепетании предсердий в условиях палат интенсивной терапии в стационарах [18,19]. Работа по созданию первого отечественного ААП III класса нибентана была удостоена Государственной премии РФ.

Благодарности. Давыдова Н.К. благодарит за поддержку Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература

1. Singh S. N., Tang X. C., Singh B. N. et al. Quality of life and exercise performance in patients in sinus rhythm versus persistent atrial fibrillation: a Veterans Affairs Cooperative Studies Program Substudy // J. Am. Coll. Cardiol. 2006, 48 (4): 721-730.
2. Mason J.W. Amiodarone // N. Engl. J. Med. 1987, 316(8): 455-466.
3. McClellan K. J., Markham A. Dofetilide: a review of its use in atrial fibrillation and atrial flutter // Drugs. 1999, 58(6): 1043-1059.
4. Ishii Y., Muraki K., Kurihara A. et al. Effects of Sematilide, a Novel Class III Antiarrhythmic Agent, on Delayed Rectifier K⁺ Current in Guinea Pig Atrial Myocytes // Jpn. J. Pharmacol. 1996, 71 (4): 361-365.
5. Howard P. A. Ibutilide: an antiarrhythmic agent for the treatment of atrial fibrillation or flutter // Ann. Pharmacother. 1999, 33 (1): 38-47.
6. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. URL: <http://zdravmedinform.ru/grls/reg-r-n003356-01.html>
7. 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.
8. 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.
9. Davydova N.K., Fominova O.S., Glushkov R.G. 26th National Chemistry Congress, Muğla, Turkey. Abstract Book for Organic Chemistry 2012, P.77.
10. Davydova N.K. IV Interdisciplinary Conference "Biologically active substances and materials: fundamental and applied problems of production and application", Novy Svet, AR Crimea, Ukraine. Book of Abstracts 2013, P.107-108.
11. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. URL: <http://zdravmedinform.ru/grls/reg-lp-002510.html>

12. Гидрохлорид N-1-[(4-фторфенил)-2-(1-этил-4-пиперидил)этил]-4-нитробензамида, 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.

13. 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): 3-12; Pharm. Chem. J. 2011, 45(2): 65 – 74.

14. Давыдова Н.К., Глушков Р.Г. Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием, Москва, Россия. Сборник тезисов докладов 2013, С.50.

15. Davydova N.K., Skachilova S.Ya., Sergeev V.N. 5th International Conference on Recent Advances in Health and Medical Sciences. Paphos, Cyprus. Book of Abstracts 2014, P.18.

16. Davydova N.K., Sergeev V.N. 21st European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationship (21st EuroQSAR 2016), Verona, Italy. Book of Abstracts 2016, P.136.

17. Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Желтухин Н.К. и др. Лекарственные препараты, разработанные АО «ВНЦ БАВ» под руководством академика М.Д. Машковского (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств 2019, 8(1): 7-13; Drug development and registration 2019, 8(1): 7 – 13.

Давыдова Н.К. Разработка субстанций оригинальных антиаритмических препаратов III класса нибентана и ниферидила // Хим.-фарм. журн. 2019, 53(9): 15-19; Pharm. Chem. J. 2019, 53(9): 792-796.

19. Майков Е.Б. Автореферат дис. докт. мед. наук. М., 2014, 49 С.

Сведения об авторе

Надежда Константиновна Давыдова

канд. хим. наук, ст. науч. сот.

Институт элементоорганических соединений им.

А.Н.Несмеянова РАН

Москва, РФ

Эл. почта: davydova@ineos.ac.ru

Information about author

Nadejda Davydova

Senior Research Scientist

A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Com-

pounds Russian Academy of Sciences (INEOS RAS)

Moscow, Russia

E-mail: davydova@ineos.ac.ru

УДК 61:615.27, 615.272
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.26

Д.А. Халикова, С.В. Аньков, Т.Г. Толстикова
Новосибирский институт органической химии
им. Н.Н.Ворожцова СО РАН

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕВЗЕИ И ШРОТА КЛЮКВЫ НА УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ

Установлено, что композиция экстрактов Левзеи и Шрота клюквы в эффективной дозе 35:250 мг/кг после 14 дневного перорального введения мышам способствует достоверному снижению уровня глюкозы на фоне физической и глюкозной нагрузки в сравнении с интактным контролем.

Ключевые слова: *экстракт, левзея, шрот клюквы, бег на тредмиле, уровень глюкозы, мышцы*

EFFECT OF RHAPONTICUM CARTHAMOIDES AND CRANBERRY MEAL EXTRACTS COMPOSITION ON GLUCOSE LEVEL

*It has been found that *Rhaponticum carthamoides* and cranberry meal extracts composition at an effective dose of 35:250 mg/kg after 14 days of oral administration to mice promotes a significant glucose level reduction on the background of physical and glucose challenge compared to intact control.*

Keywords: *extract, leuzea, cranberry meal, treadmill running, glucose level, mice*

Введение

В настоящее время, как в Российской Федерации, так и во всем мире наблюдается интенсивное развитие профессионального и любительского спорта. Для спортсменов, которые занимаются длительными, регулярными тренировками и стремятся увеличить свою выносливость и работоспособность важно, чтобы организм успевал восстанавливаться после долгих физических нагрузок. Включение в программу питания спортсменов дополнительных биологически активных добавок (БАД), содержащих ингредиенты растительного происхождения, существенно способствуют восстановлению жизненно важных ресурсов [1, с. 33-37].

Целью настоящего исследования является изучение фармакологических свойств новой композиции экдистена и урсоловой кислоты, содержащихся в экстрактах левзеи и шрота клюквы.

Природным источником получения фитогормона экдистена является Левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*), а источником пентациклического тритерпена урсоловой кислоты - кожура зелёных яблок, шрот брусники, клюквы, облепихи и различные растения (базилик, боярышник, толокнянка, рододендрон и другие) [2, с. 2016-2031].

На сегодняшний день существуют БАДы, содержащие только либо экстракт левзеи, применяемый для повышения работоспособности и увеличения мышечной массы [3, с.117; 4, с. 277-282], либо экстракт шрота растительных источников, содержащих урсоловую кислоту, которая стимулирует рост мышц на фоне физической нагрузки, а также проявляет противовоспалительное [5, с. 21-33], антиоксидантное [6, с. 1640-1644], органопротекторное действие [7, с. 131-133; 8, с. 297-303].

Материалы и методы исследования

Исследования проводили на мышах линии C57BL/6 обоих полов весом 20-25г и мышах линии CD-1, самцах массой 25-30 г. Животные были получены из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН и содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и стандартному гранулированному корму. 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. В каждой серии экспериментов животных после карантина рандомизировали по весу и разделяли на группы по 8-9 мышей в каждой.

Исследования проводили в трёх сериях:

В *первой* серии мыши линии C57BL/6 обоих полов были разделены на 3 группы:

1 группа – интактные водно-твиновый раствор

2 группа – экстракт левзеи + экстракт шрота клюквы в дозе 170 мг/кг + 50 мг/кг

3 группа – экстракт левзеи в дозе 170 мг/кг

Во *второй* серии мыши линии C57BL/6, самки были разделены на 3 группы:

- 1 группа – интактные водно-твиновый раствор
 - 2 группа – экстракт левзеи + экстракт шрота клюквы в дозе 35 мг/кг + 250 мг/кг
 - 3 группа – экстракт шрота клюквы в дозе 250 мг/кг
- Длительность первых двух серий эксперимента составила 4 недели (28 дней).

В *третьей* серии мыши линии CD-1, самцы были разделены на 5 групп:

- 1 группа – интактные водно-твиновый раствор (без физической нагрузки)
 - 2 группа – интактные водно-твиновый раствор
 - 3 группа – экстракт левзеи + экстракт шрота клюквы в дозе 170 мг/кг + 50 мг/кг
 - 4 группа – экстракт левзеи + экстракт шрота клюквы в дозе 35 мг/кг + 250 мг/кг
 - 5 группа – экстракт шрота клюквы с нагрузкой в дозе 250 мг/кг
- Длительность эксперимента составила 2 недели (14 дней).

Исследуемые соединения: экстракт шрота клюквы, содержащий 40% урсоловой кислоты (ОХП НИОХ СО РАН) и экстракт левзеи сафлоровидной, содержащий 0.31% эхдистена («ООО Экстракты Алтай», г. Барнаул).

Экстракты смешивали механически и растирали в ступке с добавлением дистиллированной воды и твина 80. Все исследуемые вещества вводили ежедневно в виде водно-твиновой суспензии внутривентриально по 0,2 мл на 10 г мыши. Животные контрольной группы получали эквивалентные объёмы растворителя (водно-твинового раствора).

На протяжении всех серий эксперимента отслеживали изменения массы тела животных. В конце каждой недели проводили измерение концентрации глюкозы крови натощак (12 часов голода) с использованием глюкометра OneTouch Select Plus Flex (LIFESCAN Inc., США).

В конце третьей серии эксперимента оценивали уровень глюкозы на фоне глюкозной и физической нагрузки в тесте бег на шестидорожечном тредмиле FT-200, ChengduTechnologyandMarketCo., Ltd (Китай) [9, с. 306–316], без предварительной подготовки животных. Всем группам натощак (12 часов голода) проводили пероральную нагрузку глюкозой (2,5 мг/кг), после чего мышей помещали на ленту тредмила. Время бега составила 10 минут со скоростью движения ленты 10 м/мин и углом наклона 10°. Концентрацию глюкозы крови определяли в динамике: перед пероральным введением глюкозы (0 мин), и через 30, 60, 90, 120 мин после её введения. На основании полученных данных построили график гликемической кривой. Площадь под гликемической кривой рассчитывали согласно [10, с. 152-154].

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 8.0 с применением t-критерия для оценки достоверности различий. Данные представлены в формате: среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SE). Сравнения между группами проводили при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U Test). За достоверный уровень значимости принимали $p \leq 0.05$.

Результаты

На основании данных изучения влияния композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы на динамику изменения массы тела и уровня глюкозы крови натощак в трёх сериях экспериментов ни в одной группе не было выявлено увеличения массы тела, а также изменения уровня глюкозы по сравнению с исходными данными.

По результатам перорального теста толерантности к глюкозе (OGTT) на фоне физической нагрузки получили гистограмму, где величина столбца соответствует площади под кривой (Рис. 1). Данная площадь показывает время нахождения вещества в крови (чем ниже столбец, тем выше сопротивляемость и тем лучше толерантность к глюкозе).

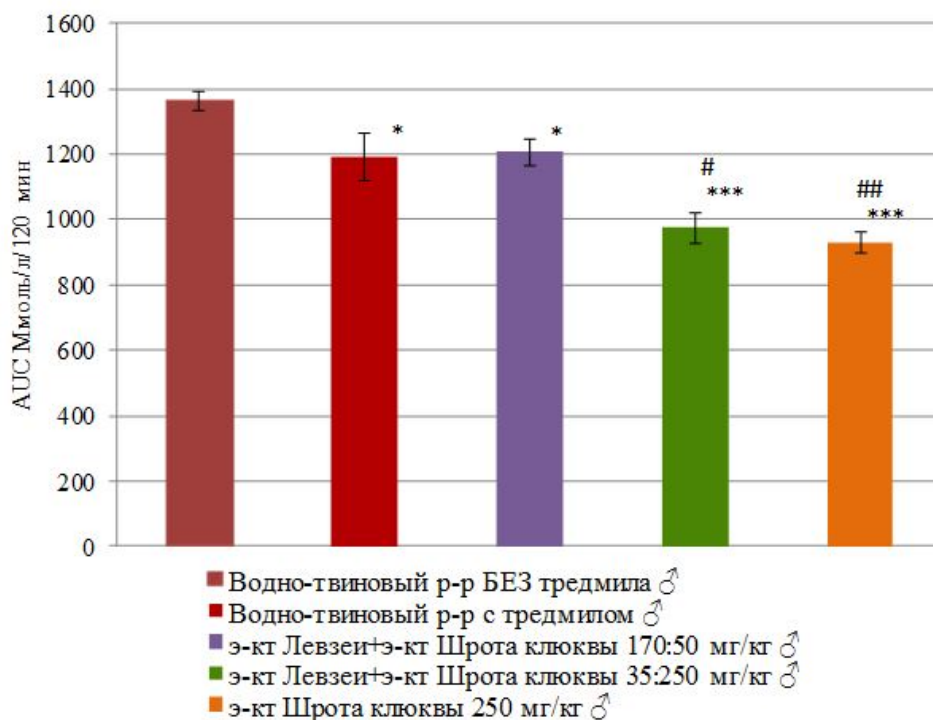


Рисунок 1. Результаты ОГТТ. Площадь под гликемической кривой (AUC).

Примечание: * - достоверность различий по отношению к контрольной группе (ВТР БЕЗ тредмила) при $p \leq 0,05$; ** - при $p \leq 0,005$; ***- при $p \leq 0,0005$. # - достоверность различий по отношению к контрольной группе (ВТР с тредмилом) при $p \leq 0,05$; ## - при $p \leq 0,005$.

В тесте бег на тредмиле было установлено, что композиция экстрактов Левзеи и Шрота клюквы в дозе 35:250 мг/кг, а также экстракт Шрота клюквы в дозе 250 мг/кг эффективней снижают уровень глюкозы крови по сравнению с интактным контролем без и с физической нагрузкой (тредмил).

Выводы

1. Введение композиций экстрактов левзеи и шрота клюквы разных соотношений не оказывают влияния на массу тела, уровень глюкозы натощак без нагрузки у мышей линий C57BL/6 и CD-1 обоего пола. Таким образом, различие по гендерному признаку не было обнаружено.

2. После 14-дневного введения на фоне глюкозной и физической нагрузки композиции экстрактов Левзеи и Шрота клюквы в дозе 35:250 мг/кг, а также экстракт Шрота клюквы в дозе 250 мг/кг у самцов линии CD-1 достоверно снижали уровень глюкозы на 18,1 и 21,9% соответственно по отношению к водно-твиновому контролю с физической нагрузкой.

Таким образом, на основании скрининга выявлено эффективное соотношение композиции экстрактов Левзеи и Шрота клюквы – 35:250 мг/кг, содержащих 105 мкг/кг экидистена и 100 мг/кг урсоловой кислоты.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые проведены исследования влияния композиции экстрактов левзеи и шрота клюквы, содержащих экидистен и урсоловую кислоту на физическую выносливость у мышей. Определена наиболее эффективная доза композиции 35:250 мг/кг, что в пересчете на действующие вещества составляет 105 мкг/кг экидистена и 100 мг/кг урсо-

ловой кислоты, которая после 14 дневного перорального введения способствовала достоверному снижению уровня глюкозы на фоне физической и глюкозной нагрузки в сравнении с интактным контролем.

Литература

1. Арансон М.В., Португалов С.Н. Спортивное питание: состояние вопроса и актуальные проблемы // Вестник спортивной науки, 2011. №1. С. 33-37.
2. Jager S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 2009. V14. P. 2016-2031.
3. Богданова Т.Б. Влияние Левзеи сафлоровидной на физическую выносливость спортсменов. Материалы IX Всероссийской с международным участием конференции с элементами научной школы по физиологии мышц и мышечной деятельности посвященной памяти Е.Е. Никольского Москва, 2019. С. 117.
4. Богданова Т.Б., Уколова А. Э. Влияние Левзеи сафлоровидной на физическую работоспособность спортсменов, занимающихся фитнес-аэробикой. *Научный альманах*, 2017. С. 277-282
5. Kashyap D, Sharma A, Tuli HS, Punia S, Sharma AK. Ursolic acid and oleanolic acid: pentacyclic terpenoids with promising anti-inflammatory activities. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2016. V10. P. 21-33.
6. Liobikas J, Majiene D, Trumbeckaite S, Kursvietiene L, Masteikova R, Kopustinskiene DM, Savickas A, Bernatoniene J. Uncoupling and antioxidant effects of ursolic acid in isolated rat heart mitochondria. *J Nat Prod*, 2011. V74. P. 1640-1644.
7. Senthil S, Chandramohan G, Pugalendi KV. Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Int J Cardiol*, 2007. V119. P. 131-133.
8. Sundaresan A, Radhiga T, Pugalendi KV. Effect of ursolic acid and Rosiglitazone combination on hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed C57BL/6J mice. *Eur J Pharmacol*, 2014. V741. P. 297-303.
9. Dougherty M.R., Hamovitz T., Tidwell J. W. Reevaluating the effectiveness of n-back training on transfer through the bayesian lens: support for the null // *Psychonomic Bulletin & Review*, 2016. V23. P. 306–316.
10. Tai M.M. A Mathematical Model for the Determination of Total Area Under Glucose Tolerance and Other Metabolic Curves // *Diabetes care*, 1994. V17. N2. P. 152-154

Сведения об авторах

Халикова Дарья Александровна

Аспирант

Новосибирский институт органической химии Новосибирск, Россия

Эл. почта: dasha.halikova@mail.ru

Аньков Сергей Владимирович

к. б. н., научный сотрудник

Новосибирский институт органической химии Новосибирск, Россия

Эл. почта: sergey.ankov42@gmail.com

Толстикова Татьяна Генриховна

д. б. н., проф., зав. Лаборатории

Новосибирский институт органической химии Новосибирск, Россия

Эл. почта: tg_tolstikova@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

Tatiana Genrikhovna Tolstikova

Professor

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry
Novosibirsk, Russia*

E-mail: tg_tolstikova@mail.ru

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКТ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО И
ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ: ТЕХНОЛОГИЯ,
ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА

В работе представлены технология и состав специализированного пищевого продукта для лиц с нарушениями углеводного и липидного обмена с включением функционального пищевого ингредиента гипогликемического и гипохолестеринемического действия – комплекса полифенолов ягод черники, сорбированных на гречневой муке.

Ключевые слова: диабет, метаболический синдром, ожирение, полифенолы, гипогликемическое действие, гипохолестеринемическое действие, функциональный пищевой ингредиент, специализированный пищевой продукт

Kochetkova A.A., Petrov N.A., Vorobyeva V.M., Vorobyeva I.S.,
Biryulina N.A., Zorin S.N., Mazo V.K.
Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology

SPECIALIZED FOOD PRODUCT WITH HYPOCHOLESTEROLEMIC AND
HYPOGLYCEMIC EFFECT: TECHNOLOGY AND COMPOSITION
CHARACTERIZATION

The paper presents the technology and composition of a specialized food product for persons with disorders of carbohydrate and lipid metabolism with the inclusion of a functional food ingredient of hypoglycemic and hypocholesterolemic action - a complex of bilberry polyphenols sorbed on buckwheat flour.

Keywords: diabetes, metabolic syndrome, obesity, polyphenols, hypoglycemic action, hypocholesterolemic action, functional food ingredient, specialized food product

Введение. Нарушения углеводного обмена ведут к развитию ряда алиментарно-зависимых заболеваний и, в первую очередь, таких социально-значимых как сахарный диабет 2 типа, метаболический синдром (МС), ожирение. Профилактика и диетотерапия указанных заболеваний и сопутствующих им клинических проявлений предполагают включение в рационы питания лиц, входящих в группу риска, специализированных пищевых продуктов (СПП), эффективность которых определяется наличием в их составах пищевых ингредиентов, содержащих биологически активные вещества, проявляющие гипогликемическое действие. В клинической нутрициологии широко обсуждаются гипогликемические свойства полифенольных соединений растительного происхождения, подтвержденные как вековым опытом традиционной народной медицины, так и результатами современных клинических исследований, а также опытами *in vivo* с использованием соответствующих моделей [1, с.4;2, с. 581]. При этом подчеркивается, что важным условием повышения профилактической эффективности полифенольных соединений, ограничиваемой низкой усвояемостью, является возможное увеличение их содержания в СПП, достигаемое широким спектром технологических решений, касающихся состава и физико-химических свойств пищевой матрицы [3, с. 12189].

Целенаправленное извлечение и концентрирование полифенолов может быть осуществлено сорбцией из содержащих их экстрактов на биополимерной матрице с дальнейшим использованием в качестве пищевого ингредиента. Этот эффективный и относительно простой технологический подход был использован нами для получения пищевых матриц на основе гречневой муки, обогащенных полифенолами листьев черники [4, с. 336]

Цель данного исследования - получить и охарактеризовать специализированный пищевой продукт с высоким содержанием полифенолов, предназначенный для питания лиц с нарушениями углеводного обмена.

Материалы и методы исследования. Опытный образец гречневой муки получен измельчением промышленной партии пищевой муки (ООО «ХлебЗерноПродукт», Россия, г. Таганрог). Размер частиц муки определяли методом электронно-сканирующей микроскопии [4, с. 335]. Средний размер частиц составил $(134,9 \pm 3,9)$ мкм. Массовая доля белка в образце составила 9,7%, углеводов – 70,0%, золы - 1,6%, влажность – 5,5%. Ягоды черники (ООО «Мир заморозки», Россия) предварительно высушены на лиофильной сушке ЛС-500 (ООО «ПРОИНТЕХ», Россия).

Содержание общих полифенолов в анализируемых образцах определяли спектрофотометрически по методу Фолина-Чокальтеу [5, с. 28]. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 765 нм, в качестве стандарта использовали галловую кислоту (97,5%, Sigma, США). Суммарное содержание антоцианинов в пересчете на цианидин-3-глюкозид оценивали методом рН-дифференциальной спектрофотометрии с помощью спектрофотометра "Shimadzu UV-1800" (Shimadzu Corporation, Япония) с диапазоном длин волн 190-1100 нм. Профиль индивидуальных антоцианинов исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы, состоящей из жидкостного хроматографа "Agilent 1100" (Agilent Technologies, США), дегазатора, бинарного насоса, термостата колонок, автосамплера, диодно-матричного спектрофотометрического детектора [6, с. 70].

Получение пищевого ингредиента и его органолептическая оценка. Экстракт ягод черники получали в две последовательные стадии, перемешивая навески сухих ягод с 75% этиловым спиртом в соотношении 1г ягод/20 мл экстрагента при первой стадии и 1г ягод/10 мл экстрагента при второй стадии в течение 1 часа (на каждой стадии) при температуре 25°C. По окончании каждой стадии полученную смесь центрифугировали в течение 1 часа при 4000 об/мин (центрифуга Beckman J-6B, США) и отбирали супернатант. Супернатанты, полученные на обеих стадиях, объединяли и концентрировали на установке обратного осмоса с фильтром рулонным мембранным «УРФ-1812» («ВЛАДИСАРТ», РФ), после чего удаляли спирт на роторном испарителе. Содержание полифенолов в экстракте после концентрирования на установке обратного осмоса составляло $21,3 \pm 0,7$ мг-экв. галловой кислоты/мл экстракта. Процесс сорбции полифенолов экстракта ягод на гречневой муке вели при постоянном перемешивании смеси экстракта ягод и гречневой муки в соотношении 15:1 в течение 1 часа при температуре 25°C. Полученную смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин, супернатант отделяли от осадка декантированием, затем осадок лиофильно высушивали.

Для количественной оценки отдельных сенсорных показателей (внешний вид, цвет, запах, вкус) использовали пятибалльную шкалу. Ингредиент получил следующие оценки: внешний вид - 4,8; цвет – 5,0; вкус – 5,0; запах – 4,8. На основании полученных результатов проведена модификация органолептических характеристик разработанного пищевого ингредиента за счет включения в технологию его получения дополнительных стадий - измельчения и просеивания ингредиента через сито с диаметром ячеек 0,25 мм.

Результаты. Полученный ингредиент представляет собой однородный тонкодисперсный порошок, обеспечивающий равномерное распределение содержащихся в нем биологически активных веществ. По значению показателя активности воды ($a_w = 0,1178$) ингредиент относится к группе продуктов с низкой влажностью ($a_w 0,0-0,6$). Массовая доля белка в составе ингредиента составила 7,9%, массовая доля жира – 3,8%, углеводов

– 87,5%, золы – 0,8%, влажность - 4,4%. Содержание общих полифенолов в составе полученного пищевого ингредиента составило $67,7 \pm 0,7$ мг-экв. галловой кислоты/г муки, а суммарное содержание антоцианинов - $25,5 \pm 4,8$ мг/г муки.

Профиль антоцианинов в исходном экстракте и полученном ингредиенте представлен в таблице 1.

Таблица 1. Профиль антоцианинов экстракта ягод черники и комплекса полифенолов ягод черники, сорбированных на гречневой муке

Антоцианин	Содержание, % от суммы антоцианинов	
	Экстракт ягод черники	Комплекс полифенолов, сорбированных на гречневой муке
Дельфинидин-3-галактозид	11,6	12,0
Дельфинидин-3-глюкозид	10,8	11,1
Цианидин-3-галактозид	11,9	12,5
Дельфинидин-3-арабинозид	7,9	8,3
Цианидин-3-глюкозид	11,5	11,9
Петунидин-3-галактозид	3,3	3,3
Цианидин-3-арабинозид	7,1	7,1
Петунидин-3-глюкозид	8,7	8,5
Пеонидин-3-галактозид	2,5	2,6
Петунидин-3-арабинозид	1,7	1,5
Мальвидин-3-галактозид	3,0	2,9
Пеонидин-3-глюкозид	7,1	6,7
Мальвидин-3-глюкозид	10,5	9,6
Мальвидин-3-арабинозид	2,3	2,1

Технология и характеристика состава специализированного пищевого продукта. Полученный комплекс полифенолов ягод черники, сорбированных на гречневой муке, был использован в качестве ключевого ингредиента при разработке рецептуры СПП, предназначенного для включения в диетотерапию пациентов с нарушениями углеводного обмена. Для повышения эффективности в состав СПП были внесены функциональные пищевые ингредиенты, обладающие рядом доказанных физиологических эффектов: бета-глюканы ячменя и овса, L-карнитин, коэнзим Q₁₀ [7, с. 316; 8, с. 183; 9, с. 578].

Структурные особенности бета-глюканов, обуславливающие их способность к гелеобразованию, определили выбор пищевой матрицы разрабатываемого продукта, представляющего собой традиционный для российского потребителя кисель. Включение в состав СПП L-карнитина связано с доказанным положительным влиянием на углеводный, жировой и белковый обмены. Физиологические эффекты коэнзима Q₁₀ обусловлены его антиоксидантной активностью. В рецептуру СПП вносили микрокапсулированную водорастворимую форму этого ингредиента с содержанием основного вещества 10%. Для формирования традиционных органолептических свойств киселя использовали мальтодекстрин. В состав разработанного СПП были включены растворимые пищевые волокна пребиотического действия – инулин и полидекстроза. Они имеют низкий гликемический индекс (от 4 до 7), сладковатый вкус, низкую калорийность (1–2 ккал/г). Обогащение СПП осуществляли внесением витаминного премикса, включающего 13 витаминов, в том числе жирорастворимые (А, D₃, Е, К₁) и водорастворимые (С, В₁, В₂, В₆, В₁₂, РР, фолиевую кислоту, пантотенат кальция, биотин). Для формирования вкуса и аромата использовали сублимированные ягоды черной смородины и малины в порошкообразном виде, подсластители эритрит и экстракт стевии, натуральные ароматизаторы. Технология СПП заключалась в поэтапном смешивании сухих рецептурных компонентов, обеспечивающем равномерное распределение минорных ингредиентов. На первом этапе получали смесь ингредиентов, содержание которых в рецептуре менее 10% (комплекс полифенолов ягод черники, сорбированных на гречневой муке, эритрит, сублимированные

ягоды смородины и малины, полидекстроза, бета-глюканы овса, L-карнитин, коэнзим Q₁₀, витаминный премикс, ароматизатор), на втором этапе в полученную смесь добавляли остальные ингредиенты (мука ячменная, мальтодекстрин, инулин). Продукт представляет собой тонкодисперсный порошок розового цвета с вкраплениями фиолетового цвета, характерными для комплекса полифенолов ягод черники. Для удобства использования смесь расфасовывали в порционную упаковку (15 г). Способ приготовления готового киселя предусматривает добавление к порции порошкообразной смеси 150-200 мл кипящей воды при интенсивном перемешивании до получения однородного продукта. Рекомендуется употреблять одну порцию киселя в день. Содержание пищевых и биологически активных веществ в 100 г и одной порции СПП, а также процент удовлетворения средней суточной потребности в нутриентах приведены в таблице 2.

Таблица 2. Содержание пищевых и биологически активных веществ в СПП

Компоненты	Содержание в 100 г	Содержание в порции готовой смеси (15 г)	% от средней суточной потребности в порции (15 г)*
Белок, г,	5,0	0,75	
Жир, г	0,6	0,1	
Углеводы, г	41,3	6,2	
Растворимые пищевые волокна, г, в т.ч.	16,5	2,5	125**
- бета-глюканы, г	1,7	0,26	130**
- инулин, г	10,6	1,6	64**
- полидекстроза, г	4,2	0,63	отсутствует норматив
L-карнитин, мг	1072,0	160,8	54**
Коэнзим Q ₁₀ , мг	100,0	15	50**
Антоцианы, мг	255,0	38,3	77**
Полифенолы, мг	677,0	101,6	отсутствует норматив
Витамины:			
С, мг	321,7	48,3	81
В ₁ , мг	4,8	0,7	50
В ₂ , мг	5,4	0,8	50
В ₆ , мг	5,9	0,9	45
В ₁₂ , мкг	8,0	1,2	120
РР, мг	48,2	7,2	40
Фолиевая кислота, мкг	1877,0	281,6	141
Пантотеновая кислота, мг	14,5	2,2	37
А, мг	2,0	0,3	38
Д ₃ , мкг	26,8	4,0	80
Е, мг	37,5	5,6	56
К ₁ , мкг	242,5	36,4	30**
Биотин, мкг	80,7	12,1	24
Энергетическая ценность/калорийность, кДж/ккал	938/224	141/34	1

* ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки»

** Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) ЕАЭС

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие результаты:
 - получен и физико-химически охарактеризован функциональный пищевой ингредиент – комплекс полифенолов ягод черники, сорбированных на гречневой муке – с высоким содержанием общих полифенолов и антоцианинов;
 - разработана рецептура и технология получения специализированного пищевого продукта с высоким содержанием полифенолов и низким гликемическим индексом, предназначенного для питания лиц с нарушениями углеводного и липидного обмена.

Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (тема № 0529-2019-0055).

Литература

1. Kim Y., Keogh J.B., Clifton P.M. Polyphenols and Glycemic Control // Nutr. 2016. Vol. 8, N 1. P. E17. doi: 10.3390/nu8010017
2. Amiot M.J., Riva C., Vinet A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review // Obes Rev. 2016. Vol. 17, N 7. P. 573-586. doi: 10.1111/obr.12409
3. Lewandowska U., Szewczyk K., Hrabec E., Janecka A., Gorlach S. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols // J Agric Food Chem. 2013. Vol. 61, N 50. P.12183–12199. doi:10.1021/jf404439b
4. Petrov N.A., Sidorova Y.S., Sarkisyan V.A., et al. Complex of polyphenols sorbed on buckwheat flour as a functional food ingredient. Food and Raw Materials. 2018; Vol.6(2):334-41. doi:10.21603/2308-4057-2018-2-334-341
5. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи / под ред. В.А. Тутельяна и К.И. Эллера. – М.: Издательство «Династия», 2010. – 160 с.
6. Петров НА., Сидорова ЮС., Перова И.Б., Кочеткова А.А., Мазо В.К. Комплекс полифенолов черники, сорбированных на гречневой муке, как функциональный пищевой ингредиент // Вопр. питания. 2019. Т. 88, № 6. С. 68-72. doi: 10.24411/0042-8833-2019-10066
7. Ciecierska A., Drywień M., Hamulka J., Sadkowski T. Nutraceutical functions of beta-beta-glucans in human nutrition // Rocz Panstw Zakl Hig 2019. Vol. 70(4), P 315-324. doi.org/10.32394/rpzh.2019.0082
8. Трухан Д.И. Роль и место L-карнитина в цитопротекции и коррекции метаболических процессов // Медицинский совет. 2017. № 12. С. 182-187. DOI: 10.21518/2079-701X-2017-12-182-187
9. M Arenas-Jal M., Suñé-Negre JM., García-Montoya E. Coenzyme Q10 supplementation: Efficacy, safety, and formulation challenges // Compr Rev Food Sci Food Saf. 2020. Vol. 19, P. 574–594. doi: 10.1111/1541-4337.12539

Сведения об авторах

Алла Алексеевна Кочеткова

д.т.н., проф., зав. лаб.

Эл. почта: kochetkova@ion.ru

Никита Александрович Петров

врио мл. науч. сотр.

Эл. почта: petrov-nikita-y@mail.ru

Валентина Матвеевна Воробьева

к.т.н., ст. науч. сотр.

Эл. почта: vorobiova_vm@ion.ru

Ирина Сергеевна Воробьева

к.т.н., ст. науч. сотр.

Эл. почта: vorobiova@ion.ru

Надежда Александровна Бiryulina

лаб.-исслед.

Эл. почта: biryulina_nadezhda@mail.ru

Сергей Николаевич Зорин

к.б.н., ст. науч. сотр.

Эл. почта: zorin@ion.ru

Владимир Кимович Мазо

д.б.н., проф., вед. науч. сотр.

Эл. почта: mazo@ion.ru

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи
Москва, Россия

Information about authors

Alla Alekseevna Kochetkova

Dr.Sci.Tech., professor

E-mail: kochetkova@ion.ru

Nikita Aleksandrovich Petrov

interim junior researcher

E-mail: petrov-nikita-y@mail.ru

Valentina Matveevna Vorobyeva

Cand.Tech.Sci., senior researcher

E-mail: vorobiova_vm@ion.ru

Irina Sergeevna Vorobyeva

Cand.Tech.Sci., senior researcher

E-mail: vorobiova@ion.ru

Nadezhda Aleksandrovna Biryulina

laboratory assistant

E-mail: biryulina_nadezhda@mail.ru

Sergey Nikolaevich Zorin

Cand.Biol.Sci., senior researcher

E-mail: zorin@ion.ru

Vladimir Kimovich Mazo

Dr.Sci.Biol., professor

E-mail: mazo@ion.ru

Federal Research Centre of Nutrition and Biotechnology
Moscow, Russia

УДК 664.951:658.562.012.7
ГРНТИ 69.51.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.28

Абрамова Л.С., Козин А.В.
Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИДЕНТИФИКАЦИИ И ВЫЯВЛЕНИЮ ФАЛЬСИФИЦИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ

В статье обсуждается проблема создания объективных методов оценки качества рыбного сырья. Метод ЯМР рекомендуется для комплексного анализа метаболического профиля лососевых и тресковых видов рыб с целью характеристики качественных показателей и идентификации видового состава.

Ключевые слова: тресковые, лососевые, ЯМР-спектроскопия, метаболический профиль, показатель качества.

Abramova L.S., Kozin A.V., Kachala V.V.
Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography

METHODOLOGICAL APPROACHES TO IDENTIFICATION AND DETECTION OF FALSE FOOD FISH PRODUCTS

The article discusses the problem of creating objective methods for assessing the quality of fish raw materials. The NMR method is recommended for a comprehensive analysis of the metabolic profile of salmon and cod fish species in order to characterize the qualitative indicators and identify the species composition.

Keywords: cod, Pacific chum salmon, NMR spectroscopy, metabolic profile, quality indicator.

Введение

Одной из наиболее важных проблем остается обеспечение потребителя продукцией безопасной гарантированного качества. Сегодня пищевая продукция в основном безопасна, самый главный вопрос это качество - вкусовые и потребительские свойства. Федеральным законом от 01.03.2020 № 47-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «О качестве и безопасности пищевых продуктов», установлено, что качество и безопасность пищевых продуктов обеспечиваются посредством определения физико-химических, органолептических, микробиологических и иных показателей, характеризующих свойства пищевых продуктов, а также установления критериев их идентификации [1, с. 1-32].

Не последнюю роль в решении вопроса обеспечения качества пищевой рыбной продукции играет проблема фальсификации, так как в широком смысле она может рассматриваться как действия, направленные на ухудшение потребительских свойств пищевой продукции. В соответствии с нормативными документами фальсифицированными пищевыми продуктами являются умышленно измененные (поддельные) и (или) имеющие скрытые свойства и качество и (или) информация о которых является заведомо неполной и (или) недостоверной. Запрещается обращение пищевых продуктов, которые являются опасными и (или) некачественными по органолептическим показателям и в отношении которых установлен факт фальсификации.

Однако провести объективную оценку органолептических показателей рыбной продукции не всегда удается, так как результаты зависят от квалификации и опыта дегустатора. Кроме того, показатели основываются на описательной терминологии, что приводит к различным формулировкам и, как следствие, к разногласиям при определении качества продукции. В связи с этим требуются современные и, как правило, экспресс-методы определения свежести или порчи рыбы, как показателя качества сырья.

В настоящее время в общемировой практике, в том числе и в странах Евразийского экономического союза, в случае разногласия при органолептической оценке свежести

продукции определяется содержание общего азота летучих оснований (АЛО). Изучение процесса накопления АЛО в мышечной ткани рыбы установило хорошую зависимость между ухудшением органолептических свойств и накоплением летучих азотистых оснований [2, с. 58–88; 3, с. 106-111; 4, с. 419-42]. Однако данный показатель в значительной степени зависит от вида сырья, его биологического состояния и, как правило, используется в качестве показателя порчи.

В ФГБНУ «ВНИРО» проведены предварительные исследования и показано, что метод ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) может быть использован для количественной оценки состояния рыбного сырья, характеристики изменений в процессе хранения, транспортирования, переработки [5, с. 97-101]. Кроме того метод позволяет определить количество основных метаболитов и выявить маркеры, которые могут охарактеризовать как изменения в объекте, так и его видовую принадлежность.

Цель работы

Разработка методических подходов к количественной оценке показателей качества и идентификации видового состава рыбного сырья.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали образцы тресковых рыб - треску (*Gadus morhua*), пикшу (*Melanogrammus aeglefinus*); дальневосточных лососевых рыб - горбушу (*Oncorhynchus gorbuscha*), нерку (*Oncorhynchus nerka*), кижуча (*Oncorhynchus kisutch*). Водорастворимые полярные метаболиты экстрагировали 7,5% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ), как описано в работе [6, с. 542-553]. ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker Avance 800 (Германия) с рабочей частотой по протонам 800 МГц при 303 К с раствором ТСП (3-триметилсилил[2,2,3,3-2H₄]пропионата натрия) в качестве внутреннего стандарта. Обработку спектров проводили с использованием стандартного программного обеспечения фирмы Bruker (TopSpin 3.5 pl7), а также с использованием программы Chenomx NMR версия 8.6 (Chenomx Inc., Alberta, Canada), позволяющей идентифицировать соединения по встроенной базе данных, проводить расширенную деконволюцию спектров и наиболее достоверно определять количественное содержание каждого метаболита.

Спектры регистрировали в ФГБУН ИБХ РАН им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова.

Полученные результаты

Проведен комплексный анализ метаболического профиля ¹H-ЯМР спектров экстрактов мышечной ткани образцов тресковых и дальневосточных лососевых рыб, определено количественное содержание основных минорных компонентов, таких как имидазольные дипептиды, нуклеотиды и нуклеозидные производные, свободные аминокислоты, а также продуктов трансформации, связанных с процессами, происходящими после посмертного окоченения в мышечной ткани рыбы и при дальнейшем хранении.

Для характеристики показателей качества объектов исследования на основании данных содержания нуклеотидов и нуклеозидных производных рассчитаны значения коэффициентов качества K₁, H, G по формулам, приведенным в статье [7, с. 1787-1798]. Согласно рекомендациям литературных источников, значение K₁ около 80% является предельным порогом качества, при больших значениях рекомендуется отказ от употребления данной продукции для пищевых целей. При значениях величины K₁ до 20% сырье считается безусловно свежим и может использоваться в сыром виде, без глубокой тепловой обработки, при 40% - рыба классифицируется как приемлемая и рекомендуется для реализации или переработки [8, с. 67].

Значения K_1 и H для кижуча, горбуши и нерки (таблица 1) подтверждают отсутствие глубоких изменений при заготовке и хранении изученных образцов рыбного сырья и позволяют оценить их как хорошего качества.

Таблица 1 – Характеристика и значения коэффициентов качества исследованных образцов лососевых и тресковых рыб

№ образца	Наименование образца	Содержание метаболита, ммоль/л				K_1 , %	H , %	G
		Гипоксантин (Hx), s-8,19 ppm и s-8,21 ppm	Инозин (Ino) s-8,34 ppm	Инозин-5'-монофосфат (IMP), s-8,58 ppm	АМФ (AMP) s-8,28 ppm и s-8,52 ppm			
1103	Филе пикши	0,149	0,320	1,290	0,120	26,7	8,5	0,3
1105	Филе пикши	0,198	0,464	0,735	0,106	47,4	14,2	0,6
1106	Филе трески тихоокеанской	0,179	0,827	0,574	0,145	63,7	11,3	0,7
1014	Филе трески атлантической	0,223	1,296	0,119	0,134	92,7	13,6	1,1
1001	Треска кусок атлантическая	0,989	0,445	0,004	0,119	99,7	68,8	3,2
108	Кижуч потрошенный	0,074	0,406	0,992	0,080	32,6	5,0	
110	Горбуша с головой	0,274	1,236	2,021	0,181	42,8	7,8	
112	Горбуша обезглавленная потрошенная	0,557	1,785	1,210	0,229	65,9	15,7	
107	Нерка обезглавленная потрошенная	0,361	1,022	1,699	0,146	44,9	11,7	

Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что коэффициент G , который применяется для оценки качества трески [9, с. 1-39], имеет значения ниже 1,1 для филе трески тихоокеанской и филе трески атлантической, что свидетельствует о высоком качестве сырья. Для образца трески атлантической (образец № 1001) значение G составляло 3,2, что характеризует порчу и хорошо согласуется с органолептическими показателями, так как образец имел посторонний запах испорченной рыбы. Хорошо известно, что показателем качества рыбного сырья может являться триметиламиноксид (ТМАО), который, как известно, в случае микробиологической порчи превращается в триметиламин (ТМА) - летучее соединение, придающее специфический неприятный запах рыбному сырью. Как видно из таблицы 2 в мышечной ткани трески атлантической (образец № 1001) отмечается значительное содержание ТМА, по сравнению с другими объектами, что подтверждает его низкое качество. Накопление уксусной кислоты в треске атлантической (образец № 1001) до содержания 39,75 мг/100 г мышечной ткани, по сравнению 1,64 мг/100 г для образца трески атлантической (образец № 1014) также свидетельствует о глубине процесса порчи.

Таблица 2 - Содержание соединений, характеризующих метаболический профиль образцов лососевых и тресковых рыб

Наименование метаболита	Содержание соединения в мышечной ткани рыб, мг/100г								
	тресковые					лососи тихоокеанские			
	пикша		треска			кижуч	горбуша		нерка
	1103*	1105	1106	1014	1001	108	110	112	107

Секция 8. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Уксусная кислота s-1,92	1,19	4,04	1,55	1,64	39,75	0,71	1,79	2,77	1,05
Молочная кислота t-1,34	229,61	175,44	124,94	99,18	157,65	180,63	442,45	469,62	382,05
β-Аланин t-2,56	2,50	7,80	20,11	13,95	17,97	1,21	1,00	-	-
Глутаминовая кислота m-2,36	7,92	4,14	5,36	6,79	5,07	13,92	30,61	33,97	17,73
Триметиламин s-2,90	0,33	7,98	0,24	1,22	85,01	0,24	0,58	1,22	0,31
Триметил-аминоксид s-3,27	255,90	182,53	343,06	257,14	136,89	16,54	69,45	58,43	38,49
Таурин t-3,42	47,94	35,02	97,56	93,21	69,32	26,23	94,01	101,43	45,98
Ансерин s-7,04	172,35	100,18	69,51	49,73	37,32	201,64	469,52	427,86	519,56

Примечание: * номер образца в соответствии с нумерацией в таблице 1

Таким образом используя показатели качества К₁, Н, G, а также количественное содержание уксусной кислоты и ТМА можно делать заключение о степени свежести сырья, глубине изменений, которые прошли в данном продукте при нарушении условий или сроков хранения.

Хорошо известно, что молочная кислота и ТМАО в метаболическом профиле рыбного сырья характеризуют видовую принадлежность, подвижность рыб и среду их обитания. Отмечается более высокое содержание молочной кислоты в лососевых рыбах, по сравнению с тресковыми рыбами (таблица 2). Содержание ТМАО, физиологическая роль которого заключается в поддержании азотного баланса, колеблется в широких пределах и наибольшее его содержание отмечается у рыб семейства тресковых, а в лососевых рыбах, присутствует в небольших концентрациях, что хорошо согласуется с литературными данными [10, с. 207–228].

Производные имидазола представлены в лососевых и тресковых видах рыб в основном ансерином, выполняющим роль эффективного протектора мембран, защищая их от вредного воздействия продуктов перекисного окисления, накапливающихся в мышцах в процессе интенсивной сократительной работы [11, с. 1803-1845]. Содержание ансерина в значительной степени выше в лососевых рыбах, по сравнению с тресковыми (таблица 2) и может рассматриваться в качестве маркера межвидовой идентификации рыбного сырья.

Отмечено более высокое содержание β-аланина в треске, по сравнению с пикшей, что хорошо согласуется с данными работы, в которой минимальное содержание этой аминокислоты рекомендовано в качестве маркера пикши среди по сравнению с треской [12, с. 55-62].

Известно, что для усиления вкуса продукции применяется глутаминовая кислота, содержание которой в лососях дальневосточных значительно отличается от тресковых (таблица 2). Более высокое содержание глутаминовой кислоты обеспечивает насыщенный вкус лососевым рыбам, по сравнению с тресковыми. Определенный интерес представляет содержание таурина в образцах рыбного сырья, как важной сульфокислоты. Из данных таблицы 2 видно, что образцы тресковых и лососевых содержат таурин, в количестве, который может обеспечить на 15-25% от суточной потребности в этом биологически активном соединении при употреблении 100 г рыбы.

Таким образом, установлено, что наиболее характерными маркерами лососевых и тресковых рыб, позволяющими дать заключение о видовой принадлежности, являются триметиламиноксид, глутаминовая кислота и ансерин.

Заключение

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

- метод ЯМР спектроскопии позволяет одновременно получить информацию о свежести рыбного сырья, содержании биологически активных соединений, охарактеризовать органолептические свойства и видовую принадлежность сырья;
- используя показатели качества K_1 , H , G , а также количественное содержание уксусной кислоты, молочной кислоты и триметиламина можно делать заключение о степени свежести сырья, глубине изменений, которые прошли в данном продукте при нарушении условий или сроков хранения;
- анализ метаболического профиля образцов лососевых и тресковых видов рыбного сырья показал, что наиболее характерными маркерами лососевых и тресковых рыб, позволяющими дать заключение о видовой принадлежности, являются триметиламиноксид, глутаминовая кислота и ансерин;
- в качестве характерного маркера пикши для отличия ее от трески, очень близких по внешнему виду и вкусу, может быть использован такой показатель, как содержание β -аланина в мышечной ткани рыбы.

Литература

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.
2. Howgate P. A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 2. Formation of the bases, and application in quality assurance // *Electron. J. Environ., Agric. Food Chem.* - 2010. - V.9. - P. 58–88.
3. Jinadasa B.K.K.K. Determination of quality of marine fishes based on total volatile base nitrogen test (TVB-N) // *Nat. Sci.* - 2014. - V.12(5). - P.106-111.
4. Malle P., Poumeyrol M. A new chemical criterion for the quality control of fish; Trimethyl amine/Total volatile basic Nitrogen (%) // *J. Food Protect.* - 1989. - V. 52. - № 6. - P. 419-42.
5. Абрамова Л.С., Козин А.В., Сытова М.В. Обоснование идентификационных критериев (маркеров) рыбного сырья для целей выявления фальсификации. В сборнике: Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции IT + M&Ec'2018 (Гурзуф, 01.06-11.06.2018 г) / под. ред. проф. Е.Л. Глориозова. М.: ИНИТ, 2018. Весенняя сессия. — С. 97–101.
6. Ciampa A., Picone G., Laghi L., Nikzad H., Capozzi F. Changes in the Amino Acid Composition of Bogue (Boopsboops) Fish during Storage at different Temperatures by 1H -NMR Spectroscopy // *Nutrients.* - 2012. - N 4(6). - P. 542-553.
7. Hong H., Regenstein J.M., Luo Y. The importance of ATP-Related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: A Review. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* - 2017. -V. 57(9) - P. 1787-1798.
8. Быков В.П. Изменения мяса рыбы при холодильной обработке: Автолитические и бактериальные процессы. - М.: Агропромиздат, 1987. - 221 с.
9. Burns B.G., Ke P.J., Irvine B.B. Objective procedure for fish freshness evaluation based on nucleotide changes using a HPLC system // *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* - 1985. - No. 1373. - P. 1-39.
10. Van Waarde A. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Comparative Biochemistry.* - 1988. - V. 91(2). - P. 207–228.

11. Boldyrev A., Giancarlo A., Wim D. Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiological reviews.* – 2013. – V93. – P.1803-1845.

12. Standal I.B., Gribbestad I.S., Bathen T.F., Aursand M., Martinez I. Low molecular weight metabolites in white muscle from cod (*Gadus Morhua*) and haddock (*Melanogrammus Aeglefinus*) analyzed by high resolution ¹H-NMR spectroscopy / In book. Editors: I. A. Farhat, Peter S. Belton, G. Webb. *Magnetic Resonance in Food Science: From Molecules to Man.* P. 55-62.

Сведения об авторах

Любовь Сергеевна Абрамова

д-р техн. наук, проф.

советник по качеству рыбной продукции

Эл. почта: abramova@vniro.ru

Андрей Валерьевич Козин

канд. хим. наук

ст. науч. сотр.

Эл. почта: kozin82a@gmail.com

Всероссийский научно-исследовательский институ-

тут рыбного хозяйства и океанографии

Москва, Россия

Information about authors

L.S. Abramova

doctor of Technical Science, professor

fish product quality Advisor

E-mail: abramova@vniro.ru

Andrey Valerievich Kozin

PhD in Chemical sciences

Senior Researcher

E-mail: kozin82a@gmail.com

Federal Research Institute of Fisheries & Oceanog-

raphy

Russia, Moscow

УДК 636.033

ГРНТИ 69.51.03

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.29

¹Насонова В.В., ¹Семенова А.А.,

¹Кузнецова Т.Г., ²Некрасов Р.В.

¹ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова РАН

²ФИЦ животноводства – ВИЖ имени акад. Л.К. Эрнста РАН

МИКРОСТРУКТУРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ ПРИЗНАКОВ МИОПАТИИ У БЫСТРОРАСТУЩИХ СВИНЕЙ

В статье представлены критерии по определению степени выраженности миопатии путем оценки морфологических особенностей мышечной ткани. Поскольку известно, что гибридные свиньи наиболее подвержены стрессу, что в дальнейшем приводит к развитию дистрофических (миопатических) изменений структуры мышечной ткани, снижающих впоследствии качество свинины.

Ключевые слова: миопатия, свинина, микроструктура мышечной ткани

¹Nasonova V.V., ¹Semenova A.A., ¹Kuznetsova T.G., ²Nekrasov R.V.

¹V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of the RAS

²Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst,

MICROSTRUCTURAL INDICATORS OF MUSCLE TISSUE WITH VARYING DEGREES OF SEVERITY OF MYOPATHY SIGNS IN FAST-GROWING PIGS

The article presents the criteria for determining the severity of myopathy by assessing the morphological features of muscle tissue. Since it is known that hybrid pigs are most susceptible to stress, which further leads to the development of dystrophic (myopathic) changes in the structure of muscle tissue, which subsequently reduce the quality of pork.

Keywords: myopathy, pork, muscle microstructure

Введение

В настоящее время свиноводство является одной из самых динамично развивающихся отраслей животноводства в Российской Федерации. По данным Национального союза свиноводов потребление свинины в 2020 г выросло на 5,8% (228 тыс.т) и достигло 4,1 млн т. При этом душевое потребление в 2020 г также достигло рекордных значений (28,9 кг). По прогнозу в 2021 г отечественное производство свинины увеличится на 5-6% (+ 230-260 тыс. т в убойном весе).

Достигнутые результаты свидетельствуют о возрастании конкуренции среди производителей свинины как на внутреннем, так и на внешнем рынках. Качество свинины, при одновременной тенденции к сокращению затрат в свиноводстве, будет приобретать всё более решающую роль. Повышение качества свинины неразрывно связано с улучшением благополучия животных и необходимостью исключения прижизненных факторов, приводящих к развитию миопатии.

Миопатия - заболевание, характеризующееся нарушением структуры мышечной ткани. Миопатия затрагивает наиболее ценные части туш у свиней – длиннейшую мышцу спины и мышцы тазобедренной части, влечет за собой значительные экономические потери [1, с. 27] .

В настоящее время профилактические меры для сокращения миопатии свиней проводятся в направлении поиска и разработки адаптогенов - препаратов природного или искусственного происхождения, способных повышать неспецифическую сопротивляемость организма к неблагоприятным внешним факторам среды [2, с. 355-357]. Как мера снижения рисков развития миопатии и управления качеством мяса рассматриваются не только добавление в рацион животных различных адаптогенов, но и выбор оптимального рациона кормления – доз, продолжительности приема и пр. Однако до сих пор идентификация мяса с дефектами микроструктуры мышечной ткани в результате миопатии остается проблемной и актуальной задачей, которая может быть решена с использованием гистологических методов.

Цель работы

Изучение микроструктурных особенностей миопатии и определение критериев, позволяющих идентифицировать степень повреждения мышечной ткани.

Организация эксперимента

Методические рекомендации разрабатывали на основании полученных результатов при проведении экспериментальных исследований *in vivo* на помесных боровках (гибрид F-2: (Крупная Белая х Ландрас) х Дюрок) с начальной живой массой от 34 кг и до 36 кг. Животных содержали на физиологическом дворе ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста в период с 21 мая по 28 сентября 2019 года. Условия содержания всех групп животных (температурный, влажностный, световой режимы и газовый состав воздуха в помещении) были одинаковы и в пределах зоогигиенических норм. Кормление животных осуществляли по нормам ВИЖ [3, с.263-270]. Животные были сформированы по принципу пар-аналогов и разделены на 4 групп - по 9 животных в каждой группе:

- 1-я контрольная группа - свиньи, не подвергавшиеся воздействию моделируемого технологического стресса (далее стресс);
- 2-я опытная группа - свиньи, подвергавшиеся стрессу в период после доращивания до убоя;
- 3-я опытная группа - свиньи, подвергавшиеся стрессу в период после доращивания до убоя и получавшие адаптоген (Se), позволяющий нивелировать последствия стресса;
- 4-я опытная группа - свиньи, подвергавшиеся стрессу в период после доращивания до убоя и получавшие адаптоген (дигидрокверцетин), позволяющий нивелировать последствия стресса [4, с.89-96].

Для создания стресс-фактора животных подвергали перестановке через 14 дней, в результате которой каждое животное оказывалось с новыми «партнерами» по загону. Адаптогены добавляли в рацион свиней. Убой свиней проводили по достижению живой массы не менее 110 кг в условиях физиологического двора так называемым «крестьянским способом».

Материалы и методы

Пробы мышечной ткани отбирали через 24 ч после убоя свиней: от длиннейшей мышцы спины - на уровне 8-12 позвонка, от полусухожильной и полуперепончатой мышц - из глубоких слоев. Из каждой пробы вырезали образцы (не менее 2-х) прямоугольной формы с размером сторон около 1,0-1,5 см. Отобранные образцы перед исследованием подвергали фиксации в 15% растворе нейтрального формалина в течение 24 ч, с последующей промывкой в проточной воде и уплотнением в 12,5% и 25% растворе желатина при температуре 37°C. срезы изготавливали с помощью микротом-криостата Leika (Германия), окрашивали гематоксилин-эозином. Гистологические препараты изучали с использованием анализатора изображений Motik (Китай) при увеличении об.х40.

Результаты и обсуждение

Проведенные гистологические исследования мышечной ткани длиннейшей мышцы свиней от 4-х опытных групп позволили установить и описать морфологические критерии, позволяющие дифференцировать миопатию в структуре мышечной ткани после убоя животных. К микроструктурным показателям относятся: состояние поперечной исчерченности, длина саркомеров, степень сокращенности структур мышечных волокон, образование полос и узлов сверхсокращения, характер изменения сократительной субстанции в процессе автолиза, степень и характер деструкции мышечных волокон, диаметр и форма мышечных волокон. На основании установленных показателей, характеризующих степень изменения структуры мышечной ткани: выделены следующие группы, характеризующие состояние мышечной ткани: без признаков миопатии, умеренная степень и выраженная степень миопатии. Определение степени выраженности миопатии проводится исходя из оценки каждого из перечисленных выше критериев.

Микроструктура парной мышечной ткани без признаков миопатии характеризовались набухшими волнистой конфигурации мышечными волокнами с четкой равномерной широкой поперечной исчерченностью, продольная исчерченность сглажена. Охлажденная мышечная ткань через 24 ч после убоя отличалась усилением продольной исчерченности при одновременном ослаблении поперечной. Деструктивные изменения и участки сверхсокращения в мышечных волокнах не выражены. На поперечном срезе мышечные волокна полигональной формы диаметром 43-45 мкм (рис.1).

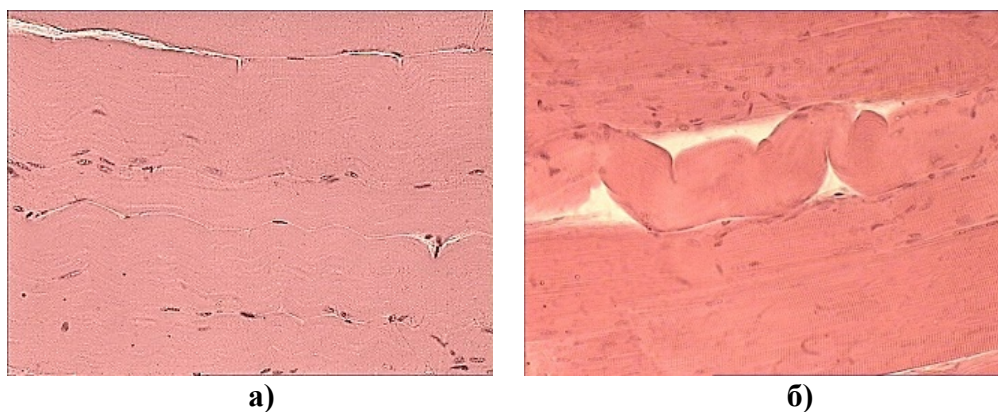


Рисунок 1 - Микроструктура мышечной ткани без признаков миопатии:
а) парная; б) охлажденная.

При исследовании мышечной ткани с умеренно выраженной миопатией микроструктура мышечной ткани характеризуется преимущественно прямыми или слегка волнистыми мышечными волокнами, лежащими свободно по отношению друг к другу. На поверхности разреза отмечаются множественные узлы сокращения имеющих грибовидную форму. В глубоких слоях мышцы выявляются участки волокон с измененной структурой, которые характеризуются единичными или множественными узлами сокращения овальной формы с базофильной окраской и гомогенной структурой или мелкой сближенной поперечной исчерченностью длиной от 200 мкм до 400 мкм, с сохранением целостности сарколеммы. Измененные мышечные волокна на поперечном срезе имеют округлую форму (рис.2).

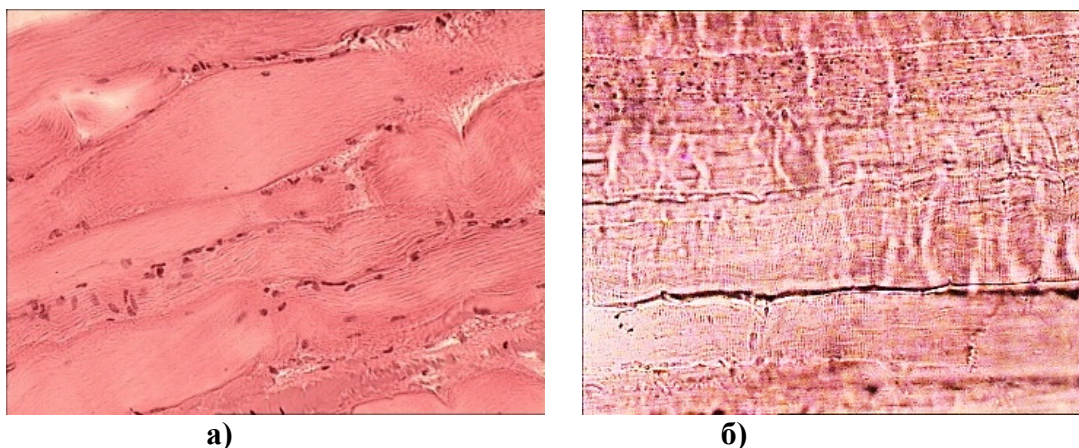


Рисунок 2 – Узлы сокращения (а) и поперечные полосы сверхсокращения (б) в структуре мышечной ткани с умеренно выраженной степенью миопатии

Мышечная ткань с выраженной степенью миопатии характеризуется прямыми мышечными волокнами, с хорошо выраженными границами. Поперечная исчерченность отчетливо выражена. В глубине мышцы обнаруживаются множественные узлы сокращения прямоугольной формы с разрывами миофибрилл в прилегающих участках, имеющие гомогенную структуру, базофильную окраску. Помимо узлов сокращения, в структуре волокон выявляются многочисленные полосы сокращения с большей длиной, утолщенные с гомогенной структурой и множественными узкими щелями, образовавшимися в результате разрыва миофибрилл и распадом миофибрилл до мелкозернистой белковой массы. Отмеченные изменения в структуре волокон охватывают до 40-60% мышечных волокон в первичных пучках (рис.3).

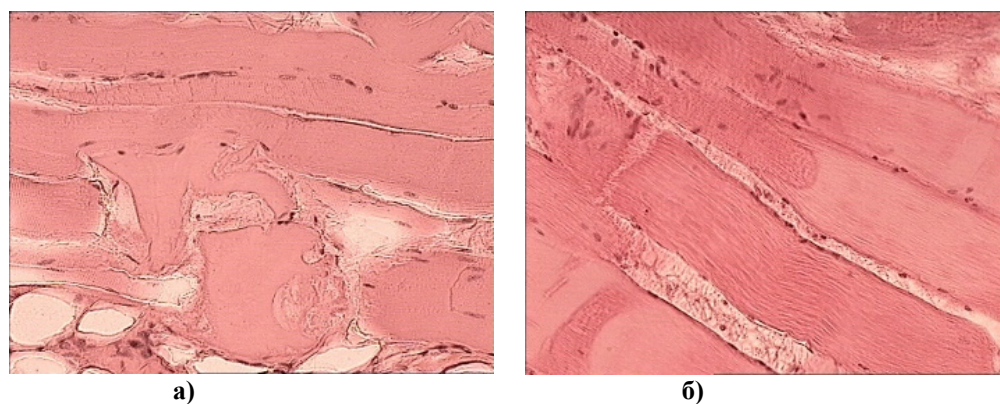


Рисунок 3 – Узлы (а) и полосы (б) в структуре мышечной ткани с выраженной степенью миопатии

Соотнесение результатов микроструктурных исследований образцов мышечной ткани с полученными значениями рН, показало, что мясное сырье с признаками умеренно выраженной и выраженной миопатии характеризовались достаточно низкими значениями рН₂₄ - 5,41, 5,40, 5,49 и 5,47 в отличие от образцов без признаков миопатии.

Одновременно с этим, необходимо отметить, что для структурной миопатии значительным морфологическим признаком является диспропорция типов волокон на световом уровне, отличающаяся преобладанием мышечных волокон гликолитического типа относительно больших размеров [5, с.65-69].

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новым является разработанный методологический подход, который позволяет выявить основные морфологические показатели, характеризующие выраженность миопатических изменений мышечной ткани свиней. К ним отнесены форма мышечных волокон, степень сокращенности структур мышечных волокон, образование полос и узлов сверхсокращения, характер изменения сократительной субстанции в процессе автолиза, степень и характер деструкции мышечных волокон, диаметр и форма мышечных волокон. С учетом степени выраженности микроструктурных изменений выделены умеренная степень миопатии и выраженная. Полученные данные позволяют оценить степень снижения поражающего действия на микроструктуру мышечной ткани в результате использования того или иного адаптогена (смеси адаптогенов) и предлагаемой схемы его введения в рацион кормления.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ № 19-16-00068.

Литература

1. Semenova A.A., Kuznetsova T.G., Nasonova V.V., Nekrasov R.V., Bogolyubova N.V. Myopathy as a destabilizing factor of meat quality formation. Theory and practice of meat processing. 2019;4 (3):24-31
2. Kang J.T., Meon J.H., Choi J.Y., Park S.J., Kim S.J., Saadeldin I.M., Lee B.C. Effect of Antioxidant Flavonoids (Quercetin and Taxifolin) on In vitro Maturation of Porcine Oocytes. Asian Australas. Journal of Animal science, 2016, v. 29 (3), pp. 352-358.
3. Нормы потребностей молочного скота и свиней в питательных веществах. Под ред. Некрасова Р.В., Головина А.В., Махаева Е.А. - ВИЖ, 2018. - 290 с.
4. Никанова Л.А., Фомичев Ю.П. Биопротекторное действие дигидрохверцетина и арабиногалактана в ослаблении влияния экстремальных факторов среды на организм свиней. Сб. научн. трудов Северо-Кавказского научно-исследовательского института животноводства, 2016, т.5, №2, С.89-96.
5. Влодавец Д.В., Сухоруков В.С., Харламов Д.А., Белоусова Е.Д. Врожденная структурная миопатия с диспропорцией типов мышечных волокон. Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2007, №4, С. 65-69

Сведения об авторах

Виктория Викторовна Насонова

канд. техн. наук, рук. отд.

Эл. почта: v.nasonova@fnscps.ru

ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова

РАН

Россия, Москва

Анастасия Артуровна Семенова

д-р техн. наук, зам. дир.

Эл. почта: a.semenova@fnscps.ru

ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова

РАН

Россия, Москва

Information about authors

Victoria V. Nasonova

Candidate of Technical Sciences

E-mail: v.nasonova@fnscps.ru

Federal Research Center for Food Systems named af-

ter V.M. GorbatoV RAS

Russia, Moscow

Anastasia A. Semenova

Doctor of Technical Sciences

E-mail: a.semenova@fnscps.ru

Federal Research Center for Food Systems named af-

ter V.M. GorbatoV RAS

Russia, Moscow

Татьяна Георгиевна Кузнецова
д-р ветеринар. наук, зл. науч. сотр.
Эл. почта: labsens@mail.ru
ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова
РАН
Россия, Москва

Роман Викторович Некрасов
д-р с.-х. наук, зав. отд. кормления
Эл. почта: nek_roman@mail.ru
ФИЦ животноводства – ВИЖ имени академика
Л.К. Эрнста» РАН
Россия, Московская обл., Подольск

Tatyana G. Kuznetsova
Doctor of Veterinary Science
Federal Research Center for Food Systems named af-
ter V.M. Gorbatov RAS
E-mail: labsens@mail.ru
Russia, Moscow

Roman V. Nekrasov
Doctor of Agricultural Sciences²
E-mail: nek_roman@mail.ru
Federal Research Center for Animal Husbandry
named after Academy Member L.K. Ernst
Russia, Podolsk, Moscow Region

УДК 579.63
ГРНТИ 69.51.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.30

¹Семенова А.А., ¹Юшина Ю.К., ¹Грудистова М.А.,
¹Зайко Е.В., ²Иванова О.Е.

¹ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова РАН
²Всероссийский государственный Центр качества и стандартиза-
ции лекарственных средств для животных и кормов

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ МЯСОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ

В статье обсуждаются результаты исследования микробного разнообразия объектов производственной среды двух мясоперерабатывающих предприятий, включая антибиотикорезистентность, выделенных штаммов патогенных микроорганизмов и их способность к биоплёнкообразованию.

Ключевые слова: Микроорганизмы, смывы, объекты производственной среды, контаминация, биопленки.

¹Semenova A.A., ¹Yushina Yu.K., ¹Grudistova M.A.,
¹Zaiko E.V., ²Ivanova O.E.

¹V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of the RAS
²The Russian State Center For Animal Feed And Drug Standardization And Quality

STUDY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN MEAT PROCESSING ENTERPRISES

The article discusses the results of a study of the microbial diversity of objects in the production environment of two meat processing enterprises, including antibiotic resistance, isolated strains of pathogenic microorganisms and their ability to biofilm formation.

Keywords: Microorganisms, washes, objects of the working environment, contamination, biofilms

Введение

Микробиологическая безопасность пищевой продукции зависят от множества факторов, в числе которых виды применяемого сырья, способы его технологической обработки, уровень автоматизации и санитарии на производстве, условия хранения и пр. [1, с. 84, 91]. Под действием этих факторов формируются популяции микроорганизмов, устойчиво циркулирующих в производственной среде [2, с.77].

В рамках изучения микробной экологии предприятий активно совершенствуются исследовательские подходы с целью максимально полного анализа состава и состояния микрофлоры оборудования, посуды, инвентаря, поверхности помещений, стеллажей, рук и спецодежды персонала и пр., включая выявление трудно культивируемых микроорганизмов. Для этих целей надежным и мощным инструментом стал высокопроизводитель-

ный метод с использованием матричного лазера/десорбции - времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) [3, с.966], который позволяет получить характеристики микроорганизмов не только на уровне видов, но и на уровне штаммов. Такой подход потенциально играет ключевую роль в понимании рисков в снижении уровня безопасности пищевой продукции. В последнее время особую озабоченность вызывает циркуляция в производственной среде пищевых предприятий патогенных микроорганизмов *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *L.monocytogenes*, *E.coli*, *St.aureus*, *B.cereus* и др., способных образовывать биопленки [4, с.1].

Целью исследования являлось изучение состава микробной популяции на объектах производственной среды предприятий, осуществляющих переработку мяса.

Объектами исследования являлись смывы и биопленки, отобранные с сентября по ноябрь 2020 года на двух предприятиях. Местами отбора проб были объекты производственной среды - основное технологическое оборудование, вспомогательное оборудование, инвентарь, конструкции.

Методы исследования. В работе использовали общепринятые микробиологические методы (определение количества /КМАФАнМ/ и микробного состава мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов /МАФАнМ/, 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*. Определение резистентности патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам (доксциклин 30 мкг, стрептомицин 300 мкг, канамицин 30 мкг, линкомицин 10 мкг, азитромицин 15 мкг, пенициллин G 10iu, неомицин 30 мкг) – диско-диффузионным методом по МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания». Определение способности к биопленкообразованию – *in vitro* в микротитровальных планшетах. Для окраски сформировавшихся биопленок использовали 0,1% раствора кристаллвиолета (или генцианвиолет). Для микроскопии с флуоресцентным объективом биопленки выращивали на твердых поверхностях и красили флуоресцентными красителями. Далее смотрели на микроскопе Nikon *EclipseNi* с соответствующими фильтрами.

Результаты исследования.

Смывы, отобранные с технологического оборудования и инструмента, характеризовались КМАФАнМ от $<1,0 \times 10^1$ до $7,8 \times 10^6$ КОЕ/см², с вспомогательного оборудования – от $2,0 \times 10^2$ до $7,8 \times 10^6$ КОЕ/см², с конструкций – от $2,0 \times 10^2$ до $8,0 \times 10^5$ КОЕ/см². При этом высокими значениями КМАФАнМ (свыше 10^3 КОЕ/см²) характеризовались и смывы, взятые в конечных точках технологического процесса, что свидетельствовало о риске перекрестного заражения продукции, подготовленной к выпуску.

Микрофлора объектов производственной среды предприятия 1 была представлена следующими микроорганизмами *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter psychrolactophilus*, *Brevibacterium casei*, *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Citrobacter spp.*, *Kocuria rhizophila*, *Lactobacillus cakei*, *Lactococcus garvieae*, *Lelliottia amnigena*, *Macrococcus caseolyticus*, *Microbacterium arborescens*, *Microbacterium liquefaciens*, *Microbacterium maritypicum*, *Microbacterium oxydans*,

Microbacterium paraoxydans, *Micrococcus luteus*, *Moraxella osloensis*, *Pseudomonas fragii*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas tolaasii*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhodotorula minuta*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus sciuri*.

Обнаруженные бактерии родов *Kocuria* и *Micrococcus* являлись обычными комменсалами кожи и ротоглотки у млекопитающих. Они встречаются в различных экологических нишах (продукты питания, включая мясо, пресная вода, морские отложения и пр.). *Kocuria rhizophila* и *Micrococcus luteus* могут вызывать заболевания, например, у рыб (радужной форели, кумжи и др.). Грамотрицательный фитопатоген *Rhizobium radiobacter* в последнее время рассматривается как возможный возбудитель инфекционных заболеваний у человека, в том числе бактериального кератита [5, с.286, 289].

Из смывов предприятия 2 были выделены микроорганизмы, представленные 26 родами, в том числе *Enterococcus*, *Exiguobacterium*, *Lactococcus*, *Macrococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Vagococcus*, *Erysipelothrix*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Kocuria*, *Micrococcus* и др.

Микроорганизмы рода *Pseudomonas*, были представлены наибольшим количеством видов (20 видов, в том числе *Ps. brenneri*, *Ps. fluorescens*, *Ps. orientalis* и *Ps. tolaasii*, *Ps. brenneri* и др.). Род *Pseudomonas* известен своей метаболической универсальностью и генетической пластичностью, включает психротрофные виды, способные расти при низких положительных температурах (присущих пищевым производствам) и продуцировать термостабильные протеолитические и липолитические ферменты, которые вызывают порчу пищевой продукции в процессе хранения. Кроме того, эти микроорганизмы активно образуют монобио пленки и био пленки в симбиозе с патогенными микроорганизмами, некоторые из них являются условно-патогенными и вызывают тяжелые формы внутрибольничных инфекций (*Ps. aeruginosa*) [6, с.1353].

Род *Acinetobacter*, обнаруженный в смывах, принадлежит к семейству *Moraxellaceae* порядка *Pseudomonadales* класса *Gamma proteobacteria* (тип *Proteobacteria*) и занимает первое место среди возбудителей раневой инфекции (36%). *Acinetobacter baumannii* обладает выраженной способностью к образованию био пленок [7, с.287].

Патогенные свойства рода *Aeromonas* проявляются благодаря наличию у них цитолитического токсина, энтеротоксина, β -гемолизина. Представители этого рода обладают повышенной резистентностью к антибиотикам. Представители рода *Aeromonas*, в частности *Aeromonas pittii*, известны тем, что сохраняют и даже увеличивают способность образовывать био пленки даже при концентрации 4-6% хлорида натрия [8, с.3].

Также были выделены бактерии рода *Proteus* такие, как *Pr. mirabilis*, *Pr. hauseri* и *Pr. vulgaris*. *Pr. mirabilis*, повсеместно встречаемые в почве и воде. Перечисленные представители этого рода были связаны с инфекциями, устойчивыми к противомикробным препаратам. Так, например, *Pr. mirabilis* с множественной лекарственной устойчивостью был выделен из сырого куриного мяса [9, с.252-254]. *Pr. penneri* является условно-патогенным микроорганизмом человека, участвующим во многих инфекциях, но, в основном, он поражает мочевыводящие пути госпитализированных пациентов с длительной катетеризацией [10, с.537].

На обследованных предприятиях частота выявления *Salmonella spp.* в смывах не превысила 12%. Однако по *L. monocytogenes* частота выявления составляла до 37,5%, причем в смывах с поверхности вспомогательного оборудования. 12 штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из объектов производственной среды, были исследованы на чувствительность к 8 антибиотикам. Все исследованные штаммы листерий были чувствительны к стрептомицину в дозе 300 мкг. Однако, часть выделенных штаммов *L. monocytogenes* проявляла устойчивость к линкомицину, а также промежуточную устойчивость к неомицину, триметоприму, доксициклину, азитромицину, линкомицину, ципрофлоксацину и к канамицину. При этом, из 12 штаммов листерий только 7 были

чувствительны ко всем 8-ми антибиотикам. Штаммы микроорганизмов с промежуточной устойчивостью к антибиотикам распределились следующим образом: 2 штамма - к 1 антибиотику, 2 штамма - к 2 антибиотикам и 1 штамм - к 4 антибиотикам. При этом 1 штамм из 12 обладал устойчивостью к одному из 8 антибиотиков (линкомицину). Таким образом, 41,7% выделенных штаммов одного патогена проявляли в той или иной мере устойчивость к антимикробным средствам.

Особую проблему представляют штаммы патогенов, способные образовывать биопленки [11, с.17]. В результате исследований было подтверждено образование биопленок у всех изученных штаммов. *L.monocytogenes*, *Salmonella* spp. и *Pseudomonas* spp. продемонстрировали способность быстро формировать биопленки в монокультуре при комнатной температуре и при низких положительных температурах. При 4°C штаммы патогенов формировали устойчивые биопленки в течение первых суток культивирования. Такой же способностью обладали не только патогены, но все листерии (*L. monocytogenes*), включая непатогенные *L. welshimeri* и *L. innocua*.

Способность к биопленкообразованию при 4 °C также продемонстрировали микроорганизмы рода *Salmonella* spp., причем увеличение интенсивности роста их биопленок наблюдалось при совместном культивировании с штаммами *Pseudomonas*. Способность к образованию биопленок последними была наиболее ярко выражена при низких положительных температурах. С помощью флуоресцентной микроскопии, было установлено, что все выделенные из объектов производственной среды штаммы *L.monocytogenes*, *Salmonella* spp. и *Pseudomonas* spp. формировали биопленки на любых абиотических поверхностях вне зависимости от их состава и формы.

Заключение

Таким образом, авторы считают, что в данной работе были получены новые данные о составе микробного сообщества объектов производственной среды мясоперерабатывающих предприятий. Результаты исследования показали, что абиотические поверхности (технологическое и вспомогательное оборудования, конструкции, инструмент и пр.) загрязнены в значительной степени различными видами микроорганизмов. Чем выше степень загрязнения, тем большее разнообразие видов и штаммов наблюдалось. Среди циркулирующих в производственной среде микроорганизмов представлены патогенные и условно-патогенные виды, в том числе листерии, сальмонеллы и псевдомонады. Определение чувствительности к антибиотикам у выявленных патогенных листерий показало, что среди штаммов, циркулирующих в производственной среде, свыше 40 % проявляли в различной мере антибиотикорезистентность. Изучение биопленкообразования продемонстрировало способность патогенных микроорганизмов как к собственному формированию пленок, так и в симбиозе с *Pseudomonas* spp.

Выявление у исследованных штаммов способности к биопленочному росту убедительно показало, что эту способность надо учитывать как при планировании мониторинговых мероприятий, так и при выборе плана санитарно-гигиенических процедур, направленных на снижение микробиологических рисков контаминации пищевой продукции.

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

Литература

1. Höll L., Behr J., Vogel R.F. Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. Food Microbiology, 2016, Vol. 60, P. 84-91. DOI:10.1016/j.fm.2016.07.003.

2. *Nychas G.-J.E., Skandamis P.N., Tassou C.C., Koutsoumanis K.P.* Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 2008, V. 78, I.1–2, P. 77-89. DOI:10.1016/j.meatsci.2007.06.020.
3. *Wieser A., Schneider L., Jung J., Schubert S.* MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics - Identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied microbiology and biotechnology*. 2011, Vol.93, P. 965-974. DOI:10.1007/s00253-011-3783-4.
4. *Machado I., Silva L.R., Giaouris E.D., Melo L.F., Simões M.* Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. *Food Research International*, 2020, Vol. 127, 108754. DOI:10.1016/j.foodres.2019.108754.
5. *Pekala A., Paździor E., Antychowicz J., Bernad A., Głowacka H., Więcek B., Niemczuk W.* *Kocuria rhizophila* and *Micrococcus luteus* as emerging opportunist pathogens in brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture*, 2017, 486. 10.1016/j.aquaculture.2017.12.028.
6. *Obritsch M.D., Fish D.N., MacLaren R., Jung R.* Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy*. 2005, Vol. 25(10), P. 1353-1364. DOI: 10.1592/phco.2005.25.10.1353.
7. *Eze E.C., Chenia H.Y., El Zowalaty M.E.* *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infection and drug resistance*. 2018, Vol.11, P.2277–2299. DOI:10.2147/IDR.S169894.
8. *Evangelista-Barreto N.S., Teles de Carvalho F.C., dos Fernandes Vieira R.H.S. et al.* Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment Braz. *J. Microbiol.* 2010, Vol.41, N2. DOI:10.1590/S1517-83822010000200027.
9. *Guo S., Aung K.T., Tay M.Y.F., Seow K.L.G., Ng L.C., Schlundt J.* Extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* with multidrug resistance isolated from raw chicken in Singapore: Genotypic and phenotypic analysis. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2019 Dec; 19. P. 252-254. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.10.013.
10. *O'Hara C.M., Brenner F.W., Miller J.M.* Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000. Vol.13(4), P.534-546. DOI:10.1128/cmr.13.4.534-546.2000.
11. *Vestby L.K., Gronseth T., Simm R., Nesse L.L.* Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel)*. 2020, Vol.9(2), N.59, P. 1-29. DOI:10.3390/antibiotics9020059.

Сведения об авторах

Анастасия Артуровна Семенова
 д-р. техн. наук, проф., зам. дир. по науке
 Эл. почта: a.semenova@fncps.ru
 ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова
 РАН
 Россия, Москва

Юлия Константиновна Юшина
 канд. техн. наук, рук. лаб.
 Эл. почта: yu.yushina@fncps.ru
 ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова
 РАН
 Россия, Москва

Мария Александровна Грудистова
 канд. техн. наук, науч. сотр.
 Эл. почта: m.grudistova@fncps.ru
 ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова
 РАН
 Россия, Москва

Information about authors

Anastasia Arturovna Semenova
 Doc. of Tech. Sciences, prof., Deputy Dir. for Research
 Federal Research Center for Food Systems named after
 V.M. Gorbatov RAS
 E-mail: a.semenova@fncps.ru
 Russia, Moscow

Yulia Konstantinovna Yushina
 Candidate of Technical Sciences, laboratory
 Federal Research Center for Food Systems named after
 V.M. Gorbatov RAS
 E-mail: yu.yushina@fncps.ru
 Russia, Moscow

Maria Alexandrovna Grudistova
 Candidate of Technical Sciences, researcher
 Federal Research Center for Food Systems named after
 V.M. Gorbatov RAS
 E-mail: m.grudistova@fncps.ru
 Russia, Moscow

Елена Викторовна Зайко

асп., мл. науч. сотр.

Эл. почта: e.zaiko@fneps.ru

ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова
РАН

Россия, Москва

Ольга Евгеньевна Иванова

канд. ветерин. наук, рук. отд. биотехнологии

Эл. почта: o.ivanova@vgnki.ru

Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов

Россия, Москва

Elena Viktorovna Zaiko

Postgraduate

Federal Research Center for Food Systems named after
V.M. Gorbатов RAS

E-mail: e.zaiko@fneps.ru

Russia, Moscow

Olga Evgenievna Ivanova

Candidate of Veterinary Sciences, Head of department

The Russian State Center For Animal Feed And Drug
Standardization And Quality

E-mail: o.ivanova@vgnki.ru

Russia, Moscow

УДК 577.11

ГРНТИ 69.51.03

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.31

**Гендриксон О.Д., Зверева Е.А., Максимова К.А.,
Бондаренко А.П., Еремин С.А.**

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ МИКРОЦИСТИНА-LR

Для контроля высокотоксичного фикотоксина микроцистина-LR, контаминирующего пищевые продукты, разработана тест-система на основе поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА), позволяющая проводить быстрое скрининговое тестирование, предел обнаружения микроцистина-LR – до 7,5 нг/мл; продолжительность анализа – 10 мин.

Ключевые слова: фикотоксины, микроцистин-LR, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, пищевая безопасность

**Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Maksimova K.A.,
Bondarenko A.P., Eremin S.A.**

A.N. Bach Institute of Biochemistry,

Research Center of Biotechnology of the RAS

FLUORESCENT POLARIZATION IMMUNOASSAY OF MICROCYSTIN-LR

To control the highly toxic phycotoxin microcystin-LR, which contaminates food, a test system based on polarizing fluorescent immunoassay has been developed allowing for rapid screening testing, the detection limit of microcystin-LR is up to 7.5 ng / ml; duration of analysis – 10 min.

Keywords: phycotoxins, microcystin-LR, fluorescence polarization immunoassay, food safety.

Введение

Оперативный мониторинг контаминации пищевой продукции на разных этапах ее производства и потребления является крайне актуальной задачей [1], для решения которой нужны методы достоверного, чувствительного и оперативного контроля токсичных контаминант. Одним из таких контаминант является фикотоксин микроцистин-LR (MC-LR), продуцируемый пресноводными цианобактериями, главным образом *Microcystis aeruginosa* [2]. Входя в состав планктона и бентоса, цианобактерии служат пищей для моллюсков и рыбы и накапливаются в их организмах. Употребление продуктов, контаминированных MC-LR, вызывает развитие острых и хронических токсических эффектов. Таким образом, перенос фикотоксинов вдоль пищевых цепочек приводит к серьезной опасности для человека [3].

В связи с развитием мирового рынка рыбной продукции и морепродуктов принципиальное значение имеет возможность оперативного мониторинга их безопасности. Для этих целей перспективны гомогенные иммуноаналитические тест-системы, в частности, системы поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА), характеризующиеся минимумом компонентов и простым протоколом тестирования [4]. Известен ряд успешных разработок тест-систем, основанных на принципе ПФИА, в том числе и для фикотоксина [5], однако вопрос о выборе реагентов для обеспечения разной специфичности выявления структурно близких токсикантов остается открытым. С учетом вышесказанного, целью данной работы являлась разработка и характеристика ПФИА микроцистина-LR.

1. Принцип ПФИА

Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ основан на конкурентном взаимодействии анализируемого соединения и его меченого флуорофором производного (так называемого трейсера), со специфическими антителами и измерении значения поляризации флуоресценции (mP) [4]. Поляризация флуоресценции свободного трейсера в растворе имеет низкое значение, а при включении трейсера в комплекс с антителами возрастает [4]. В соответствии с этим, величина mP реакционной смеси отражает отношение связанной и свободной фракций трейсера и обратно пропорциональна концентрации содержащегося в пробе антигена,

2. Получение конъюгата MC-LR с флуоресцентным маркером

Для разработки чувствительной системы ПФИА необходимо подобрать пару антител-трейсер, сочетающую высокую аффинность и легкое вытеснение аналитом трейсера из комплекса с антителом. С этой целью была изучена способность связывания меченого флуорофором MC-LR с антителами. Для разработки ПФИА использовались поликлональные антитела к MC-LR (pAb/Yu49 и pAb/Yu32), полученные проф. Prof. Huan-Tsung Chang (National Taiwan University). Для получения трейсера использовали этилендиаминфлуоресцеинтиокарбамат (ЭДФ), способный образовывать амидную связь с карбоксильной группой MC-LR. Конъюгат MC-LR-ЭДФ синтезировали методом карбодимидной активации. Для этого N,N'-дициклогексилкарбодимид (ДЦК) и N-гидроксисукцинимид (ГС) растворяли в диметилформамиде и добавляли к раствору MC-LR. Мольное соотношение MC-LR:ГС:ДЦК составляло 1:16:16. Смесь перемешивали в течение 3 ч и добавляли ЭДФ (MC-LR:ЭДФ = 1:1) с последующей часовой инкубацией. Реакционную смесь разделяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) в смеси хлороформ:метанол, 4:1. Хроматограмма содержала две полосы – верхнюю, соответствующую нативному флуорофору, и нижнюю – его конъюгату с MC-LR. Нижнюю полосу ($R_f=0,11$) экстрагировали метанолом и снова очищали с помощью ТСХ (рисунок 1). Состав конъюгата MC-LR-ЭДФ был подтвержден методом масс-спектрометрии.

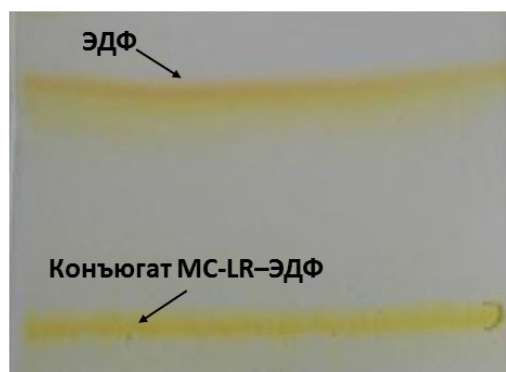


Рисунок 1. Результаты ТСХ конечной реакционной смеси при синтезе MC-LR-ЭДФ

3. Изучение иммунных свойств трейсера

Для полученного флуоресцентно меченного МС-LR было исследовано его взаимодействие со специфическими антителами. Предварительно были измерены значения интенсивности и поляризации флуоресценции для серии разведений конъюгата МС-LR-ЭДФ в боратном буфере (рисунок 2). Рабочее разведение трейсера для регистрации иммунного взаимодействия выбирали на границе резкого увеличения mP таким образом, чтобы интенсивность флуоресценции раствора конъюгата МС-LR-ЭДФ в 10–15 раз превышала фоновую интенсивность флуоресценции (для буферного раствора mP = 5). Согласно полученным данным, рабочее разведение трейсера составило 1:1000.

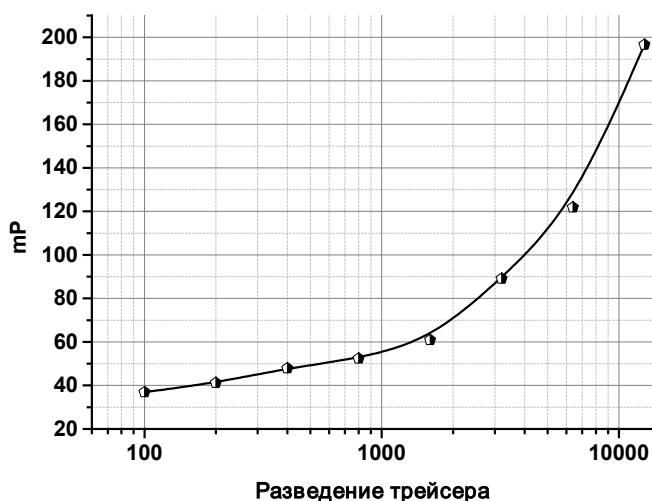


Рисунок 2. Зависимость mP от разведения конъюгата МС-LR-ЭДФ

Далее была выбрана рабочая концентрация специфических антител. Для этого готовили серию разведений антител в боратном буфере (1:200–1:52500), добавляли МС-LR в рабочем разведении, выбранном на предыдущей стадии, инкубировали в течение 5 мин и измеряли поляризацию и интенсивность флуоресценции. Было установлено, что МС-LR-ЭДФ эффективно взаимодействует с обоими препаратами антител. Оптимальное разведение антител, соответствующее 80%-ному связыванию с антигеном и тем самым обеспечивающее высокий и стабильный аналитический сигнал (mP), составило 1:800 для препарата pAb/Yu49 и 1:600 – для pAb/Yu32 (рисунок 3).

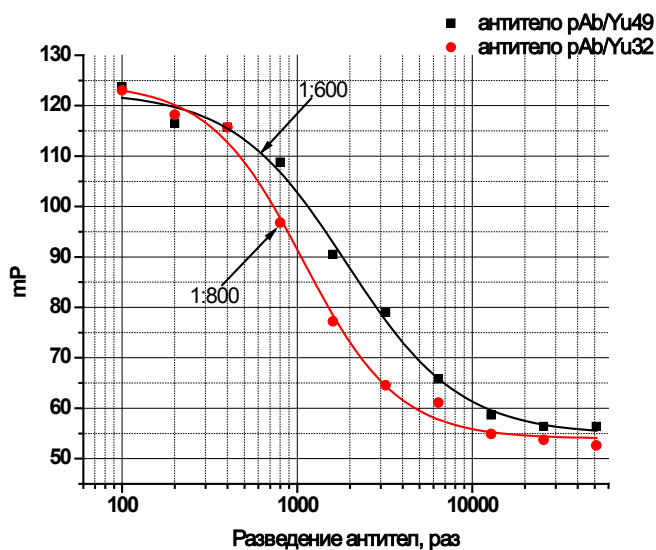


Рисунок 3. Зависимость mP от разведения антител

4. Разработка ПФИА MC-LR

Для детекции MC-LR был разработан традиционный конкурентный ПФИА, основанный на конкуренции определяемого антигена и трейсера за ограниченное количество центров связывания антител и измерениями mP реакционной смеси. В ходе анализа к пробам, содержащим MC-LR, последовательно добавляли растворы трейсера и специфических антител в выбранных рабочих разведениях. Полученную смесь перемешивали в течение 5 мин и измеряли поляризацию флуоресценции.

Предел обнаружения MC-LR был определен как $mP_{\min} = mP_0 - 3SD$, где mP_0 – величина поляризации флуоресценции при отсутствии аналита, SD – стандартное отклонение. Рабочий диапазон определяемых концентраций (IC_{20} – IC_{80}) определяли как концентрации аналита, приводящие к ингибированию 20–80% взаимодействия с MC-LR–ЭДФ. За величину IC_{50} принимали концентрацию MC-LR, вызывающую 50%-ное ингибирование связывания антител с трейсером. Стандартное отклонение ($n = 10$) при использовании антител pAb/Yu32 составило 1,88 нг/мл, а при использовании антител pAb/Yu49 – 0,67 нг/мл. Согласно полученным калибровочным кривым (рисунок 4), предел обнаружения MC-LR при использовании антител pAb/Yu49 составил 20 нг/мл, а антител pAb/Yu32 – 7,5 нг/мл. Рабочие диапазоны определяемых концентраций MC-LR – 58–470 нг/мл и 15–125 нг/мл, соответственно.

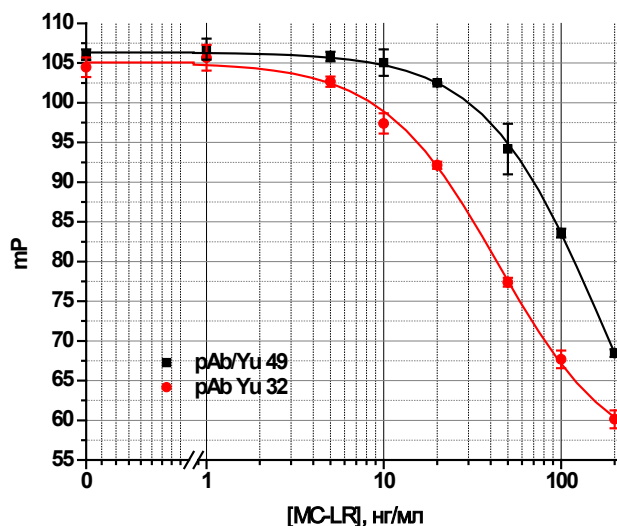


Рисунок 4. Калибровочные кривые определения MC-LR в ПФИА

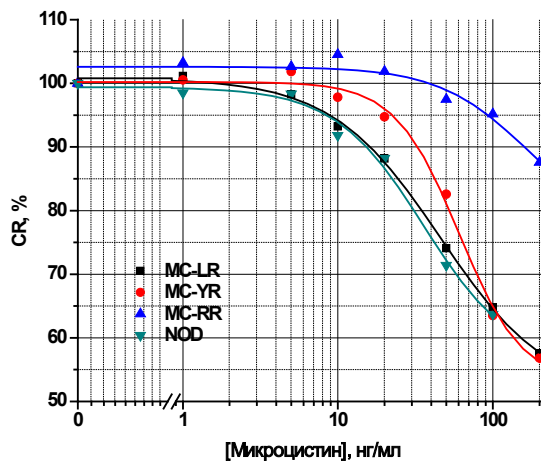


Рисунок 5. Анализ перекрестной реактивности в ПФИА

Следующим этапом разработки была оценка перекрестной реактивности (*CR*) антител рAb/Yu32 со структурными аналогами MC-LR – MC-RR, MCY-YR и нодуларин (NOD). Для этого вместо MC-LR в реакционную смесь добавляли растворы соответствующих аналогов и проводили ПФИА. Перекрестную реактивность рассчитывали как процентное соотношение IC_{50} MC-LR к IC_{50} структурного аналога. *CR* составила 76% для MC-YR, 27% – для MC-RR и 128 – для NOD (рисунок 5), то есть тест-система пригодна для групп-специфического анализа.

Заключение

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

- разработана тест-система для простого и быстрого определения микроцистина-LR, основанная на принципе ПФИА;
- предел обнаружения MC-LR составляет 7,5 и 20 нг/мл для различных препаратов антител, время анализа – 10 мин.;
- показана перспективность разработанной тест-системы как средства скринингового контроля микроцистина-LR.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 20-43-07001).

Литература

1. *Thompson L.A., Darwish W.S.* Environmental chemical contaminants in food: review of a global problem. // *J. Toxicol.* – 2019. – 2345283.
2. *Pham T.-L., Utsumi M.* An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. // *J. Environ. Manage.* – 2018. – 213. – 520-529.
3. *Fessard V., Le Hégarat L.* A strategy to study genotoxicity: application to aquatic toxins, limits and solutions. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2010. – 397. – 1715–1722.
4. *Hendrickson O.D., Taranova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A.* Fluorescence polarization-based bioassays: new horizons. // *Sensors.* – 2020. – 20(24). – Article 7132.
5. *Zhang H., Yang S., Beier R.C., Beloglazova N.V., Lei H., Sun X., Ke Y., Zhang S., Wang Z.* Simple, high efficiency detection of microcystins and nodularin-R in water by fluorescence polarization immunoassay. // *Anal. Chim. Acta.* – 2017. – 992. – 119-127.

Сведения об авторах

Ольга Дмитриевна Гендриксон

канд. хим. наук, ст. науч. сотр.
Эл. почта: odhendrick@gmail.com

Елена Анатольевна Зверева

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.
Эл. почта: zverevaea@yandex.ru

Ксения Алексеевна Максимова

Эл. почта: maksimova.ks@gmail.com

Александра Павловна Бондаренко

Эл. почта: bondarenko.alexandra@gmail.com

Сергей Александрович Еремин

д-р хим. наук, проф., ст. науч. сотр.

Эл. почта: eremin_sergei@hotmail.com

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

Россия, Москва

Information about authors

Olga Dmitrievna Hendrickson

PhD, senior researcher
E-mail: odhendrick@gmail.com

Elena Anatolievna Zvereva

PhD, senior researcher
E-mail: zverevaea@yandex.ru

Ksenia Alekseevna Maksimova

E-mail: maksimova.ks@gmail.com

Alexandra Pavlovna Bondarenko

E-mail: bondarenko.alexandra@gmail.com

Sergey Aleksandrovich Eremin

E-mail: eremin_sergei@hotmail.com

Dr. of Chem. sciences, professor, senior researcher

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

УДК 57543.066:57.083.3
ГРНТИ 69.51.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.32

Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Поправко Д.С.,
Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.
Институт биохимии им. А.Н. Баха,
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

МЕМБРАННЫЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СЫРЬЯ В МЯСОПРОДУКТАХ

Разработаны мембранные тест-системы для быстрой внелабораторной идентификации источников мясного сырья с помощью иммунохроматографического выявления белковых биомаркеров - тропонина I, миоглобина, иммуноглобулина. Показана их эффективность для контроля разных видов пищевых продуктов.

Ключевые слова: мембранные тесты, иммунохроматографический анализ, фальсификация мясопродуктов

Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Popravko D.S.,
Zherdev A.V., Dzantiev B.B.
A.N. Bach Institute of Biochemistry,
Research Center of Biotechnology of the RAS

MEMBRANE TESTS FOR IDENTIFICATION OF RAW MATERIALS IN MEAT PRODUCTS

Membrane test systems have been developed for rapid out-of-laboratory identification of raw meat using immunochromatographic detection of protein biomarkers – troponin I, myoglobin, immunoglobulin. Their effectiveness has been shown for the control of various types of meat-containing products.

Keywords: membrane tests, immunochromatographic analysis, falsification of meat products

Введение

Мясо и мясные продукты являются важной частью рациона. Хотя нормативные акты устанавливают требования обязательной маркировки пищевой продукции с описанием ее компонентов, распространены случаи нарушения декларируемого состава, фальсификации продуктов посредством различных белок-содержащих заменителей, а также использования мяса животных, не предусмотренных рецептурой [1]. Такие нарушения могут негативно сказываться на здоровье людей, нарушать традиции и религиозные убеждения [2, 3].

Для эффективного контроля состава мясной продукции на всех этапах производства необходимы как высокочувствительные методы анализа, выполняемые в специальных лабораториях (жидкостная хроматография, электрофорез, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ), так и экспрессные методы, позволяющие идентифицировать сырье во внелабораторных условиях. Перспективны для такого быстрого тестирования методы иммунохроматографического анализа (ИХА), характеризующиеся простотой проведения, производительностью, возможностью быстрой качественной оценки присутствия или отсутствия контролируемого соединения [4].

Для разработки иммуноаналитических тест-систем, достоверно оценивающих состав мясного сырья или готового продукта, принципиальное значение имеет выбор контролируемого биомаркера [5]. Эффективный биомаркер должен присутствовать в тестируемом материале в высоких концентрациях, сохранять иммунохимические свойства при различных видах обработки. Например, для идентификации свинины использовались тропонин I [6], сывороточный альбумин [7], иммуноглобулины [8]. Однако палитра

доступных иммунохроматографических тестов разной специфичности весьма ограничена, возможность достоверной идентификации видовой принадлежности мясного сырья с их использованием остается предметом дискуссий.

Представляемая статья суммирует результаты проведенных нами исследований по разработке и характеристике иммунохроматографических тест-систем для идентификации мясного сырья в мясопродуктах.

1. Принцип иммунохроматографии и синтез реагентов для его проведения

Иммунохроматография позволяет проводить быстрое одностадийное тестирование, поскольку все реагенты, необходимые для выявления аналитов и формирования детектируемых комплексов, заранее нанесены на различные участки мультимембранного композита (тест-полоски). Контакт тест-полоски с жидкой пробой инициирует движение вдоль нее реагентов и их специфические взаимодействия. Результатом анализа является образование окрашенных зон на тест-полоске, качественно контролируемое визуально или количественно оцениваемое с помощью портативных детекторов [9].

Для ИХА были синтезированы наночастицы золота цитратным восстановлением золотохлористоводородной кислоты по методу Френса [10]. Средний диаметр частиц составил 30 нм, форма близка к сферической. Выбор условий конъюгирования антител с наночастицами золота проводили на основании фотометрических данных, отражающих агрегацию продукта данной реакции после добавления 10% раствора NaCl [11]. На основании полученных концентрационных зависимостей для конъюгирования использовали концентрации антител, минимально необходимые для достижения стабильного уровня оптической плотности в условиях высокой ионной силы, что свидетельствует о стабилизации поверхности наночастиц.

2. ИХА белковых идентификаторов мясного сырья

Нами были разработаны иммунохроматографические тест-системы для детекции таких молекулярных биомаркеров мышечной ткани, как скелетный тропонин I, миоглобин, иммуноглобулины. Данные белки характеризовались высоким, незначительно варьирующим уровнем в мышечных тканях, межвидовой изменчивостью антигенных детерминант и возможностью иммунохимического выявления после разных видов ферментативной и температурной обработки.

Реализован «сэндвич»-формат анализа, который обеспечивает простой контроль наличия или отсутствия биомаркера, низкий предел обнаружения и высокую селективность благодаря распознаванию двух антигенных детерминант. Проведен скрининг специфичных к определяемым белкам антител методом ИФА, получены и охарактеризованы реагенты для ИХА. Работы по оптимизации тест-систем были направлены на обеспечение высокой воспроизводимости регистрируемого оптического сигнала (окрашивания формирующегося на мембране иммунного комплекса, меченного золотыми наночастицами) и выявление биомаркеров в минимальных концентрациях. Для этого варьировали: используемые мембранные компоненты тест-полосок, концентрации конъюгата золотых наночастиц и иммобилизуемых на мембранах антител, состав среды, используемой для иммобилизации, выбор и концентрации дополнительных стабилизирующих реагентов.

Предложена пробоподготовка мясного сырья и готовых продуктов для проведения ИХА, включающая гомогенизацию, экстракцию целевого белка специальным буфером и центрифугирование полученных экстрактов. При детекции термостабильного белка тропонина I вводилась дополнительная стадия кратковременной инкубации экстрактов в кипящей водяной бане, обеспечивающая денатурацию большинства остальных белков и минимизацию неспецифического связывания при проведении ИХА [12].

Разработана тест-система для определения скелетного тропонина I, которая специфически выявляла биомаркер в пробах мяса млекопитающих (корова, овца, свинья,

лошадь), давая отрицательные результаты для тропонина I, присутствующего в мясе птицы (курица, индейка). Наличие говядины в курином фарше достоверно количественно контролируется, начиная с 1%-ной добавки [12].

Иммунохроматографическая тест-система, основанная на использовании в качестве аналита миоглобина, специфически выявляла биомаркер в мясе свиньи (рис. 1), отличая его от миоглобина других видов млекопитающих и птиц. Разработанный протокол был применен для характеристики экстрактов мясных смесей, в которых к фаршу из говядины было добавлено разное количество фарша свинины. Показано, что достоверное окрашивание аналитической зоны появляется при тестировании говяжьего фарша, содержащего 0.01% свинины [13].

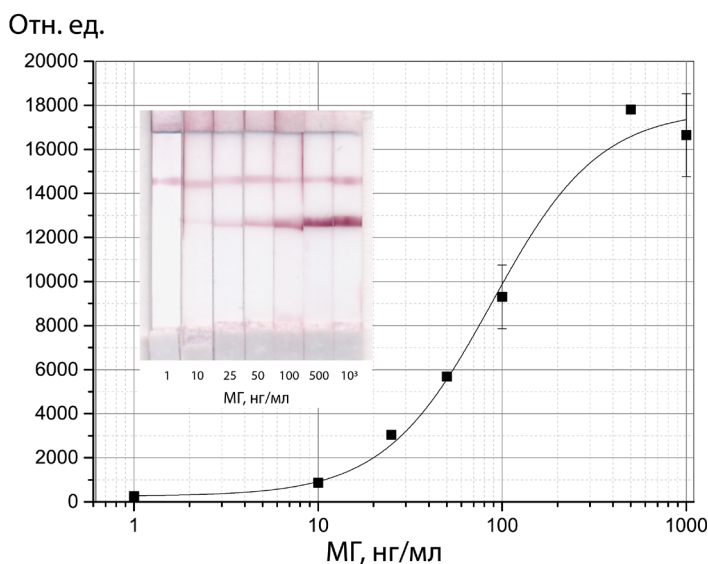


Рисунок 1. Иммунохроматографическое определение миоглобина в буфере: внешний вид тест-полосок и зависимость интенсивности окраски в аналитической зоне от концентрации миоглобина.

Использование в качестве определяемого соединения иммуноглобулинов позволило разработать тест-системы для детекции свинины и куриного мяса (рис. 2) в мясных смесях и мясопродуктах. Тест-система позволяет количественно оценивать содержание куриного мяса в фарше из говядины, окрашивание аналитической зоны наблюдается, начиная с внесения 0.06% куриного фарша [14].

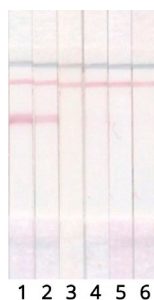


Рисунок 2. Апробация тест-системы с детекцией куриных иммуноглобулинов в качестве белкового идентификатора при тестировании мяса разных видов животных:
1 – курица, 2 – индейка, 3 – корова, 4 – свинья, 5 – кролик, 6 – овца.

3. Анализ мясных продуктов с помощью разработанных мембранных тестов

Для проверки возможностей практического применения разработанных аналитических систем в ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН были изготовлены и предоставлены мясные продукты известного состава. Проведенная апробация показала, что разработанные тесты эффективно выявляют молекулярные биомаркеры не только в

сырье, но и в конечных продуктах, прошедших технологические стадии ферментативной и температурной обработки. Полученные результаты позволяют оценить иммунохроматографические тест-системы как перспективное средство скринингового контроля аутентичности и заявленного состава мясных продуктов.

Заключение

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

1. Оценка чувствительности и специфичности разработанных иммунохроматографических тест-систем для идентификации сырья в мясопродуктах.
2. Подтверждение эффективности разработанных тест-систем для характеристики конечных технологических продуктов, подвергнутых ферментативной и тепловой обработке.

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

Литература

1. Kumar P., Chatli M.K., Mehta N., Singh P., Malav O.P., Verma, A.K. Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. - 2017. – 57. – 5. – 923–932.
2. Zia Q., Alawami M., Mokhtar N.F.K., Mohd, R., Nhari H.R., Hanish I. Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products. // Food Chem. – 2020. – 324. – 126664.
3. Premanandh J., Bin Salem S. Progress and challenges associated with Halal authentication of consumer packaged goods. // J. Sci. Food Agric. – 2017. – 97. - 4672–4678.
4. Ballin N.Z. Authentication of meat and meat products. // Meat Sci. – 2010. – 86. – 577–587.
5. Vlachos A., Arvanitoyannis I. S., Tserkezou P. An updated review of meat authenticity methods and applications. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. - 2016. – 56. – 7. – 1061–1096.
6. Chen F.C., Hsieh Y.-H.P. Porcine troponin I: A thermostable species marker protein. // Meat Sci. – 2002. – 61. – 55–60.
7. Masiri J., Benoit L., Barrios-Lopez B., Thienes C., Meshgi M., Agapov A., Dobritsa, A., Nadala C., Samadpour M. Development and validation of a rapid test system for detection of pork meat and collagen residues. // Meat Sci. – 2016. – 121. – 397–402.
8. Kuswandi B., Gani A.A., Ahmad M. Immuno strip test for detection of pork adulteration in cooked meatballs. // Food Biosci. – 2017. – 19. - 1–6.
9. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis. // TrAC Trends Anal. Chem. – 2014. – 55. – 81–93.
10. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. // Nature Phys. Sci. - 1973. – 241. – 105. – 20–22.
11. Hermanson G.T. // Academ. Press, Elsevier: Amsterdam. – 2008. – 900 p.
12. 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. // Food. – 2020. – 9. – 11. – 1662.
13. 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. // Appl. Sci. – 2020. – 20. – 21. – 7437.
14. 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 Chem. – 2021. – 344. – 128598.

Сведения об авторах

Елена Анатольевна Зверева

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.,
Эл. почта: zverevaeva@yandex.ru

Ольга Дмитриевна Гендриксон

канд. хим. наук, ст. науч. сотр.,
Эл. почта: odhendrick@gmail.com

Демид Сергеевич Поправко

инженер,
Эл. почта: dspoppravko@mitht.ru

Анатолий Виталиевич Жердев

канд. биол. наук, вед. науч. сотр.,
Эл. почта: zherdev@inbi.ras.ru

Борис Борисович Дзантиев

д-р хим. наук, профессор, рук. отдела,
Эл. почта: dzantiev@inbi.ras.ru
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ
«Фундаментальные основы биотехнологии»
РАН
Россия, Москва

Information about authors

Elena Anatolievna Zvereva

Ph.D., Senior researcher
E-mail: zverevaeva@yandex.ru

Olga Dmitrievna Hendrickson

Ph.D., Senior researcher
E-mail: odhendrick@gmail.com

Demid Sergeevich Popravko

Engineer
E-mail: dspoppravko@mitht.ru

Anatoly Vitalievich Zherdev

Ph.D., Leading researcher
E-mail: zherdev@inbi.ras.ru

Boris Borisovich Dzantiev

Dr.Sc, Professor, Head of department
E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru
A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of
Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Mos-
cow, Russia

УДК 613.29; 663.15-18

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.33

^{1,2}Багрянцева О.В., ²Шевелева С.А.

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ

²ФИЦ питания и биотехнологии

**ВОПРОСЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БЕЗОПАСНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

В статье приведены обоснования требований, предъявляемые в отношении безопасного использования технологических микроорганизмов в производстве пищевой продукции.

Ключевые слова: оценка рисков, штамм-продуцент, генетически модифицированный микроорганизм, мутантный микроорганизм, пищевые ингредиенты

^{1,2}Bagryantseva O.V., ²Sheveleva S.A.

¹Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology

²First Moscow State Medical University. I.M. Sechenov of Health Ministry

**ISSUES OF ENSURING THE SAFE USE OF TECHNOLOGICAL MICROORGANISMS
IN THE FOOD INDUSTRY**

The article provides the substantiation of the requirements for the safe use of technological microorganisms in the production of food.

Keywords: risk assessment, producer strain, genetically modified microorganism, mutant microorganism, food ingredients

Введение. В настоящее время в пищевой промышленности широко используются методы биотехнологии. Для увеличения продуктивности технологических штаммов микроорганизмов широко используют направленный мутагенез и генно-инженерные

технологии. Применение этих методов приводит к изменению последовательности нуклеотидов ДНК и РНК. Такие изменения могут привести к продукции различных изоформ белков и, следовательно, к изменению свойств биологически активных веществ, продуцируемых микробной клеткой, увеличению или уменьшению экспрессии белка. Возможно увеличение вирулентности и патогенности микроорганизмов, используемых в пищевой промышленности, а также способности к продукции ими токсичных метаболитов или детерминант антибиотикоустойчивости, что, несомненно, может отразиться на качестве и безопасности пищевой продукции, получаемой с использованием микробного синтеза. Наиболее важными и широко используемыми в пищевой промышленности метаболитами являются ферментные препараты, аминокислоты, нуклеотиды, витамины, органические кислоты, жирные кислоты, используемые в качестве биологически активных добавок к пище, пищевых добавок, ароматизаторов, технологических вспомогательных средств. Более 90% такой пищевой продукции производится с использованием мутантных и генетически измененных микроорганизмов (ГММ), относящейся к продукции нового вида. Необходимость требований безопасного применения такой пищевой продукции обуславливает проведение в эксперименте оценок рисков технологических штаммов-продуцентов, продуцируемой ими пищевой продукции [1].

Цель статьи: Обоснование путей совершенствования требований безопасного использования технологических микроорганизмов, используемых в пищевой промышленности

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 соответствии с утвержденным Перечнем пищевой продукции, подлежащей исследованию на наличие генетически модифицированных (ГМ) микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генетически измененные аналоги, к 1-й группе относятся продовольственное сырье, пищевые продукты и пищевые компоненты, состоящие из жизнеспособной технологической микрофлоры или содержащие ее; ко 2-й группе – продукты, содержащие нежизнеспособные микроорганизмы технологической микрофлоры; к 3-й группе – пищевые компоненты и вещества, пищевые добавки и микронутриенты, произведенные с участием штаммов-продуцентов, но освобожденные от них в процессе технологической обработки [2].

В соответствии с [2] вся пищевая продукция, полученная с использованием жизнеспособных микроорганизмов, проходит санитарно-эпидемиологическую экспертизу в установленном порядке. Заявитель должен декларировать наличие генных модификаций у штаммов, используемых для производства пищевой продукции. Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы и выдачи заключения по санитарно-эпидемиологической экспертизе пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, осуществляется в соответствии с порядком, установленным: Постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников» № 7 от 06.04.99 и «О проведении микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов» № 149 от 16.09.03. В соответствии с этими требованиями, а также с [2] микроорганизмы, используемые в производстве пищевой продукции, должны быть идентифицированы по фенотипическим и генотипическим свойствам. При этом, в отношении ГММ должны быть представлены сведения о источнике и нуклеотидной последовательности целевого гена и его регуляторных элементов,

цели генной модификации, происхождении и таксономическом положении штамма-донора, характеристика (карта) вектора, наличие в нем полилинкеров и селективных маркеров; Сведения о стабильности интеграции чужеродной ДНК в хромосому или плазмиду ГММ, а также использовании транспозонов при конструировании штаммов ГММ, стабильности генотипических и фенотипических характеристик. В отношении штаммов-продуцентов должны быть представлены сведения об их биологических и патогенных свойствах (об их вирулентности, патогенности), способности к диссеминации внутренних органов, токсинообразованию, продукции гемолизина, антибиотиков, о возможности их взаимодействия с резидентной флорой кишечника человека и к трансмиссивной передаче генетического материала в резидентную флору кишечника человека.

В отношении пробиотических культур необходимо представление дополнительных сведений, включающих данные об их резистентности к кислоте и желчи, способности к симбиозу с резидентной микрофлорой желудочно-кишечного тракта, способности к адгезии, способности к иммуностимулирующему эффекту [2].

Кроме того, в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 23.09.2013 № 839 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, включая указанную продукцию, ввозимую на территорию Российской Федерации» (с изменениями на 2017 г.), производитель обязан представить информацию о ГМО: наименование модифицированного организма и сведения о трансформационном событии, виды целевого использования ГМО, сведения о специальных условиях использования.

Для полной и надежной идентификации конкретного штамма микроорганизма предусмотрено создание электронной базы данных о целевых, селективных и маркерных генах, мигрирующих элементах, неэкспрессируемых последовательностях и регуляторных элементах, а также векторных конструкциях класса, которые используются при создании технологических микроорганизмов [2]. Таким образом, нормативными и законодательными документами РФ предусмотрены основные положения безопасного использования технологических организмов.

Появившиеся в последние годы новые научные данные позволили в значительной степени усовершенствовать требования к безопасности технологических микроорганизмов и методы, используемые в процессе проведения оценок рисков их использования в пищевой промышленности. Вместе с тем, оценка рисков технологических микроорганизмов, проводимая в соответствии с требованиями Международного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (JECFA) в значительной степени отличается от требований Европейского Союза. Так, JECFA признает микроорганизм безопасным для здоровья человека на основании эмпирических данных, свидетельствующих об отсутствии токсичности пищевой продукции, производимой при их использовании. При этом JECFA утверждает отсутствие необходимости проведения токсикологических исследований на уровне видов и штаммов микроорганизмов [3,4]. Такой подход к установлению безопасности технологических микроорганизмов принят также в США при установлении статуса GRAS [5]. Однако он не гарантирует отсутствие рисков для здоровья человека при использовании пищевой продукции, получаемой при помощи микробного синтеза так, как появление делеций, мутаций и других изменений последовательности нуклеотидов в ДНК, полученные в результате направленного мутагенеза или при помощи трансгенеза, может привести к продукции различных изоформ белков и, следовательно, изменению свойств биологически активных веществ, продуцируемых микробной клеткой, а также к активации или индукции экспрессии токсичных метаболитов [1]. При этом, безопасное использование микроорганизмов при определенных условиях не означает, что он будет безопасен при других условиях [6,7].

Европейское агентство по безопасности пищевой продукции (EFSA) – орган, осуществляющий оценки рисков, всегда учитывает безопасность микроорганизмов при внесении изменений в их генотип. При этом EFSA с 2007 г ведет перечень микроорганизмов (перечень QPS), для которых имеются доказательства того, что вид микроорганизма при определенных условиях является безопасным для человека. Установлено требование один штамм микроорганизма может быть использован в производстве одного продукта (фермента, витамина, и др. биологически активных веществ, а также в качестве стартовой, заквасочной, пробиотической культуры). Кроме того, EFSA предусмотрен контроль безопасности микроорганизмов, уже включенных в список QPS в процессе их использования в производстве пищевой продукции, хотя и с меньшим количеством требований [6-8].

Некоторые группы микроорганизмов, с учетом существующих данных и/или в связи с неоднозначным таксономическим положением, такие как мицелиальные грибы, бактериофаги, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Streptomyces spp.* и *Oomycetes*, не включены в перечень QPS. В отношении мицелиальных грибов это основано на возможном производстве вторичных метаболитов грибов - микотоксинов и антибиотиков [9]. Поэтому в отношении мицелиальных грибов устанавливается статус QPS «для технологических целей» [10]. Следует отметить, что в случае появления новых данных о неблагоприятном воздействии штамма, получившего статус QPS, он может быть исключен из перечня разрешенных для использования в пищевой промышленности [7].

EFSA актуализировало критерии, используемые для характеристики производственных штаммов, включая генетически модифицированные микроорганизмы. При этом особое внимание уделяется анализу последовательности всего генома, как ключевом элементе оценки безопасности. При этом данные последовательностей ДНК сравнивают с базами данных последовательностей микроорганизмов, отвечающих за их вирулентность, выработку или устойчивость к противомикробным препаратам, производство токсичных метаболитов¹ [11]. Появление возможности получения данных о последовательности всего ДНК микроорганизма, позволило EFSA присваивать статус QPS «для технологических целей» в отношении ГМ-микроорганизмов, при условии, что генетические модификация не вызывает опасений по поводу их безопасности [9].

В отношении микроорганизмов, не соответствующих критериям QPS, EFSA требует экспериментального подтверждения отсутствия штамма-продуцента и его ДНК в продуцируемой им пищевой продукции. При этом следует отметить, что, в отличие от JECFA, в EFSA установлено правило установления безопасности природных «традиционно используемых в пищевой промышленности» штаммов технологических микроорганизмов, ДНК которых не была изменена, так как известно, что многие микроорганизмы, традиционно используемые в пищевых продуктах, способны продуцировать токсины (например, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus oryzae*). Кроме того, определение «традиционный» — это субъективное понятие, которое меняется в зависимости от культуры и пищевых привычек [7]. Такая позиция предусматривает необходимость проведения оценок рисков в отношении природных, мутантных и ГМ технологических штаммов микроорганизмов [7,8].

Схема подтверждения безопасности технологических микроорганизмов, полученных от уже ранее используемых в пищевой промышленности штаммов, используемая JECFA и EFSA, включает возможность подтверждение их безопасности только на основе анализа в экспериментах *in vitro* (на культурах клеток) генотоксичности, мутагенности, хромосомных aberrаций и др., как штаммов микроорганизмов, так и продуцируемых ими веществ [8,9,11,12]. Считаем невозможным использование такого подхода так как в результате анализа свойств веществ и штаммов микроорганизмов, основанный только на результатах полученных методов *in vitro*, невозможно получить интегральные данные об

¹ <http://busco.ezlab.org>; <https://card.mcmaster.ca/>; <http://en.mediterranean-infection.com/article.php?laref=283%26titre=arg-annot>; <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>

их влиянии на организм. Таким образом, считаем необходимым проведение комплекса токсикологических исследований, характеризующего влияние исследуемого штамма микроорганизма и продуцируемых им веществ в целом на организм.

В соответствии с международными требованиями [6], требованиями Евразийского экономического союза (ЕАЭС) [13] и законодательством Российской Федерации [2,14], ЕС [15-19], в отношении продукции нового вида установлено требование проведения исследований пероральной токсичности пищевой продукции в подостром эксперименте в течение 90 дней. Однако, перечень необходимых исследований не включает необходимость анализа возможности диссеминации внутренних органов штаммом микроорганизма, а также анализ влияния как штамма, так и продуцируемого им вещества на микробиоценоз кишечника и иммунный статус организма.

К важнейшим функциям микробиоценоза кишечника, следует отнести: колонизационную резистентность, основным механизмом которой является активизация иммунной системы; способность микроорганизмов синтезировать необходимые организму биологически активные вещества, такие как витамины, гормоны, антибиотики; детоксикацию экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов; участие бактерий в метаболизме белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот и других жизненно важных веществ. Наконец, бактерии способствуют пищеварению, оказывая морфокинетическое действие на слизистые оболочки, на сорбцию абиотических компонентов, транзит нутриентов, газовый состав, мышечный тонус кишечника. В случае поступления в кишечник патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, кишечная микрофлора при определенных условиях может являться источником эндогенных инфекций, вызывать сенсibilизацию организма, сопровождающуюся различными аллергическими проявлениями, продуцировать биологически активные вещества, оказывающих токсическое и мутагенное действие на макроорганизм [20-23]. Следовательно, проведение исследований влияния штаммов-продуцентов и их метаболитов является одним из важнейших при определении их безопасности при использовании в пищевой промышленности.

При этом положение о том, что в готовой продукции ни живые штаммы-продуценты, ни их ДНК не должны обнаруживаться, не гарантирует обеспечение безопасности таковой продукции. В этой связи следует исходить из предположения возможности недостаточной очистки пищевой продукции от технологической микрофлоры и продуцируемых ими токсинов и других факторов патогенности. Показано, что в 3 % случаев обнаруживается содержание жизнеспособных клеток и/или ДНК штаммов-продуцентов в пищевой продукции, вырабатываемой методами микробного синтеза [24] Отмечаются факты обнаружения в пищевой продукции микотоксинов и других токсичных метаболитов [1].

Вместе с тем, следует отметить, что в настоящее время в Технических регламентах Евразийского экономического союза (ЕАЭС) требования к безопасности, используемых в производстве пищевой продукции технологических микроорганизмов, в том числе ГММ и мутантных штаммов, практически, отсутствуют. С целью обеспечения безопасности пищевой продукции, производимой с использованием технологических микроорганизмов подготовлены предложения в Технические регламенты таможенного союза «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» (ТР ТС 029/2012) (Изменение №2) и «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) (Изменение №4) в части регламентов безопасности штаммов-продуцентов (в том числе мутантных и генетически измененных) и получаемой с их использованием пищевой продукции, такой, как ферментные препараты, пищевые добавки, ароматизаторы, пищевые ингредиенты (аминокислоты, нуклеотиды, витамины, белки и пептиды, жирные кислоты и др). 16 апреля 2021 г (Протокол №30) Проект изменений №2 в ТР ТС 029/2012 был одобрен Советом по техническому регулированию и стандартизации при Министерстве промышленности и торговли Российской Федерации. Изменения №4 в ТР ТС 021/2011 в настоящее время проходят процедуру внутригосударственного согласования.

Кроме того, является необходимым разработать процедуру подтверждения соответствия технологических микроорганизмов и пищевой продукции биотехнологического происхождения, включающую порядок подтверждения качества и безопасности пищевой продукции, ранее используемой в пищевой промышленности и продукции нового вида. В процессе подтверждения соответствия продукции нового вида считаем обязательным введение дополнительного требования определения уровня возможного потребления оцениваемого технологического микроорганизма и/или вещества, полученного при помощи микробного синтеза, сбраживания или аутолиза (ферментации с использованием живых культур микроорганизма) в составе рационов с учетом методики, приведенной в руководстве EFSA [8,25].

Таким образом, ключевой элемент в оценке безопасности пищевой продукции, производимой с использованием микробного синтеза, является оценка безопасности производственного штамма. Поэтому название микроорганизма-производителя должно включать индивидуальный номер (код), присвоенный ему изготовителем и закрепленный в установленном порядке уполномоченным органом государства, на территории которого он находится в обращении. Данный номер присваивается на основании проведенного анализа рисков (анализа патогенности, токсигенности штамма-производителя, штамма-донора и штамма реципиента и других необходимых данных об его свойствах, которые могут повлиять на здоровье человека). Презумпция безопасности пищевой продукции, полученной с использованием различных штаммов производителей, не допускается.

Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (тема № 0529-2019-0057).

Литература

1. Багрянцева О.В. Обоснование необходимости разработки мероприятий по управлению рисками, связанными с использованием пищевой продукции, производимой при помощи микробного синтеза // Вопросы питания. 2020. -Т 89.- № 2.- С 64-76. DOI: 10.24411/0042-8833-2020-10017
2. Методические указания. МУК 2.3.2. 1830-04. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов.
3. 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/>
4. Evaluation of enzyme preparations used in the manufacture of foods// Draft Report. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. 9 Expert meeting of Working Group established to consider the evaluation of enzyme preparations used in the manufacture of foods. Rome, 11-14 December 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations 45 World Health Organization 46 Rome, 2019, 50 p.;
5. Guidance for Industry Enzyme Preparations: Recommendations for Submission of Chemical and Technological Data for Food Additive Petitions and GRAS Notices. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition January 1993; Revised July 2010. 12 p.// <http://www.fda.gov/FoodGuidances>
6. FAO guide to ranking food safety risks at the national level. Food Safety and Quality. FAO. 2020. Series No 10. Rome. 124 p. <https://doi.org/10.4060/cb0887en>
7. 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;

8. 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

9. 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>

10. Scientific report of EFSA Anticipation of future notifications to EFSA of microbial taxonomic units intentionally introduced into the food chain// *EFSA Journal* 2013;11(8):3340

11. Silano V., Baviera J.M.B., Bolognesi C. et al. Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes// *EFSA Journal* 2019;17(6):5741; doi: 10.2903/j.efsa.2019.5741

12. Herman L., Chemaly M., Cocconcelli P.S. et al. The qualified presumption of safety assessment and its role in EFSA risk evaluations: 15 years past// *FEMS Microbiology Letters*, 366, 2019, fny260; doi: 10.1093/femsle/fny260

13. 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-2020ю 100 с. // <http://www.eurasiancommission.org/ru/nae/news/Pages/26-02-2020-5/aspх>

14. Методические указания. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. МУК 4.2.2602—10. 60 с..

15. 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/>.

16. 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/>

17. Commission Regulation (EU) No. 234/2011 of 10 March 2011 implementing Regulation (EC) No. 1331/2008 of the European Parliament and of the Council establishing a common authorization procedure for food additives, food enzymes and food flavourings // *Official Journal of the European Union*. 2011. L. 64. P. 15–24.

18. Commission Implementing Regulation (EU) No. 562/2012 of 27 June 2012 amending Commission Regulation (EU) No. 234/2011 with regard to specific data required for risk assessment of food enzymes // *Official Journal of the European Union*. 2012. L. 168. P. 21–23.

19. Regulations (EC) No. 1331/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 establishing a common authorization procedure for food additives, food enzymes and food flavourings // *Official Journal of the European Union*. 2008. L. 354. P. 1–6.

20. Каламкарова Л.И., Багрянцева О.В., Билялова К.И. Микробный пейзаж толстого кишечника детей и взрослых при различных патологиях // *Известия Министерства Науки АН РК. Серия биологическая и медицинская*. Март-апрель 2002.-№2 (230).-С.43-53

21. Rowan-Nash A. D., Korry B.J., Mylonakis E., Belenkya P. Cross-Domain and Viral Interactions in the Microbiome// *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. March 2019. Volume 83.63 p. Issue 1 e00044-18

22. De Filippis F., Pasolli E., Ercolini D. The food-gut axis: lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health//*FEMS Microbiology Reviews*, fuaa015, 44, 2020, 454–489; doi: 10.1093/femsre/fuaa015

23. 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

24. Хогаев А. А. Разработка системы гигиенического контроля за оборотом пищевой продукции, полученной с использованием генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов//Автореферат дисс. кандидата медицинских наук.- М.- 2011.- 29 с.

25. Brodmann T., Endo A., Gueimonde M. Safety of Novel Microbes for Human Consumption: Practical Examples of Assessment in the European Union// Front. Microbiol. 2017, 8:1725; doi: 10.3389/fmicb.2017.01725

Сведения об авторах

Ольга Викторовна Багрянцева

д-р. биол. наук, вед. науч. сотр.

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Россия, Москва

проф. каф. гигиены питания и токсикологии

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

Эл. почта: bagryantseva@ion.ru

Россия, Москва

Светлана Анатольевна Шевелева

д-р. мед. наук, зав. лаб. биобезопасности и анализа нутримикробиома

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

Эл. почта: sheveleva@ion.ru

Россия, Москва

Author information

Olga V. Bagryantseva

Dr. Biol. Sci., Leading Researcher

Federal research centre of nutrition and biotechnology
Russia, Moscow

Professor of the Department of Nutritional Hygiene and Toxicology

First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of Russia

E-mail bagryantseva@ion.ru

Russia, Moscow

Svetlana A. Sheveleva

Dr. Medical Sci., head laboratory for biosafety and nutritional microbiome analysis

Federal research centre of nutrition and biotechnology

E-mail: sheveleva@ion.ru

Russia, Moscow

УДК 613.02, 664

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.34

¹Кобелькова И.В., ¹Коростелева М.М., ¹Никитюк Д.Б.,

¹Выборная К.В., ¹Раджабканиев Р.М., ¹Кобелькова М.С.,

¹Семенов М.М., ²Токаев Э.С.

¹ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи

²ООО «АКАДЕМИЯ-Т»

РАЗРАБОТКА СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ПИЩЕВОГО ПРОДУКТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ У СПОРТСМЕНОВ-ЮНИОРОВ

Показатели распространенности дефицита железа у спортсменок значительно варьируют, 31% имеет концентрацию ферритина ниже 12 нг/мл или насыщение трансферрином менее 16 нг/мл. Проведено медико-биологическое обоснование состава и разработан специализированный пищевой продукт (СПП) для питания спортсменов детского и подросткового (12-17 лет) возраста женского пола, обеспечивающий поступление железа в легкоусвояемой гемовой форме и витаминов, участвующих в обмене железа в организме не менее 15% и не более 50% от рекомендуемого суточного уровня потребления.

Ключевые слова: *специализированный пищевой продукт, дефицит железа, спортсмены, выносливость*

¹Kobelkova I.V., ¹Korosteleva M.M., ¹Nikityuk D.B., ¹Vibornaya K.V.,
¹Rajabkadiyev R.M., ¹Kobelkova M.S., ¹Semenov M.M., Tokayev E.S.
¹Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology
²LLC "ACADEMIA-T"

DEVELOPMENT OF A SPECIALIZED FOOD PRODUCT FOR THE PREVENTION OF IRON DEFICIENCY ANEMIA IN JUNIOR ATHLETES

The prevalence of iron deficiency in female athletes varies significantly, with 31% having a ferritin concentration below 12 ng/ml or a transferrin saturation of less than 16 ng/ml. The medical and biological substantiation of the composition was carried out and a specialized food product was developed for nutrition of female athletes of children and adolescents (12-17 years), that provides the intake an easily digestible of hem form's iron and vitamins involved in iron metabolism in the body for at least 15 % and no more than 50% of the recommended daily intake.

Keywords: *specialized food, iron deficiency, athletes, endurance*

Введение. Распоряжением Правительства РФ от 12.04.2020 N 993-р «Об утверждении Стратегии развития агропромышленного и рыбохозяйственного комплексов Российской Федерации на период до 2030 года» определена необходимость ускорения темпов развития национальной экономики для достижения основной цели экономического роста - социальное благополучие и высокие стандарты жизни граждан России, качественное инфраструктурное развитие и продовольственная безопасность страны. В условиях внешнеполитических санкций представляется целесообразным создание импортозамещающих технологий, в том числе в пищевой промышленности, для обеспечения пищевой безопасности страны и поддержания благополучия населения. Широкомасштабные эпидемиологические исследования свидетельствуют о высокой распространенности дефицита железа среди различных возрастных групп населения РФ [1, п. 2.45, п. 2.56]. Неполное и несбалансированное восполнение нутриентов с пищей приводит к снижению их адекватного физиологического уровня в организме, особенно это критично для детей в фазы быстрого роста и при повышенных психо-эмоциональных и физических нагрузках, что в частности наблюдается у спортсменов юного возраста. Существует прямая связь между уровнем обеспеченности организма железом и физической работоспособностью и выносливостью [2, с. 1, 3, с. 1]. Особого внимания заслуживает сочетание нескольких факторов риска снижения уровня гемоглобина в крови спортсменок, таких как высокие физические нагрузки, травматизм во время тренировочного процесса, повышенные потребности организма в период роста и развития, дополнительные потребности, обусловленные началом менархе.

Цель работы. Медико-биологическое обоснование состава, разработка технических условий, включая рецептуру, технологическую инструкцию, рекомендации по применению, на специализированный пищевой продукт для девочек-подростков 12-17 лет, являющийся хорошо усвояемым источником железа.

Материалы и методы. Проведение обзора литературы по распространенности анемии у детей различного возраста в Российской Федерации, нормативных документов, регламентирующих применение источников железа и витаминов, участвующих в его обмене железа девочек-спортсменок 12-17 лет, в специализированных пищевых продуктах (СПП) и биологически активных добавках к пище (БАД), определение уровней и форм

биологически активных веществ для введения в состав СПП для питания спортсменов указанного возраста и пола.

Полученные результаты. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) считает дефицит железа (ДЖ) глобальной проблемой здравоохранения, особенно актуальной в группах высокого риска, в том числе у девушек-спортсменок. Длительно существующий ДЖ приводит у детей раннего возраста к задержке психомоторного и речевого развития, частым инфекционно-воспалительным заболеваниям. У подростков на фоне ДЖ снижаются самооценка, когнитивные функции, интерес к окружающему, развиваются апатия, неадекватные поведенческие реакции. Последствия ДЖ могут сохраняться несмотря на лечение в течение многих месяцев, лет и даже всей жизни.

Анализ распространенности железодефицитных анемии среди детского населения Российской Федерации показывает, что за последние 30 лет уровень неадекватной обеспеченности практически не снижается (рис. 1).

Существуют две основные причины развития ДЖ: недостаточное поступление железа в организм и его повышенное расходование. В пубертатный период повышенная потребность в железе возникает вследствие интенсивного роста и увеличения мышечной массы, причем у занимающихся спортом подростков – с усиленным разрушением эритроцитов, а у девушек – в сочетании с дополнительной потерей на фоне наступления менархе. Кроме неадекватного питания, развитию ДЖ у детей и подростков способствуют и другие причины - хронические заболевания желудочно-кишечного тракта травматизм, паразитарные инвазии. Снижение выносливости, спортивной результативности в сочетании с отсутствием мотивации к тренировкам характерны для спортсменок различного уровня квалификации. Зачастую причиной этих симптомов являются железодефицитные состояния [4, с. 2], широко распространенные среди спортсменов в латентной стадии и с установленным диагнозом анемия.

Последствия дефицита железа приводят к биохимическим, физиологическим и морфологическим изменениям в органах и тканях, связанным с ухудшением спортивных результатов. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, диагноз латентного ДЖ верифицируется при снижении уровня сывороточного ферритина ниже 12 мкг/л, диагноз железодефицитная анемия – при сочетанном снижении сывороточного ферритина (СФ) и уровня гемоглобина менее 120 г/л (до 5 лет – менее 110 г/л) [5, с. 2]. Как в профилактических целях, так и при лечении необходимо устранить причину железодефицитного состояния и восполнить содержание железа в организме. Общеизвестным стандартным подходом является нормализация рациона питания и назначение ферропрепаратов (ФП). К важным рекомендациям следует отнести необходимость введения в рацион в виде биологически активных добавок к пище (БАД) или СПП витаминов и минералов в дозах, не превышающих 50% от адекватного уровня потребления для детей-спортсменов. Анализ нормативной документации показал, что такие требования изложены в технических регламентах Таможенного союза (ЕАЭС) и Единых санитарно-эпидемиологических требованиях [6, 7, 8, 9, 10].

Важным аспектом использования БАД и СПП, являющихся источником железа, является оценка их эффективности и безопасности, что напрямую зависит от химических свойств различных групп ФП – солевых и несолевых. Все солевые ФП обладают хорошей растворимостью и высокой диссоциацией в растворах, что позволяет поступившему в организм железу быстро соединиться с апотрансферрином, который таким образом превращается в насыщенный железом трансферрин, участвующий в последующих биохимических трансформациях вплоть до синтеза гема, цитохромов и других железосодержащих соединений. Однако быстрая растворимость и высокая диссоциация солевых ФП вызывают металлический привкус, потемнение зубов и десен, диспепсические явления, аллергические реакции. Отдельные случаи отравления солевыми ФП с летальным исхо-

дом выявили отрицательное воздействие ионов железа на активацию процессов свободно-радикального окисления и обусловленный этим прямой цитотоксический эффект на клетки головного мозга и печени [10, с. 3].

Несолевые ФП являются более безопасными. Трехвалентное железо практически не всасывается в желудочно-кишечном тракте. Однако комплексные органические соединения Fe(III) с рядом аминокислот, мальтозой существенно менее токсичны, чем Fe(II), но не менее эффективны, так как именно гемовое железо входит в состав гемоглобина, легко усваивается и наиболее безопасно для приема в детском возрасте. Иммунизация Fe(III) на аминокислотах и белках обеспечивает его стойкость к гидролизу в ЖКТ, высокую биодоступность, благодаря медленному высвобождению железа и его более полной абсорбции, а также отсутствие диспептических явлений. Препарат «Гемобин» является перспективным для коррекции дефицита железа у детей, т.к. содержит гемовое железо. Клинические исследования показали отличную переносимость препарата у всех больных, отсутствие нежелательных или побочных явлений, улучшение аппетита, самочувствия и настроения, наблюдалась положительная динамика показателей крови.

При разработке состава (рецептуры) было учтено, что в обеспечении адекватного метаболизма железа в организме принимает участие ряд витаминов, таких как А, Е, С, группы В, фолиевая кислота [11, с. 2].

Таким образом, в состав специализированного пищевого продукта спортивного питания, являющегося источником гемового железа для девочек-подростков (12-17 лет), было введено железо в гемовой форме («гемобин»), витамины А, Е, С, В₆, В₁₂, фолиевая кислоты в дозировках не менее 15% и не более 50% от рекомендуемого уровня суточного потребления для соответствующих возрастно-половых групп, и концентрата сывороточного белка в качестве источника эссенциальных аминокислот, с указанием в рекомендациях по суточному потреблению (Таблица 1) [12, с. 6].

Согласно техническим регламентам Таможенного Союза [6, 13] специализированная пищевая продукция - пищевая продукция, для которой установлены требования к содержанию и (или) соотношению отдельных веществ или всех веществ и компонентов и (или) изменено содержание и (или) соотношение отдельных веществ относительно естественного их содержания в такой пищевой продукции и (или) в состав включены не присутствующие изначально вещества или компоненты (кроме пищевых добавок и ароматизаторов) и (или) изготовитель заявляет об их лечебных и (или) профилактических свойствах, и которая предназначена для целей безопасного употребления этой пищевой продукции отдельными категориями людей; пищевая продукция для детского питания - специализированная пищевая продукция, предназначенная для детского питания для детей, отвечающая соответствующим физиологическим потребностям детского организма и не причиняющая вред здоровью ребенка соответствующего возраста. При разработке состава и рецептур новых видов специализированной пищевой продукции важно учитывать, что формы витаминов и минеральных солей, используемых при производстве пищевой продукции детского питания, должны соответствовать требованиям приложения 9 к [6]. По микробиологическим, физико-химическим, радиологическим показателям безопасности специализированный пищевой продукт спортивного питания для девочек-подростков должен соответствовать требованиям технических регламентов [6, 7, 8].

Выводы. Авторы считают, что новыми являются медико-биологическое обоснование состава, разработка технических условий, включающих технологическую инструкцию, рецептуру и рекомендации по суточной дозировке и порядку введения в базовый рацион питания нового специализированного пищевого продукта для питания спортсменов - девочек-подростков 12-17 лет, являющегося источником гемового железа и витаминов А, Е, В₆, В₁₂, фолиевой кислоты. Специализированный пищевой продукт был раз-

работан, прошел государственную регистрацию и промышленно выпущен для профилактики железодефицитных состояний и анемии у девочек и девушек спортсменок с 12 летнего возраста.

Цитируемая литература

1. Статистический сборник «Здравоохранение в России — 2019», М., Росстат, 2019, 170 с.
2. Briguglio M., Hrelia S., Malaguti M., Lombardi G., Riso P., Porrini M., Perazzo P., Banfi G. The Central Role of Iron in Human Nutrition: From Folk to Contemporary Medicine. *Nutrients*. 2020. Vol. 12 № 6:1761. doi: 10.3390/nu12061761.
3. Никитюк Д.Б., Коростелева М.М., Волкова Л.Ю. Анатомо-физиологические и метаболические особенности организма юных спортсменов. *Вопросы питания*. 2013. Т. 82. № 6. С. 31-40.
4. Sim M., Garvican-Lewis L.A., Cox G.R., Govus A, McKay A.K.A., Stellingwerff T., Peeling P. Iron considerations for the athlete: a narrative review. *Eur J Appl Physiol*. 2019 vol. 119 №7:1463-1478. doi: 10.1007/s00421-019-04157-y.
5. Pedlar CR, Bruignara C, Bruinvels G, Burden R. Iron balance and iron supplementation for the female athlete: A practical approach. *Eur J Sport Sci*. 2018. Vol. 2:295-305. doi: 10.1080/17461391.2017.1416178
6. Технический регламент Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции". ТР ТС 021/2011
7. Технический регламент Таможенного союза "О безопасности молока и молочной продукции" (ТР ТС 033/2013)
8. Технический регламент Таможенного союза "О безопасности мяса и мясной продукции" (ТР ТС 034/2013)
9. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (утверждены Решением Комиссии таможенного союза от 28 мая 2010 года N 299) Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) - docs.cntd.ru
10. McCormick R., Sim M., Dawson B., Peeling P. Refining Treatment Strategies for Iron Deficient Athletes. // *Sports Med*. 2020 Dec. 50(12):2111-2123. doi: 10.1007/s40279-020-01360-2
11. Ning S., Zeller M.P. Management of iron deficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2019. (1):315-322. doi: 10.1182/hematology.2019000034.
12. Коростелева М.М., Агаркова Е.Ю. Принципы обогащения пищевых продуктов функциональными ингредиентами. *Молочная промышленность*. 2020. №11. С. 6-8 doi 10.31515/1019-8946-2020-11-6-8
13. Технический регламент Таможенного союза "О безопасности отдельных видов специализированной пищевой продукции» (ТР ТС 027/2012)

Сведения об авторах

Ирина Витальевна Кобелькова

канд. мед. наук, вед. науч. сотр.

Эл. почта: irinavit66@mail.ru

Маргарита Михайловна Коростелева

канд. мед. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: korostel@bk.ru

Дмитрий Борисович Никитюк

д-р. мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, дир.

Эл. почта: mailbox@ion.ru

Ксения Валерьевна Выборная

Information about authors

Irina Vitalievna Kobelkova

Ph.D.

E-mail: irinavit66@mail.ru

Margarita Mikhailovna Korosteleva

Ph.D.

E-mail: korostel@bk.ru

Dmitry Borisovich Nikityuk

Doctor of Medical Sciences, Prof.

E-mail: mailbox@ion.ru

Ksenia Valerievna Vibornaya

науч. сотр.
 Эл. почта: dombim@mail.ru
Раджабкadi Магомедович Раджабкadiев
 мл. науч. сотр.
 Эл. почта: 89886999800@mail.ru
Мария Сергеевна Кобелькова
 ординатор
 Эл. почта: kobelkovams@gmail.com
Мурадин Мудалифович Семенов
 науч. сотр.
 Эл. почта: turadin-81@mail.ru
 ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи
 Российская Федерация, Москва
Энвер Саидович Токаев
 д-р. техн. наук, проф., дир.
 Эл. почта: info@ac-t.ru
 ООО «АКАДЕМИЯ-Т»
 Российская Федерация, Москва

Researcher
 E-mail: dombim@mail.ru
Rajabkadi Magomedovich Rajabkadiiev
 junior researcher
 E-mail: 89886999800@mail.ru
Maria Sergeevna Kobelkova
 Intern
 E-mail: kobelkovams@gmail.com
Muradin Mudalifovich Semenov
 Researcher
 Эл. почта: E-mail: Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology
 Moscow, Russia
Enver Saidovich Tokayev
 Doctor of technical sciences, prof.
 E-mail: info@ac-t.ru
 LLC "ACADEMIA-T"
 Moscow, Russia

Таблица 1. Рекомендуемая суточная дозировка специализированного пищевого продукта для питания спортсменов, являющегося источником гемового железа для девочек-подростков (12-17 лет)

Наименование ингредиента	Содержание в 1 капсуле, мг	в 4-х капсул., мг	% ФП, девочки 12-14 лет*	% ФП, девочки > 14 лет*	в 6 капсул., мг	% ФП, девочки 12-14 лет*	% ФП, девочки > 14 лет*
Гемобин	400	1600			2000		
В том числе железо	0,941	3,764	25,09%	20,91%	5,646	37,64%	31,37%
Витамин С	3,75	15	25,00%	21,43%	22,5	37,50%	32,14%
Витамин А	0,05	0,2	25,00%	25,00%	0,3	37,50%	37,50%
Витамин Е	0,625	2,5	20,83%	16,67%	3,75	31,25%	25,00%
Витамин В ⁶	0,125	0,5	31,25%	31,25%	0,75	46,88%	46,88%
Витамин В ₉ (фолиевая кислота)	0,0125	0,05	14,29%	12,50%	0,075	21,43%	18,75%
Витамин В ₁₂	0,0001875	0,00075	25,00%	25,00%	0,001125	37,50%	37,50%
Концентрат сывороточного белка	95,44	382	<5%	<5%	573	<5%	<5%

*Физиологическая потребность для девочек 12-14 лет и старше 14 лет (МР 2.3.1.2432—08 «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации», табл. 5.4)

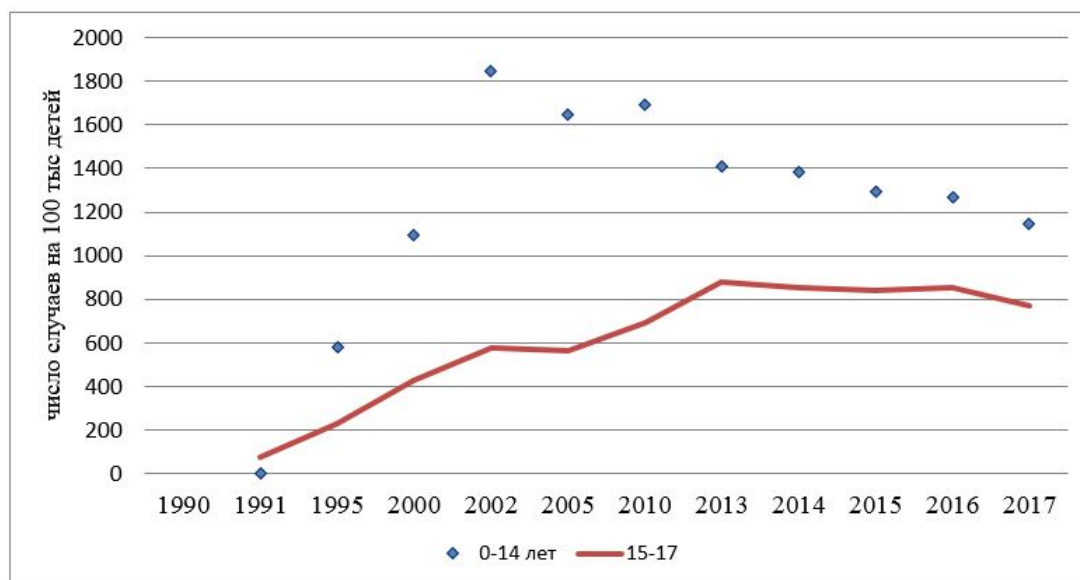


Рис. 1. Динамика заболеваемости анемиями детей и подростков в РФ, число случаев на 100 тыс. детей (зарегистрировано заболеваний у пациентов с диагнозом, установленным впервые в жизни) (Статистический сборник «Здравоохранение в России — 2019»)

УДК 565.727+602.3+678.6
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.35

Саванина Я.В.
МГУ им. М.В. Ломоносова

КОМПЛЕКСНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИРОДНОГО ИНСЕКТНОГО СЫРЬЯ

В статье рассматривается возможность использования саранчи перелетной в качестве ресурса — сезонного, но достаточно обильного и предсказуемого, возможного источника кормового белка, а также хитина и его производных. Сравнение с традиционными ресурсами такого сырья.

Ключевые слова: *Locusta migratoria L., Schistocerca gregaria Forsk, кормовой белок, кормовая мука, криль, хитин, хитозан, хитозан-меланиновый комплекс.*

Savanina Ya.V.
M.V. Lomonosov Moscow State University

INTEGRATED USE OF NATURAL INSECT RAW MATERIALS I'M IN.

The article discusses the possibility of using migratory locust as a resource - a seasonal, but abundant and predictable, possible source of fodder protein, as well as chitin and its derivatives. Comparison with traditional resources of such raw materials.

Keywords: *Locusta migratoria L., Schistocerca gregaria Forsk, forage protein, forage meal, krill, chitin, chitosan, chitosan-melanin complex.*

Введение. В нашей стране исторически наблюдается дефицит животного белка в кормах для животных. Корма составляют до 80% затрат животноводства, ежегодные закупки за рубежом рыбной муки оцениваются в 500 тыс. тонн (Аргентина, Перу, Чили, Китай и др.). В качестве альтернативы (в той или иной степени) могут использоваться: соевый шрот, подсолнечный шрот и жмых, водоросли (хлорелла), спирулина, кровяная мука, кормовые дрожжи, семена табака, отходы переработки какао и хлопка (при том, что в шроте хлопка содержится госсипол, сосудистый яд), сухие листья шелковицы, вермикультура (дождевые черви), а также насекомые [1].

Цель работы. Проанализировать возможность использования саранчи перелетной в качестве возможного источника кормового белка.

Биология саранчи, массового и хозяйственно важного вредителя, изучалась крайне интенсивно, главным образом в плане борьбы с ней 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.

Понятие «саранча» — собирательное, основными видами являются перелетная саранча (*Locusta migratoria* L.) и пустынная саранча (*Schistocerca gregaria* Forsk.). Их особенность – ярко выраженная фазовая изменчивость. Это означает, что особи одиночной и стадной фазы численности заметно отличаются друг от друга по внешнему виду. По сравнению с одиночной формой, особи стадной формы отличаются более темной (яркой) окраской и несколькими другими пропорциями тела, более длинными крыльями и лучшим развитием мускулатуры. У них более интенсивный обмен веществ, очень высокая двигательная активность и, самое главное, стремление образовывать скопления [2].

Нашествия саранчи приносят убытки не только из-за уничтоженных посевов и пастбищ, но и за счет вложений 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 такжекупают препараты, а к обработке посевов привлекается авиация и наземная техника. [3].

В отношении перелетной саранчи складывается парадоксальная ситуация: миллионные затраты на закупку протеина за рубежом и одновременно на уничтожение источника протеина поблизости. Подсчитано, что биомасса саранчи, в среднем (при минимальной плотности стаи) составляет до 4 т/га.

Насекомые - это самый обильный класс сухопутных животных (2/3 от общей биомассы), их отличает высокая плодовитость и способность к массовому размножению. Некоторые виды насекомых возможно культивировать в искусственных условиях. В качестве примера зоокультуры насекомых можно привести личинок мух (Черная львинка, Домовая муха). При выращивании на органических отходах (осадки сточных вод, с/х кухонные отходы), объем отходов уменьшается на 70–80 %, переработанный остаток представляет собой высокоценное удобрение для растений (зоогумус). Кормовой белок, полученный путем переработки насекомых, представляет собой муку (шрот) из взрослых особей или их личинок. Помимо «высокоусваиваемого» кормового белка в сырье присутствуют жиры с уникальными свойствами, антиоксиданты, иммуномодуляторы [4, 5].

Различные виды кузнечиковых и саранчовых разводятся как живой корм для домашних животных в Европе и за ее пределами; по всему миру кузнечиковые изымаются для потребления из дикой природы. К преимуществам зоокультуры относятся контролируемые условия и круглогодичная доступность сырья для комплексной переработки, к недостаткам – энергозатратность. Саранча способна к круглогодичному размножению - при постоянном доступе к свежей зелени и поддержании оптимальной температуры 35-40° и 14 часового светового дня) [2, 4].

Секция 8. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Морским объектом, максимально соответствующим саранче по размерам, питанию, объему и плотности скоплений является криль - ценное сырье для пищевой промышленности, биотехнологии, фармакологии (см. Таблицу).

Сравнительные характеристики криля и саранчи перелетной [2, 6]. Видовой состав

Криль, 35-48 мм	Саранча перелетная, 30-70 мм.
До 7 видов мелких растительных рачков, преобладает <i>Euphausia superba</i> .	<i>L. migratoria</i> L., <i>Sch. gregaria</i> Forsk., реже саранча марокканская, итальянский прус и пр.

Размеры и плотность скоплений (средние)

50-600 м, 2 - 5 тыс. особей/ м ³ воды. До 90 % - в пределах верхних 200 м, главным образом в верхних 50 м водной толщи.	На земле - 10 -250 км ² , крупные — 250 км ² . Стая на поверхности в 10 км ² , включает до полумиллиарда насекомых. В воздухе плотность скоплений зависит от формы стаи: в слоистой (высота полета несколько метров над землей) - 1 - 10 / м ³ , в кучевой (высота полета 1000 м и более) — 0,001—0,1 / м ³ .
--	---

Питание

Растительные, фильтраторы. <i>E. superba</i> фильтрует воду, захватывает все частицы, какие ни попадутся в его «сеть» из щетинок, буквально «вычищая» океан от его флоры и мелкой фауны.	Ежедневно съедает количество растительной пищи равное собственному весу (2-3 г), за всю жизнь - 300-500 г. В рационе преобладают травянистые растения.
--	--

Состав/питательная ценность

Содержание белка 12-16 %.. Представлены незаменимые аминокислоты (лизин, валин, лейцин и изолейцин, треонин, фенилаланин, метионин). Белки криля по пищевой ценности превосходят белки трески. Липиды - 2,5-6,0 %, содержание полиеновых жирных кислот достигает 61 %, включая докозагексаеновую (ДГК) и эйкозапентаеновую (ЭПК). Фосфолипиды, стерин, витамины А, Д и группы В, каротиноиды, антиоксиданты и др.	(для культивируемой саранчи) Содержание белка – 14-60% (по разным оценкам), Из незаменимых аминокислот (см.) – (по некоторым источникам) отсутствует метионин. в шроте личинок мух до 40% белка, в т.ч. до 0, 86 - 1,73% метионина).. В целом по питательной ценности белок саранчи несколько уступает казеину. Липиды - до 12 %, из них ненасыщенных жирных кислот - 54% (основные - пальмитовые, олеиновые и линоленовые).
--	---

Получение

С XIX в. – прилов. Промышленный вылов – с середины XX в (связано с началом антарктического промысла рыбы Японией и СССР). Мировая добыча в начале XXI оценивается в 150-200 тыс. т. Регулируется квотами: в 2014 г. максимальный вылов составлял 620 тыс. т. Промышленный вылов криля осуществляют специальные суда – траулеры. Местоположение скоплений криля устанавливается с помощью акустических приборов. При добыче криля используется траление. Трал выбирается на борт для выливки улова либо (в последнее время) улов перекачивается из тралового мешка непосредственно в процессе траления специальной насосной системой.	В традиционных регионах распространения саранчи - ручной сбор (корзины), отлов сетями в утренние часы. Не менее эффективен выпас домашней птицы – «производительность» курицы - до пятнадцати штук/ мин. Специальная техника для сбора насекомых существует главным образом в виде разработок (от сбора подросших личинок с грунта до использования летательных аппаратов) [7; 8]. квоты на вылов отсутствуют.
--	--

Регионы распространения

Атлантическая часть Антарктики, до 70% вылова - в подрайоне Антарктического полуострова, Южных Оркнейских островов, о. Южная Георгия.	(ближайшие) Области юга России и Казахстана. Дагестан, Чечня, Ставропольский край, Калмыкия, Астраханская область, Башкирия, Южный Урал, Оренбургская область, Алтайский край. 7
---	--

Равномерность поступления сырья для переработки.

Сезон промышленного вылова - с 1-го декабря до 30-го ноября. Наибольшая плотность скоплений наблюдается с марта-апреля по июнь	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: По данным Россельхозцентра повреждено саранчовыми 10-17% из обследованных по стране 4,2 млн га полей. В т.ч. в Башкирии и Оренбургской области в среднем ежегодно повреждалось до 40 тыс. га посевов. Пиковое нашествие – до 100 тыс. га – наблюдалось Оренбургской области в 2014 г.7
--	---

Использование

Свежевыловленный криль-сырец сортируется на 2 фракции : питание и на кормовую муку \ (< 40 мм).	Питание (в традиционных регионах) либо кормление домашней птицы – кур, уток индеек.
---	---

Переработка

Разделение на белковую и хитиновую (панцирную) составляющую. Для минимизации потерь (высокая протеолитическая активность сырья) - при 0 - +5°C единовременный вылов не более 10 т. в течение 2,5 – 3,0 ч, при непрерывной добыче с использованием водяных насосов - без ограничений. Для повышения содержания белка в кормовой муке используют пресс-сепарирование, прессово-сушильный или центрифужно- сушильный способ.	Сырье из насекомых характеризуется меньшим содержанием воды и меньшей протеолитической активностью, что несколько продлевает срок его переработки. Для сушки сырья достаточно стандартного оборудования для сушки зерна (60 ⁰), возможно также применение СВЧ и химических влагопоглотителей. Готовый продукт можно хранить весь кормовой год, перевозить на большие расстояния .8, 9
---	---

Оболочка

Основной источник хитина и хитозана (6-30%) -« только вблизи мест лова, высокая обводненность и высокая минерализация исходного сырья	Доля хитина в кутикуле насекомых – до 50%. Т.к. практически полностью отсутствует минеральная фракция можно редуцировать стадию деминерализации (не применять сильные кислоты и щелочи). Возможно использование автоэнзимолита – т.е. сама перерабатываемая биомасса служит питательной средой для бактерий, очищающих хитин [10]. Перелетная саранча ярко окрашена [2], ее можно рассматривать и как источник хитозан-меланинового комплекса для производства материалов для очистки воды, а также энтеросорбентов.
---	--

Стоимость рыбной муки (и муки из криля) - 50-60 р. /кг, муки из культивируемой саранчи – до 3 000 р./ кг (при кустарном производстве) [8].

Если борьбу с саранчой надо начинать как можно раньше – пока сами личинки мелкие, занимают малые площади и менее устойчивы к ядохимикатам, для получения биомассы рентабельнее более взрослые насекомые, подросшая ползучая саранча либо мигрирующая перелетная – с большей массой мышц (белка), жира и не отложенных яиц.

Высокое содержание жира в перелетной саранче (до 80-85% всех энергетических запасов) связано со снабжением крыловых мышц в полете (до 90% от общего количества). В длительном перелете выгоднее иметь запасы энергетически емкого и в то же время менее тяжелого, чем гликоген «горючего». Жиры при сгорании дают примерно вдвое больше воды, чем углеводы, и для саранчи, совершающей свои перелеты в условиях сухого и жаркого климата, это обстоятельство представляется особенно важным [2].

Остаточный хитин в кормовой муке не является «балластом». Поскольку он не переваривается позвоночными, то проходит желудочно-кишечный тракт, сорбируя всевозможные «отходы» и стимулируя сокращения мышц стенок кишечника. Как и при употреблении «пищевой растительной клетчатки», результате этого значительно улучшается переваривание и всасывание остальных компонентов пищевого комка

Введение кормовой муки из насекомых в рацион крупного рогатого скота (КРС) стойлового содержания с высокой степенью вероятности будет способствовать снижению выделения метана – одного из главных парниковых газов. Метан образуется в пищеварительной системе парнокопытных из «излишков» ацетата, получаемого при сбраживании целлюлозы. В рационе КРС, находящегося на выпасе, хитинсодержащая составляющая в виде грибов и членистоногих (насекомых, пауков и пр.) может достигать 1-2%, что существенно, с учетом объема перевариваемой пищи [1]. При кометаболизме разные составляющие рациона усваиваются более полно, как хозяином, так и его кишечной микробиотой. Для воздействия на метаногенные микроорганизмы можно подобрать и соответствующие антибиотики, но антибиотики – только одно из средств конкурентной борьбы в экосистеме. Увеличение разнообразия субстратов само способствует повышению разнообразия микробиоты, а развитие конкурирующих групп – более полному усвоению пищи без образования «излишков», обеспечивающих существование метаногенов.

Основные проблемы при использовании природного сырья (относительно зоокультуры) – загрязненность (пестициды, инсектициды) и неравномерность поступления сырья для переработки. Большая часть попавших в организм токсикантов выводится насекомыми, в том числе и с покровами при линьке. Появление саранчи и ее дальнейшее поведение, включая миграции достаточно предсказуемо, зависит от «погодных условий», и для наблюдений за ее перемещениями применимы те же приборы и методы, что и для метеорологических наблюдений [3].

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

Биологические особенности фазы перелетной саранчи (*Locusta migratoria* L.) позволяют рассматривать ее как перспективный источник кормового белка и сорбционных материалов, содержащих хитин и его производные. При увеличении и удешевлении производства кормовая мука или шрот из саранчи может использоваться при производстве кормов как для продуктивных животных – аквакультуры, домашней птицы, свиней, так и для «домашних любимцев» – аквариумных рыб, рептилий, птиц, хищных и насекомоядных млекопитающих. Кроме того практически не исследована такая область применения, как производство питательных сред для выращивания микроорганизмов, включая те, что применяются в биотехнологии и очистке окружающей среды [11]. Хитинсодержащие материалы могут использоваться для очистки сточных вод от катионов тяжелых металлов, радионуклидов, белков, углеводов, пестицидов, бактериальных клеток и взвешенных веществ, включая частицы микропластика. Отработанный материал может разлагаться биологическими агентами.

Литература

1. Александров С.Н. Технология производства кормов. Главная. Сельское хозяйство, агропром. ... М.: ООО «Издательство АСТ»; Донецк: «Сталкер», 2003. – 235 с.
2. 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 Акридологии / Университет Вайоминга, 387 с. (на русском).
3. agroinvestor.ru...article...sarancha-vstaet-na-krylo/ 19.02.2019.
4. proteintek.org/baza-znaniij/1005/19.02.2019 Доклад ФАО "Съедобные насекомые - перспективы для питания человека и кормления животных". "Edible insects - future prospects for food and feed security". ISBN 978-92-5-107595-1 (print); E-ISBN 978-92-5-107596-8 (PDF)

5. Антонов А. М., Лутовиновас Е., Иванов Г. А., Пастухова Н. О. Адаптация и перспективы разведения мухи Черная львинка (*Hermetia illucens*) в циркумполярном регионе // Принципы экологии. 2017. № 3. С. 4–19. DOI: 10.15393/j1.art.2017.6302

6. Быкова В.М., Быков В.П., Кривошеина Л.И., Радакова Т.Н., Гройсман М.Я., Глазунов О.И. Основные направления комплексного использования криля.//Труды ВНИИРО. 2004.Т 143, С 17-32. Справочник / Под ред. В.М. Быковой. - М.: Изд-во ВНИРО, 2001. - 207 с.

7..rosselhoccenter.com>Аналитика и статьи>13.11.2019

8. Зальцман В.А., Красильников О.Ю. Кормовая мука из саранчи: восполнение дефицита животного белка в кормах для животных // "Нивы Зауралья", №11 (122), декабрь 2014.

9. FindPatent.ru>patent/246/2468579.html

FindPatent.ru>patent/252/2520277.html

10. Курченко В.П., Буга С.В., Петрашкевич Н.В., Буткевич Т.В., Ветошкин А.А., Демченков Е.Л., Лодыгин А.Д., Зуева О.Ю., Варламов В.П., Бородин О.И. Технологические основы получения хитина и хитозана из насекомых Труды БГУ. 2016. Т 11, часть 1. Обзоры. С. 110-126.

11. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии//Поляк М.С. В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. СПб.:элби – СПб.- 2008. С.19-23.

Сведения об авторе

Янина Вячеславовна Саванина
канд. биол. наук, науч. сотр., биофак
Эл. почта: v.savanin@gmail.com
МГУ имени М.В.Ломоносова
Российская Федерация, Москва

Information about author

Yanina Viatcheslavovna Savanina
PhD
E-mail: v.savanin@gmail.com
M.V. Lomonosov Moscow State University
Moscow, Russia

УДК 613.292

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.36

Петров Н.А., Сидорова Ю.С., Кочеткова А.А., Мазо В.К.

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии
и безопасности пищи

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА IN VIVO КОМПЛЕКСОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С БИОПОЛИМЕРНЫМИ МАТРИЦАМИ

В работе представлены результаты доклинической оценки эффективности пищевых ингредиентов: концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на гречневой муке, и концентрата фитостероидов 20-гидроксиэксдизона и флавоноидов зерна киноа, сорбированных на белке куриного яйца.

Ключевые слова: метаболический синдром, полифенолы, гипогликемическое действие, гиполипидемическое действие, стресс, фитостероиды, флавоноиды, иммобилизация, простагландин E2, катехоламины.

DEVELOPMENT AND IN VIVO EVALUATION OF COMPLEXES OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS WITH BIOPOLYMER MATRICES

The paper presents the results of a preclinical assessment of the effectiveness of food ingredients: a concentrate of blueberry leaf polyphenols sorbed on buckwheat flour, and a concentrate of phytoecdysteroid 20-hydroxyecdysone and quinoa grain flavonoids sorbed on chicken egg white.

Keywords: *metabolic syndrome, polyphenols, hypoglycemic effect, hypolipidemic effect, stress, phytoecdysteroids, flavonoids, immobilization, prostaglandin E2, catecholamines.*

Введение. Согласно современным представлениям нутрициологии оптимальное питание направлено на обеспечение человека необходимым количеством энергии и набором пищевых веществ растительного и животного происхождения, включающим минорные биологически активные веществ (БАВ) пищи. Эффективность использования фитонутриентов в качестве минорных БАВ пищи в составе специализированных продуктов профилактического назначения относительно часто невысока, вследствие их низкой биодоступности и недостаточного содержания в продукте. Одним из технологических подходов к концентрированию фитонутриентов в составе продукта является их сорбция на полимерных пищевых матрицах.

Цель проведенного исследования состояла в получении, физико-химической и физиолого-биохимической оценке *in vivo* концентратов фитонутриентов: полифенолов листьев черники, сорбированных на гречневой муке; флавоноидов и фитоэксдистероида 20-гидроксиэксдизона (20E) из зерна киноа, сорбированных на коагулированном яичном белке.

Материалы и методы исследования.

Концентрат полифенолов листьев черники, сорбированных на гречневой муке (далее Пищевой ингредиент 1).

Пищевой ингредиент 1 получали путем сорбции полифенолов из водного 2% раствора сухого экстракта листьев черники на измельченной гречневой муке (размер частиц: 135 ± 4 мкм) в соотношении 50 мл раствора экстракта/1г муки в течение 45 мин при температуре 25°C с последующим центрифугированием и лиофилизацией осадка. Суммарное содержание полифенольных соединений в Пищевом ингредиенте 1, определенное методом ВЭЖХ-МС, составило $15,2 \pm 0,1$ мг/г [1].

Концентрат 20-гидроксиэксдизона и флавоноидов из зерна киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (далее Пищевой ингредиент 2).

Проводили экстракцию БАВ из зерна киноа в 40% этаноле в соотношении 1г муки/20мл этанола с последующей ультрафильтрацией (100 кДа) и концентрированием обратным осмосом. Пищевой ингредиент 2 получали путем сорбции БАВ из экстракта зерна киноа на сухом коагулированном яичном белке [1, с.47] при температуре 25°C в течение 1 часа в соотношении 1г белка/45мл экстракта с последующим лиофильным высушиванием. Содержание 20E и флавоноидов в образцах определяли методом ВЭЖХ [2, с.341; 3, с.133]. Содержание 20E в полученном ингредиенте составило $3,4 \pm 0,3$ мг/г, содержание флавоноидов – $14,1 \pm 0,1$ мг/г.

Биохимическая оценка *in vivo* влияния потребления Пищевых ингредиентов 1 на нарушения липидного и углеводного обмена у мышей линии C57Bl/6с, индуцированные потреблением ВЖВУ-рациона.

Эксперимент проводили в течение 130 суток с использованием молодых половозрелых мышей-самцов линии C57Bl/6с с исходной массой тела 20 ± 2 г Мыши были разделены на 4 группы: контрольную группу К1, вторую контрольную группу К1а и две опытные

группы Г3 и Г4. Животные контрольной группы К1 на протяжении всего эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион [4, с.839S]. Животные групп К1а, Г3 и Г4 получали модифицированный высокожировой высокоуглеводный рацион (ВЖВУ-рацион, 30% жира, 20% сахарозы). В рацион животных групп Г3 и Г4 вносили Пищевой ингредиент 1 в количестве 2,5г/100г и 5г/100г, соответственно. На 60 сутки эксперимента, когда появились первые признаки развившихся нарушений углеводного обмена (достоверное увеличение уровня глюкозы и показателя площади под кривой (ППК) в тесте на глюкозотолерантность по сравнению с контрольной группой К1), группа К1а была разделена на две новые группы: ВЖВУ-контрольную группу К2 (продолжили получать ВЖВУ рацион) и новую опытную группу Г5. В ВЖВУ рацион животных группы Г5 дополнительно вносили Пищевой ингредиент 1 в количестве 2,5г/100г. Кормление животных экспериментальными рационами продолжалось еще в течение 70 суток. На протяжении эксперимента измеряли массу тела животных, глюкозу крови, проводили тесты на инсулинорезистентность (15, 45 и 91 сутки) и глюкозотолерантность (1, 39 и 82 сутки). На 130 сутки животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом. Отбирали цельную кровь для определения содержания гликированного гемоглобина спектрофотометрическим методом с помощью коммерческого набора реактивов по методике производителя (Гликогемотест, Россия). Получали сыворотку крови для определения лептина и грелина иммуноферментным методом. Проводили патолого-анатомическое вскрытие и извлекали печень. В гомогенатах печени определяли содержание триглицеридов и холестерина на автоматическом анализаторе Konelab 20i (Thermo Fisher, США).

Физиолого-биохимическая оценка влияния Пищевого ингредиента 2 на крыс-самцов линии Вистар, подверженных иммобилизационному стрессу.

Эксперимент проведен с использованием 36 крыс-самцов линии Wistar с исходной массой тела 130 ± 5 г. Животных разделили на 3 группы (n=12): КОНТРОЛЬ, ИММО, ИММО+ПИ2. Животные всех групп в течение 36 суток эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион [4, с. 839S]. В рацион крыс опытной группы ИММО+ПИ2 вносили Пищевой ингредиент 2 в количестве 0,6%. На 22 сутки эксперимента проводили тестирование животных в тесте Открытое поле (ОП). На 0 и 28 сутки проводили тестирование животных в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Эти тесты позволяют оценить степень тревожности животных и их общую исследовательскую активность, а комплексное использование этих тестов повышает точность получаемых результатов [5, с. 173168].

Животные групп ИММО и ИММО+ПИ2 на протяжении 35 суток подвергались 40-минутной иммобилизации, путем помещения в прозрачные домики-фиксаторы, ограничивающие свободу движения крыс. На 36 сутки эксперимента животные групп ИММО и ИММО+ПИ2 подвергались истощающей иммобилизации в течение 3 часов. Сразу после истощающей иммобилизации животных помещали в обменные клетки для сбора суточной мочи. Через 24 ч (37 сут.) крыс выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Содержание катехоламинов (норадреналина, адреналина и дофамина) в моче определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США). Содержание простагландина E2 в моче определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора реактивов (R&D systems, США).

Физиолого-биохимическая оценка влияния Пищевого ингредиента 2 на крыс-самцов линии Вистар, подверженных разовой истощающей физической нагрузке

Эксперимент *in vivo* проведен с использованием 36 крыс-самцов линии Wistar с исходной массой тела 130 ± 5 г. Длительность эксперимента составила 37 суток. Животных разделили на 3 группы (n=12): КОНТРОЛЬ, БЕГ и БЕГ+ПИ2. Животные всех групп в течение 36 суток эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион [4,

с.839S]. В рацион крыс опытной группы БЕГ+ПИ2 вносили Пищевой ингредиент 2 в количестве 0,8%. На 36 сутки эксперимента животные групп БЕГ и БЕГ+ПИ2 подвергались истощающей физической нагрузке на беговой дорожке. Средняя продолжительность бега составила 45 ± 2 мин, скорость ленты плавно повышали с 19 см/с до 43 см/с, наклон полотна 10° . Сразу после бега животных помещали в обменные клетки для сбора суточной мочи. Через 24 ч (37сут.) крыс выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Содержание катехоламинов (норадреналина, адреналина и дофамина) в моче определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США). Содержание простагландина E2 в моче определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора реактивов (R&D systems, США).

Результаты и их обсуждение.

Биохимическая оценка *in vivo* влияния Пищевого ингредиента 1 на нарушения липидного и углеводного обмена у мышей линии C57Bl/6с, индуцируемые потреблением ВЖВУ-рациона.

В течение всего эксперимента животные всех групп, получавших ВЖВУ-рацион, потребляли достоверно меньше корма по сравнению с животными контрольной группы, получавшей стандартный рацион, при этом поступление энергии для животных достоверно не различалось ($13,2 \pm 0,2$ ккал/сутки/мышь).

Первые 60 суток эксперимента животные групп Г3 ($2,25 \pm 0,04$ г/сутки/мышь) и Г4 ($2,23 \pm 0,04$ г/сутки/мышь) потребляли достоверно меньше корма по сравнению с животными группы К2 ($3,32 \pm 0,05$ г/сутки/мышь), получавшей только ВЖВУ-рацион. Начиная с 60-х суток и до конца эксперимента достоверно от животных группы К2 ($2,23 \pm 0,05$ г/сутки/мышь) меньше корма потребляли только животные группы Г3 ($2,11 \pm 0,03$ г/сутки/мышь).

В течение первых 70 суток эксперимента не было выявлено достоверных различий в приросте массы тела животных всех групп. Начиная с 70-х суток эксперимента прирост массы тела животных группы К2, получавших ВЖВУ-рацион, был достоверно выше по сравнению с приростом массы тела животных группы К1 и оставался таким вплоть до окончания эксперимента. Полученный результат свидетельствует о развитии признаков ожирения у животных, длительно получавших ВЖВУ-рацион.

Прирост массы тела животных групп Г3 и Г4, получавших Пищевой ингредиент 1, достоверно не отличался от прироста массы тела животных группы К1 до окончания эксперимента. Начиная с 102 суток эксперимента, прирост массы тела животных группы Г5, получавших Пищевой ингредиент 1 начиная с 60 суток по терапевтической схеме и вплоть до окончания эксперимента статистически значимо не отличался от показателя контрольной группы К1.

До 60-х суток эксперимента уровень глюкозы животных всех групп достоверно не различался. К 60-м суткам и до 74-х уровень глюкозы животных всех групп, получавших ВЖВУ-рацион, был достоверно выше по сравнению с контрольной группой. Уровень глюкозы животных контрольной группы К2 оставался достоверно выше вплоть до окончания эксперимента.

Начиная с 95-х суток эксперимента уровень глюкозы животных групп Г3, Г4, Г5, получавших Пищевой ингредиент 1 в разных дозировках, статистически не отличался от уровня глюкозы животных групп К1. При этом важно отметить, что уровень глюкозы животных групп Г3 и Г4, получавших Пищевой ингредиент по профилактической схеме, был также достоверно ниже по сравнению с уровнем у контрольных животных К2. Введение в рацион животных группы Г5 Пищевого ингредиента 1 на 60 сутки в условиях уже развившихся нарушений углеводного обмена было менее эффективно.

Снижение уровня глюкозы крови у экспериментальных животных может быть связано с тем, что полифенолы способны ингибировать активность α -амилазы слюны и

α -глюкозидазы щеточной каймы тонкого кишечника, а также активность SGLT1 транспортера глюкозы, снижая таким образом поступление простых углеводов в организм [6, с. 17]. Помимо этого, полифенолы увеличивают чувствительность клеток к инсулину и повышают активность GLUT4 транспорта глюкозы посредством стимуляции сигнального пути фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и активации ферментов PI3K и 5'-аденозин монофосфат-активируемой протеинкиназы (АМРК) [7, с.16].

На 39 сутки эксперимента в тесте на глюкозотолерантность у животных всех групп, получавших ВЖВУ-рацион, был отмечен рост показателя площади под кривой (ППК), причем у животных группы К2 увеличение было достоверным по сравнению с группой К1, что говорит о развитии у этих животных толерантности к глюкозе. На 82 сутки эксперимента показатель ППК только для животных группы Г3, получавших Пищевой ингредиент 1 (2,5 г/кг рациона) не отличался достоверно от показателя животных контрольной группы К1.

Согласно результатам инсулинорезистентного теста потребление животными группы Г4 Пищевого ингредиента 1 (5г/100г рациона) замедлило развитие инсулинорезистентности (в течение первых 45 суток эксперимента значение ППК было достоверно ниже по сравнению с контрольными ВЖВУ-животными), однако на 91 сутки эксперимента показатель ППК для всех животных, получавших ВЖВУ-рацион был достоверно выше по сравнению с показателем животных группы К1.

Не выявлено достоверных отличий между всеми группами в содержании в крови гликированного гемоглобина.

Потребление полифенолов в составе Пищевого ингредиента 1 приводило к нормализации липидного обмена путем регуляции уровней гормонов лептина и грелина. Достоверное увеличение уровня грелина в плазме крови животных группы Г4 ($80,5 \pm 15,9$ нг/мл) по сравнению с животными групп К1 ($1,8 \pm 0,2$ нг/мл) и К2 ($2,2 \pm 0,3$ нг/мл) указывало на предотвращение избыточного набора массы тела при употреблении Пищевого ингредиента 1 [8, с.2237]. У мышей групп Г3 ($0,6 \pm 0,2$ нг/мл) и Г4 ($0,6 \pm 0,2$ нг/мл) по сравнению с мышами группы К2 ($1,6 \pm 0,3$ нг/мл) также были достоверно снижены уровни лептина, что свидетельствовало об уменьшении объемов жировой ткани у животных, получавших Пищевой ингредиент 1 [9, с.1297].

Показатели липидного профиля – триглицериды, холестерин - в печени животных достоверно между группами не отличались.

Таким образом, полифенолы листьев черники в составе Пищевого ингредиента 1 оказывали выраженное гипогликемическое действие, что выражалось в снижении уровня глюкозы крови, предотвращении развития состояний толерантности к глюкозе и инсулинорезистентности у молодых половозрелых мышей линии С57В1/6с, а также оказывали нормализующее влияние на липидный обмен животных путем регуляции уровней гормонов лептина и грелина.

Физиолого-биохимическая оценка *in vivo* влияния Пищевого ингредиента 2 на состояние крыс-самцов линии Вистар, подверженных иммобилизационному стрессу.

Среднее кумулятивное потребление корма стрессированными животными групп ИММО ($17,2 \pm 0,3$ г/сут/крыса) и ИММО+ПИ2 ($16,9 \pm 0,2$ г/сут/крыса) было достоверно ($p < 0,05$) ниже по сравнению с потреблением корма группы КОНТРОЛЬ ($19,4 \pm 0,3$ г/сутки/крыса). Расчетное потребление 20Е в составе Пищевого ингредиента 2 животными опытной группы ИММО+ПИ2 составило – $1,53 \pm 0,02$ мг/кг массы тела/сутки; расчетное потребление флавоноидов – $6,20 \pm 0,10$ мг/кг массы тела/сутки. Масса тела животных групп ИММО и ИММО+ПИ2, подверженных хроническому иммобилизационному стрессу, начиная с 8 суток эксперимента была достоверно ($p < 0,01$) ниже массы тела животных группы КОНТРОЛЬ. Иммобилизация является сильным стрессорным воздействием для крыс-самцов линии Вистар и приводит к достоверному отставанию в росте массы тела [10, с.292].

При проведении теста ПКЛ было выявлено, что животные, подверженные иммобилизационному стрессу (группы ИММО и ИММО+ПИ2), были достоверно менее тревожны по сравнению с животными группы КОНТРОЛЬ ($p < 0,01$). Аналогичный результат получен и для показателей исследовательской активности: животные подверженные иммобилизационному стрессу были достоверно ($p < 0,01$) более активны по показателям перемещения по лабиринту.

В тесте ОП не было выявлено достоверных отличий поведения животных группы ИММО+ПИ2, получавших Пищевой ингредиент 2, по сравнению с животными группы КОНТРОЛЬ. Животные группы ИММО достоверно больше перемещались по лабиринту по сравнению с животными группы КОНТРОЛЬ ($p < 0,05$), что согласуется с данными полученными в тесте ПКЛ. Полученный результат свидетельствует о влиянии иммобилизационного стресса на показатели тревожности и исследовательской активности животных, но также и об отсутствии влияния разработанного Пищевого ингредиента 2.

Суточная экскреция норадреналина и адреналина с мочой у животных группы ИММО+ПИ2, была достоверно ниже по сравнению с животными группы ИММО ($p < 0,01$). Таким образом, достоверное снижение экскреции с мочой основных стресс-маркеров – адреналина и норадреналина говорит о выраженном адаптогенном эффекте Пищевого ингредиента 2.

Физиолого-биохимическая оценка *in vivo* влияния Пищевого ингредиента 2 на состояние крыс-самцов линии Вистар, подверженных истощающей физической нагрузке.

Среднее кумулятивное потребление корма животными всех групп достоверно не различалось. Расчетное потребление 20Е в составе Пищевого ингредиента 2 животными опытной группы БЕГ+ПИ2 составило – $1,81 \pm 0,02$ мг/кг массы тела/сутки; расчетное потребление флавоноидов – $8,6 \pm 0,1$ мг/кг массы тела/сутки. Прирост массы тела животных всех групп достоверно не отличался до 32 суток эксперимента. В тестах ОП и ПКЛ не было выявлено эффекта Пищевого ингредиента 2.

Суточная экскреция простагландина E2 с мочой животных опытной группы БЕГ достоверно более чем в 1,5 раза снизилась по сравнению с показателем животных группы КОНТРОЛЬ ($6,7 \pm 1,8$ нг/сутки и $10,7 \pm 1,4$ нг/сутки, соответственно). Ведение в рацион животных Пищевого ингредиента 2 приводило к торможению падения его экскреции с мочой до уровня Контроля ($8,1 \pm 1,6$ нг/сутки).

Что касается суточной экскреции катехоламинов с мочой: было показано достоверное увеличение экскреции дофамина, адреналина и норадреналина (в 1,5, 1,6 и 1,5 раза) по сравнению с экскрецией животными группы КОНТРОЛЬ. При этом экскреция катехоламинов у животных контрольной группы БЕГ имела тенденцию на увеличение, однако разница не была достоверна по сравнению с животными группы КОНТРОЛЬ. Можно предположить, что фитостероиды и флавоноиды выступают в качестве прострессоров, активизируя стресс-систему организма, что подтверждается достоверным увеличением уровня катехоламинов по сравнению с контрольной группой животных.

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

- получен и физико-химически охарактеризован пищевой ингредиент – комплекс полифенолов листьев черники, сорбированных на гречневой муке. В эксперименте *in vivo* доказано гипогликемическое действие ингредиента, выражающееся в достоверном снижении уровня глюкозы животных, а также показано опосредованное гипополипидемическое действие посредством влияния на уровни гормонов лептина и грелина.

- получен и физико-химически охарактеризован пищевой ингредиент – комплекс фитостероидов и флавоноидов зерна киноа, сорбированного на коагулированном белке куриного яйца. В экспериментах *in vivo* показаны адаптогенные эффекты ингредиента при стрессорном воздействии различного вида.

Литература

1. Сидорова Ю.С., Мазо В.К., Зорин С.Н., Стефанова И.Л. Оценка биологической ценности и антигенности коагулированного белка куриного яйца // Вопр. питания. 2018. Т. 87. № 1. С. 44-50. doi: 10.24411/0042-8833-2018-10005
2. Yoo S.R., Jeong S.J., Lee N.R., Shin H.K., Seo C.S. Quantification Analysis and In Vitro Anti-Inflammatory Effects of 20-Hydroxyecdysone, Momordin Ic, and Oleanolic Acid from the Fructus of *Kochia scoraria* // Pharmacogn Mag. 2017. Vol. 13. № 51. P. 339-344.
3. Park J.S., Kim I.S., Shaheed Ur Rehman, Na C.S., Yoo H.H. HPLC Determination of Bioactive Flavonoids in *Hovenia dulcis* Fruit Extracts // J Chromatogr Sci. 2016. Vol. 54. № 2. P. 130-135
4. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J Nutr. 1997;127(5 Suppl):838S-841S. doi: 10.1093/jn/127.5.838S. PMID: 9164249
5. Knight P, Chellian R, Wilson R, Behnood-Rod A, Panunzio S, Buijnzeel AW. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. Pharmacol Biochem Behav. 2021 Mar 5;204:173168. doi: 10.1016/j.pbb.2021.173168
6. Kim Y, Keogh JB, Clifton PM. Polyphenols and Glycemic Control. Nutrients. 2016;8(1):17. doi:10.3390/nu8010017
7. Zhang ZF, Li Q, Liang J, et al. Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition. Phytomedicine. 2010;17(1):14-18. doi: 10.1016/j.phymed.2009.09.007
8. Kubow S, Hobson L, Iskandar MM, Sabally K, Donnelly DJ, Agellon LB. Extract of Irish potatoes (*Solanum tuberosum* L.) decreases body weight gain and adiposity and improves glucose control in the mouse model of diet-induced obesity. Mol Nutr Food Res. 2014;58(11):2235–2238. doi:10.1002/mnfr.201400013
9. Rubio-Ruiz ME, Guarner-Lans V, Cano-Martínez A, et al. Resveratrol and Quercetin Administration Improves Antioxidant DEFENSES and reduces Fatty Liver in Metabolic Syndrome Rats. Molecules. 2019; 24(7): 1297. doi:10.3390/molecules24071297
10. Ю.С.Сидорова, Н.А.Петров, С.Н.Зорин, В.К.Мазо Влияние истощающей физической нагрузки или принудительной иммобилизации на физиологическое состояние и основные биохимические маркеры метаболизма и стресса крыс-самцов Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2021г. Т.171, №3, с.290-295

Сведения об авторе

Никита Александрович Петров

аспирант

Эл. почта: petrov-nikita-y@mail.ru

Сидорова Юлия Сергеевна

канд. биол. наук

ст. науч. сотр. лаб. пищевых биотехнологий и специализированных продуктов

Эл. почта: sidorovaulia28@mail.ru

Алла Алексеевна Кочеткова

д-р. техн. наук, проф., зав. лаб. пищевых биотехнологий и специализированных продуктов

Эл. почта: kochetkova@ion.ru

Владимир Кимович Мазо

д-р биол. наук., проф.

вед. науч. сотр. лаб. пищевых биотехнологий и специализированных продуктов

Эл. почта: mazo@ion.ru

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»

Россия, Москва

Information about authors

Nikita Aleksandrovich Petrov

postgraduate

E-mail: petrov-nikita-y@mail.ru

Yuliya Sergeevna Sidorova

PhD

art. science. et al. lab. food biotechnology and specialty products

E-mail: sidorovaulia28@mail.ru

Alla Alekseevna Kochetkova

Dr.Sci.Tech., professor, head of the lab. food biotechnologies and specialized products

Эл. почта: kochetkova@ion.ru

Vladimir Kimovich Mazo

Professor

leading researcher at the laboratory of food biotechnology and specialized products

E-mail: mazo@ion.ru

Federal Research Centre of Food and Biotechnology

Russia, Moscow

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНФОРМАЦИОННО-КОММУНИКАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ И ОБРАЗОВАТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ

В статье уделяется внимание современным информационным технологиям, которые позволяют проводить дистанционное обучение, среди студентов в высших учебных заведениях. Рассказывается о роли образовательных технологий, информационных и коммуникационных, в системе образования и практике врача. Описывается опыт внедрения телекоммуникационных технологий для проведения встреч с участниками образовательного и лечебного процесса.

Ключевые слова: информационные технологии, высшее образование, коммуникационные технологии.

Zobenko V.Ya., Zobenko A.V., Vasiliev Yu.A.
Kuban State Medical University

EXPERIENCE IN USING INFORMATION AND COMMUNICATION TECHNOLOGIES IN CLINICAL PRACTICE AND EDUCATIONAL PROCESS

The article pays attention to modern information technologies that allow distance learning among students in higher educational institutions. Describes the role of modern technologies, information and communication, in the education system and the practice of a doctor. The experience of introducing telecommunication technologies for holding meetings with participants in the educational and medical process is described.

Keywords: information technology, higher education, communication technology.

Введение

Использование информационных технологий в различных сферах все больше актуализируется.

В настоящее время наблюдается переход от индустриального общества к информационному. Этот тип общества раскрывает широкие возможности для развития человека, более эффективные решения многих профессиональных, экономических и социальных вопросов.

Полная реформа высшего образования различные политические и социальные преобразования, непрерывный рост объема информации и ухудшение в 2020 году эпидемиологической обстановке в Российской Федерации привели к трансформации образовательного процесса.

Компьютерная коммуникация как интегрирующий инструмент, обеспечивающий реализацию учебного процесса, создающий условия, позволяющие использовать новые информационные технологии в процессе обучения, научиться пользоваться новейшими техническими инструментами и программными продуктами, приобрести навыки современных способов обработки информации.

Информационные технологии в сочетании с правильно подобранными (или разработанными) технологиями обучения создают необходимый уровень качества, вариативности, дифференциации и индивидуализации обучения и воспитания [2].

Именно в здравоохранении, которое имеет дело с бесценным ресурсом — здоровьем человека, необходимо наиболее качественное, на современном уровне мировых знаний обучение и постоянное повышение квалификации медицинских работников всех уровней и направлений деятельности, независимо от их мест работы и пребывания [4].

Целью данной работы является описать положительные и отрицательные аспекты использования телекоммуникационных технологий в образовательном процессе и клинической практике по опыту, полученному на базе кафедры общественного здоровья,

здравоохранения и истории медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» (КубГМУ) и в узкоспециализированном отделении челюстно-лицевой хирургии (ЧЛХ) Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Детская краевая клиническая больница» министерства здравоохранения Краснодарского края (ДККБ), предложить пути преодоления возникших трудностей.

Опыт использования информационных технологий в образовательном процессе

Для коммуникации между преподавателями и студентами в КубГМУ на кафедре общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины используется комплекс технических и программных средств. Среди технических средств применяют компьютеры, оснащенные выходом в сеть Интернет, мультимедийные проекторы и интерактивные доски. Среди программного обеспечения активно используются LMS платформа Moodle-для доступа к методическим разработкам и средствам контроля полученных знаний, программа Cisco Webex – для онлайн общения и встреч, а также мессенджеры, в которых создаются групповые чаты для оперативного и своевременного оповещения сотрудников и обучающихся.

Немаловажно отметить положительные моменты от внедрения дистанционных элементов в обучение. К ним относятся наглядность представления информации, обеспечение равных возможностей получения образования любого уровня на месте своего проживания или профессиональной деятельности, увеличение времени для занятий практической деятельностью, повышение конкурентоспособности обучающихся технологий в сторону активных форм усвоения знаний, возможность самостоятельно определять скорость изучения материала, планировать свой график, повторно изучать материалы учебно-методических пособий и лекций.

Сложности в использовании коммуникации заключались в проблематичном учете посещаемости студентов. Путем решения сложившейся проблемы может стать унификация данных, которые студент должен отразить в своей учетной записи. Это даст возможность проводить сортировку и учет количества человек по нужным параметрам, например, по номеру группы или фамилии – в зависимости от того, какую задачу необходимо выполнить.

Также, материально-техническая составляющая тоже представляла определенные проблемы. Вследствие нахождения обучающегося на территории без устойчивого доступа в Интернет возникали задержки в передачи данных, приводящие к сложности в общении. Низкая степень владения компьютером обучающихся и профессорско-преподавательского состава также создавала определенные трудности в освоении учебного материала в дистанционной форме.

У части студентов возникают сложности в использовании различных программ для дистанционных встреч. Для того, чтобы их функциональные возможности были известны и понятны, следует разработать памятку, инструкцию. Она может представлять собой описание основных команд и возможностей с подробными иллюстрациями. И предназначена она как для обучающихся, так и для профессорско-преподавательского состава. Наличие подобного описания будет существенным дополнением, упрощающим понимание, как для русскоязычных студентов, так и для англоговорящих [1].

Фактором, затрудняющим коммуникацию и дистанционную работу со студентами, стала сортировка присланных работ, идентификация обучающегося. В целях облегчения учета и проверки заданий может быть применена система фильтрации писем по ключевому слову в теме. Процесс сортировки писем реализуется в двух наиболее популярных почтовых серверах от компаний «Mail.ru Group» и «Яндекс».

Опыт использования информационных технологий в клинической практике

Правильно выстроенная и сформированная линия клинического мышления позво-

ляет в кратчайший период определить ведущий патологический синдром, сформулировать диагноз, провести дифференциальную диагностику и определить направление необходимых лечебных мероприятий [3].

В связи с этим для совмещения непрерывной помощи пациентам может применяться такая форма взаимодействия как дистанционные консультации.

Нами проанализирована сформированная группа детей и их родителей (опекунов), находящихся на хирургическом этапе реабилитации с диагнозом по МКБ 10 (Q35, Q36, Q37), за период 2018 - 2019 года. В приёмном покое (отделении), при оформлении медицинской документации (форма 003/у), регистратор разъясняет о возможных коммуникациях пациента и врача, специалиста необходимого для решения возникшего вопроса и администрации ДККБ. Обязательный элемент — это получение добровольного согласия на проведение диагностических и лечебных действий. В отделении за каждым пациентом закрепляется лечащий врач. Во время знакомства (пациент-лечащий врач), и сборе *anamnesis vitae, morbi* лечащий врач объясняет коммуникационные возможности. Врач доводит до пациента информацию о том, что благодаря современным информационным технологиям возможно связаться удаленно со специалистом из другого города.

При таком взаимодействии можно получить необходимую и недостающую информацию, однако нерегламентированное время и порядок онлайн встречи может привести к сложностям, задержкам в передаче результатов. Решением в такой ситуации может служить разработка четких алгоритмов встречи с указанием набора необходимых диагностических процедур, которые следует выполнить перед дистанционной консультацией. В таком регламенте также может содержаться информация о времени онлайн встречи, ее продолжительности, списке врачей-специалистов (с указанием их контактных данных для связи при возникающей необходимости перечня рассматриваемых вопросов), перечень обсуждаемых тем и др.

Ещё немаловажный аспект коммуникаций: врач – врач. Важно взаимодействие между врачом в отделении ЧЛХ и врачом-педиатром по месту жительства ребёнка; совместный разбор страхового случая, собрав необходимый консилиум; консультации врача с ведущими клиниками и опытными специалистами.

Заключение

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

1. Применение коммуникационных технологий несет мощный потенциал для постоянного самосовершенствования;
2. Данная образовательная технология перспективна при условии достаточной технической оснащённости;
3. Предоставление возможности расширенного общения со врачами-специалистами формирует создание групповых чатов для оперативного и своевременного оповещения специалистов по направлениям;
4. Передача опыта в профессиональных сообществах при координации этого ресурса из центра.

Литература

1. *Зобенко В. Я.* Использование онлайн ресурсов для перевода иностранного текста на занятиях по медицинской информатике / В. Я. Зобенко, А. В. Зобенко // Инновации в образовании : Материалы X юбилейной региональной межвузовской учебно-методической конференции с международным участием, посвященной 100-летию ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, Краснодар, 25 марта 2020 года. – Краснодар: Кубанский государственный медицинский университет, 2020. – С. 183-185.

2. *Kozulina N.S.* To the issue of information pedagogical technologies use in the higher education system // Материалы конференции «Цифровые технологии в юриспруденции:

генезис и перспективы». Красноярский государственный аграрный университет. – 2020. – С. 242-248.

3. Лопанова Е.В. ред. Компетентностно-ориентированное обучение в медицинском вузе / Е.В. Лопанова, ред. // Учебно-методическое пособие. – М.: ФЛИНТА, Наука, 2013. 256 с.

4. Марухно, В. М. Дистанционное образование в медицине / В. М. Марухно. Текст : непосредственный // Международный журнал экспериментального образования. 2012. No. 4. С. 154-156.

Сведения об авторах

Владимир Яковлевич Зобенко

доцент

Эл. почта: vov1955@mail.ru

Александра Владимировна Зобенко

ассистент

Эл. почта: alexzobenko@mail.ru

Юрий Анатольевич Васильев

ассистент

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Кубанский государственный медицинский университет

Краснодар, Россия

Information about authors

Vladimir Yakovlevich Zobenko

Docent

E-mail: vov1955@mail.ru

Alexandra Vladimirovna Zobenko

Assistant

E-mail: alexzobenko@mail.ru

Yuri Anatolievich Vasiliev

Assistant

E-mail: yurii-59@mail.ru

Kuban State Medical University

FSBEI HE KubSMU

Russia, Krasnodar

УДК 616.314-08-053.2:615.83:616-036.86:616-007

ГРНТИ 76.29.55

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.38

**Васильев Ю.А., Шильцова Т.А.,
Пильщикова В.В., Ахеджак-Нагузе С.К.**
ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ СЕМЕЙ, ВОСПИТЫВАЮЩИХ ДЕТЕЙ С АНОМАЛИЯМИ РАЗВИТИЯ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ, НА ЭТАПЕ ДОХИРУРГИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ ПОМОЩИ

В исследовании рассмотрены некоторые проблемы, возникающие у семей, имеющих детей-инвалидов с врожденными пороками челюстно-лицевой области, на этапе получения дохирургической реабилитации. Семьи, реализуя права ребенка-инвалида на получение медицинской помощи не всегда последовательно соблюдают рекомендации и план лечения, недостаточно мотивированы в силу отсутствия необходимой информации о возможностях поддержания здоровья ребенка. Для ориентации на собственное участие в реабилитации ребенка предлагается взаимодействие родителей ребенка-инвалида и специалиста, способного предоставить исчерпывающую информацию о медицинских услугах и социальных гарантиях получения медицинской помощи.

Ключевые слова: дети-инвалиды, аномалии развития челюстно-лицевой области, дохирургическая реабилитация, медицинская помощь.

**Vasiliev Y.A., Shiltsova T.A., Pil'shikova V.V.,
Akhedzhak-Naguze S.K.**
FSBEI HE KubSMU

SOME PROBLEMS OF FAMILIES RAISING CHILDREN WITH MAXILLOFACIAL DEVELOPMENTAL ABNORMALITIES DURING PRE-SURGICAL REHABILITATION CARE

The study examines some of the problems that arise in families with disabled children with congenital malformations of the maxillofacial region, at the stage of receiving pre-surgical rehabilitation. Families, realizing the rights of a disabled child to receive medical care, do

not always consistently adhere to the recommendations and treatment plan, are insufficiently motivated due to the lack of necessary. To focus on their own participation in the rehabilitation of the child interaction between parents of a disabled child and a specialist who is able to provide comprehensive information about medical services and social guarantees of receiving medical care is proposed.

Keywords: *disabled children, developmental anomalies of the maxillofacial region, pre-surgical rehabilitation, medical care.*

Врожденные пороки челюстно-лицевой области в связи с их частотой, тяжестью анатомических и функциональных нарушений, трудностью социальной адаптации пациентов являются одним из актуальных вопросов общества. В последнее время наметилась тенденция к возрастанию частоты аномалий челюстно-лицевой области (ЧЛО), что связано с повышенным влиянием токсических веществ на организм. Увеличение врожденных пороков развития (ВПР) является важной характеристикой состояния здоровья населения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) частота рождаемости детей с расщелиной губы и неба в среднем составляет 1:750 новорожденных (по России данный показатель колеблется от 1:1000 до 1:600 в разных регионах), что составляет 20-30% от всех пороков развития человека и 86% от пороков развития ЧЛО [1].

Порок лицевой области обусловлен не только негативно воспринимаемой внешностью, но и определенными функциональными нарушениями, социальной ущербностью ребенка в общении со сверстниками, негативным психологическим фоном в семье, соматическими расстройствами, приводящими к стагнации в физическом и психологическом аспектах. Анатомический недостаток приводит к нарушению функций пораженных и сочлененных с ними органов, где возникают вторичные деформации. Нервно-психическое состояние детей отличается от общепринятых норм, т.к. изменения органического характера ведут к непредсказуемым невротическим реакциям, связанным с астеническим синдромом и вегетососудистой дистонией организма. В возникновении психогенных нарушений важную роль играют также неблагоприятные условия воспитания и психическое потрясение детей в раннем возрасте. Нарушение социальной адаптации ребенка в раннем возрасте в связи с дефектом не всегда удается исправить в старшем возрасте: во взрослую жизнь вступает не только физически, но и психологически деформированная личность.

После рождения ребенка с челюстно-лицевой патологией необходимо комплексное обследование специалистами (хирург, педиатр, ортопед, отоларинголог, психоневролог) для выявления отклонений соматического характера и сопутствующих пороков развития и проведения необходимой коррекции отклонений в предоперационном периоде [2]. После осмотра ребенка составляется план текущих и перспективных лечебных мероприятий в зависимости от врожденной аномалии.

Актуальность данной темы определяется не только высокой частотой рождаемости детей с указанной патологией, но и трудностями при выборе хирургического метода лечения. Разнообразие применяемых методик лечения и способов хирургической коррекции, несвоевременное обращение за медицинской помощью со стороны родителей или опекунов, приводят к малоэффективным анатомо-функциональным и эстетическим результатам.

Так же важным аспектом комплексной реабилитации является наличие обоснованного по времени алгоритма проведения хирургических и последующих медицинских мероприятий, соответствующих определенным нозологическим формам по МКБ10 – Q35, Q36, Q37. Очевидно, что безущербная социализация, своевременное и правильное выполнение этапов хирургического лечения определяет успех реабилитации пациентов с врожденными аномалиями ЧЛО.

Основной принцип хирургического лечения – раннее восстановление анатомической формы и создание условий для нормального приема пищи, дыхания и речи. Вместо

традиционных сроков хирургического лечения (уранопластика – не ранее 6 лет) в последние годы благодаря успехам ортодонтического лечения и развитию анестезиологической службы стало возможным проведение операций в более ранние сроки. Так, при частичной расщелине неба оперативное вмешательство в 1-3 года показало хорошие 8 результаты. При сквозной расщелине верхней губы и неба - эффективно 2-х этапное лечение: велоластика – с 4 месяцев, уранопластика – 2-5 лет.

Так, например, единственным краевым центром хирургической реабилитации по вышеуказанным нозологиям является челюстно-лицевое отделение ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края (ДККБ). В отделении челюстно-лицевой хирургии краевой больницы в полном объеме выполняются первичные и реконструктивные операции по коррекции врожденных аномалий развития лица и челюстей. Ребенку с врожденной патологией лица за период детства проводится от 3 до 7 оперативных вмешательств. Ежегодно выполняется 120-150 операций пациентам с данной патологией [3].

Динамика численности пациентов с аномалией ЧЛЮ, получивших высокотехнологичную медицинскую помощь (ВМП) в ДККБ Краснодарского края за период с 2007 по 2019 годы представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Динамика численности детей-инвалидов с аномалией ЧЛЮ, получивших ВМП в ДККБ Краснодарского края с 2007 по 2019 годы.

По данным рисунка 1 за исследуемый период наблюдается рост пациентов, прошедших хирургическую реабилитацию до 2014 года. Численность детей-инвалидов с аномалиями ЧЛЮ, поступивших на плановый этап реабилитации в 2019 году, незначительно снижается, хотя и превышает показатели 2007 года. Однако в процессе подготовки к очередному этапу хирургической реабилитации у семей, воспитывающих детей-инвалидов имеются организационные проблемы получения поликлинических услуг в полном объеме по месту жительства. Стационарное медицинское лечение труднее получить жителям сельской местности в виду ограничения предоставления поликлиническим звеном полного медицинского обследования, консультаций необходимых специалистов, отсутствия специализированного оборудования. Насущной проблемой остается сложность приобретения лекарственных препаратов, как следствие не решенных вопросов трудоустройства родителей. Зачастую дети-инвалиды воспитываются в неполных семьях, что негативно сказывается на реализации прав ребенка на получение медицинской помощи. Территориальная удаленность от центров реабилитации, отложенная запись на прием к необходимому специалисту также затрудняют возможность получения медицинской помощи. Немногочисленные семьи придерживаются последовательности лечения ребенка-инвалида. Большинству родителей необходима помощь в разъяснении информации о медицинских услугах и социальных гарантиях, позволяющих преодолеть затруднения в процессе поддержания здоровья ребенка-инвалида. Таким образом одним из критериев получения определенного объема медицинских услуг данной категории граждан зависит от социально-психологической адаптации семьи, воспитывающей ребенка-инвалида.

В данном случае критерием доступности медицинской помощи в соответствующем учреждении здравоохранения может выступать наличие в штатном расписании специалистов, проводящих онлайн занятия для родителей или опекунов с целью санитарно-просветительской работы по профилактике заболеваний, повышению социализации в обществе детей с ограниченными возможностями; консультирующих по социально-правовым вопросам и координирующих на активную позицию оздоровления своего ребенка. Это позволит не только организовать последовательность соблюдения предписаний врачей, уделить необходимое внимание определенным аспектам реабилитации, получить родителям ответы на часто задаваемые вопросы и соответственно разгрузить специалистов первичного педиатрического звена.

Следует отметить, что предоставление медицинских услуг детям-инвалидам в федеральных и региональных учреждениях базируется на существующей системе льгот, создании условий восстановления и реабилитации здоровья и является достаточно высококоразвитым механизмом оказания медицинской помощи детям с аномалиями развития челюстно-лицевой области.

Список литературы

1. Врожденные пороки развития. Общие сведения <https://szgmu.ru/upload/files>
2. Врожденные пороки челюстно-лицевой области.
https://otherreferats.allbest.ru/medicine/00570617_0.html
3. Optical Fibre Pressure Sensors in Medical Applications Фоменко И.В., Филимонова Е.В., Касаткина А.Л. Программа реабилитации детей с врожденной патологией челюстно-лицевой области. Волгоградский государственный медицинский университет, Комитет по здравоохранению администрации Волгоградской области, 2007 г.
4. Выявление врожденных расщелин губы и неба в ходе пренатального УЗИ-исследования в Краснодарском крае. Васильев Ю.А., Редько А.Н., Гуленко О.В., Удина И.Г. Российский стоматологический журнал. 2017. Т. 21. № 4. С. 190-193.
5. Сопутствующие заболевания у детей с врожденной патологией челюстно - лицевой области в крупном регионе РФ. Редько А.Н., Пильщикова В.В., Васильев Ю.А. В сборнике: Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции. Весенняя сессия. Под редакцией проф. Е.Л. Глориозова. 2018. С. 244-249.

Сведения об авторах

Юрий Анатольевич Васильев

ассистент

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Татьяна Александровна Шильцова

канд. экон. наук, доц. каф.

Эл. почта: Tshiltsova@yandex.ru

Валентина Владимировна Пильщикова

канд. мед. наук, доц. каф.

Эл. почта: vvp332002@mail.ru

Саида Казбековна Ахеджак-Нагузе

канд. мед. наук, доц. каф.

Эл. почта: naguzesk@mail.ru

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Россия, Краснодар

Information about authors

Yuri Anatolyevich Vasiliev

assistant

E-mail: yurii-59@mail.ru

Tatyana Aleksandrovna Shiltsova

candidate of economic sciences, associate professor

E-mail: Tshiltsova@yandex.ru

Valentina Vladimirovna Pil'shikova

candidate of medical sciences, associate professor

E-mail: vvp332002@mail.ru

Saida Kazbekovna Akhedzhak-Naguze

candidate of medical sciences, associate professor

E-mail: naguzesk@mail.ru

FSBEI HE KubSMU

Russia, Krasnodar

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ОТКЛОНЕНИЙ ВЕРХНЕЙ ЗУБНОЙ ДУГИ ОТ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ НОРМЫ

Результаты исследований позволяют количественно определить степень отклонений верхней зубной дуги и её сегментов от индивидуальной нормы, по величине площади фигуры, заключённой между кривой, проходящей по наружному экватору коронок зубов на модели и индивидуальной нормальной формой зубной дуги пациента на трафарете.

Ключевые слова: зубная дуга, постоянный прикус, трафарет-схема, диагностика.

Аюпова F.S.
Kuban State Medical University

QUANTIFICATION OF DEVIATIONS OF THE UPPER DENTAL ARCH FROM THE INDIVIDUAL NORM

The results of the research allow quantifying the degree of correspondence of the upper dental arch and its segments from the individual norm corresponding to the size of the figure area enclosed between the curve passing along the outer equator of the dental crowns on the model and the individual normal shape of the patient's dental arch on the stencil.

Keywords: dental arch, permanent dentition, stencil (scheme), diagnostics.

Введение. Ортодонтическое устранение зубочелюстных аномалий предполагает коррекцию формы и размеров зубных дуг. При этом одной из задач ортодонта является формирование индивидуальной нормальной зубной дуги.

Известно построение индивидуальной нормальной зубной дуги по Hawley-Herber-Herbst [1, с.42-46; 2, с. 218-219]. С применением этого способа были созданы 9 типовых прозрачных трафаретов и диагностическое устройство, позволяющие изучить положение зубов и аномалии зубных рядов относительно окклюзионной плоскости и координатной точки К, определяемых на боковой телерентгенограмме головы [3, с. 240-243]. Необходимость наличия боковой телерентгенограммы головы пациента ограничивает применение этого способа.

Известны рекомендации наносить в системе координат на прозрачную перлоновую пленку положение отдельных зубов и изучать изменения в процессе лечения [4]. Однако, следует отметить трудоёмкость и сложность обозначения в системе координат положения каждого зуба.

Опыт применения способа выявления нарушений зубной дуги по Hawley-Herber-Herbst позволяет предположить, что при построении диаграммы авторы принимали во внимание протяжённость только переднего сегмента, включающего резцы и клыки, при этом не уточняли длину боковых сегментов зубной дуги. Как следствие, способ не предполагает количественную оценку нарушений в боковых отделах зубной дуги.

Попытки совершенствовать способ выявления отклонений верхней зубной дуги и её сегментов позволили нам выявить закономерность: полусумма ширины коронок резцов и клыков верхней челюсти соотносится с длиной и шириной построенного по методу Hawley-Herber-Herbst графика индивидуальной нормальной верхней зубной дуги, как 1: 2,3 : 1,3. С учётом выявленной зависимости нами был создан комплект типовых трафаретов [5]. Трафарет подбирают к изучаемой модели в соответствии с шириной коронок резцов и клыков пациента. Визуальный анализ позволяет выявить и зафиксировать документально (сфотографировать) для контроля коррекции отклонения положения зубов, формы и размеров зубной дуги в сагиттальном и трансверсальном направлениях [6,7].

Однако, способ не позволяет количественно оценивать все отклонения зубной дуги от индивидуальной нормы и, следовательно, не может обеспечить достоверность результатов исследования. В этой связи нами были выполнены расчёты и создан планиметрический способ изучения верхней зубной дуги и её сегментов [8]. Представляет интерес практическое применение известных ранее и осуществлённых нами разработок.

Цель работы – изучить возможности количественной оценки отклонений верхней зубной дуги и её сегментов от индивидуальной нормы в динамике ортодонтического лечения.

Материалы и методы. Исследование проводили на 20 диагностических моделях верхней челюсти, полученных до и после ортодонтического лечения 10 пациентов, в том числе 6 девочек в возрасте 12-15 лет и 4 мальчиков в возрасте 13-16 лет. Измеряли ширину коронковой части центральных резцов, боковых резцов и клыков. Размеры коронок зубов суммировали, вычисляли полусумму. По значению этой полусуммы из комплекта типовых трафаретов-схем [4] извлекали соответствующий трафарет-схему, номер которого максимально был приближен к выявленному значению полусуммы ширины коронковой части центральных резцов, боковых резцов и клыков.

Полученные результаты. На исследуемую модель накладывали выбранную трафарет-схему с индивидуальной нормальной формой зубной дуги пациента, прозрачную миллиметровую сетку и фиксировали таким образом, чтобы окклюзионная плоскость модели пациента и трафарет-схема с миллиметровой сеткой располагались параллельно. При этом срединная линия трафарета-схемы совмещалась со срединным небным швом, а контрольные линии были максимально приближены к контактными точкам клыков и премоляров. Далее производили фотографирование с условием равномерного бестеневого распределения света. Затем на полученном изображении по условному наружному положению экватора зубов наносили линию. Таким образом, получали фигуру, площадь (S) которой соответствует отклонению зубной дуги и её сегментов от нормы и может быть определена с применением известного приёма путём подсчета суммы пересеченных n' ($n'=0,5\text{мм}^2$) и непересеченных n ($1n=1\text{мм}^2$) линиями клеток. Сравнительный анализ площадей фигур на модели до лечения (S) и после лечения (S') позволяла выявить изменение выраженности отклонения формы зубного ряда от индивидуальной нормы в динамике ортодонтической коррекции.

Площадь отклонения сегментов зубной дуги верхней челюсти от нормы в клинических случаях была различной и указывала на локализацию наиболее проблемных отделов зубной дуги. Величина отклонения всей зубной дуги от нормы отражала степень тяжести аномалии зубной дуги. В качестве примера приводим два клинических случая.

Клинический случай 1. Пациентка А., 16 лет, обратилась с жалобами на неудовлетворённость положением передних верхних зубов. После комплексного первичного стоматологического обследования пациента сформулировали предварительный клинический диагноз: нейтральная окклюзия (I класс по Энгля), асимметрия верхнего зубного ряда, тесное положение передних зубов верхней челюсти, вестибулярный наклон зуба 1.1, небное положение зубов 2.1 и 2.2.

Получили диагностические слепки и модели челюстей. На модели верхней челюсти измерили ширину коронковой части правых и левых центральных резцов, боковых резцов и клыков в миллиметрах. Вычислили полусумму значений ширины коронок резцов и клыков (21,25 мм) и из комплекта извлекли трафарет-схему № 21 (Табл. 1).

Определение номера трафарета-схемы индивидуальной нормальной зубной дуги

Табл. 1

Клинический случай	Ширина коронок постоянных зубов (мм)						Сумма ширины коронок зубов	Номер трафарета
	зуб 1.3	зуб 1.2	зуб 1.1	зуб 2.1	зуб 2.2	зуб 2.3		
№ 1	8,5	6,5	8,5	8,0	6,0	7,5	42,5	21
№ 2	7,5	6,0	8,5	9,0	6,0	7,5	45,0	22

Трафарет-схему № 21 и миллиметровую сетку наложили на модель верхней зубной дуги таким образом, чтобы срединная линия 1 трафарета-схемы совпадала со срединным нёбным швом на модели, а контрольные линии 2 максимально были приближены к контактным точкам клыков и премоляров и сфотографировали (Рис. 1А). На полученном изображении нанесли линию 3 по условному наружному положению экваторов зубов (Рис. 1Б). Далее определили площадь (S) фигуры между проекцией кривой, проведённой по экваторам зубов, и дугой 4 на трафарете по формуле: $S = \Sigma n + \Sigma 0,5 n'$, где Σn – площадь целых клеток на миллиметровой сетке, $\Sigma n'$ – площадь частично пересекаемых клеток. Оказалось, что $\Sigma n = 54$, $\Sigma n' = 189$. Исходная площадь отклонения зубной дуги верхней челюсти и её сегментов от нормы перед лечением была равной $S = 54 + 189:2 = 153$ (мм²).

План ортодонтического лечения включал расширение верхней зубной дуги, нормализацию положения зубов и окклюзии. На вестибулярные поверхности зубов пациентки установили брекет-систему Dimond Clear, применили по плану лечения ортодонтические дуги, эластические тяги. После завершения ортодонтического лечения вновь получили слепки и модели. На модель верхней челюсти после лечения наложили трафарет-схему № 21 с миллиметровой сеткой (Рис. 1В). Площадь (S) отклонения полученной после лечения зубной дуги от индивидуальной нормальной дуги на трафарете-схеме оказалась равной нулю. Это свидетельствовало об успешности ортодонтической коррекции зубной дуги.

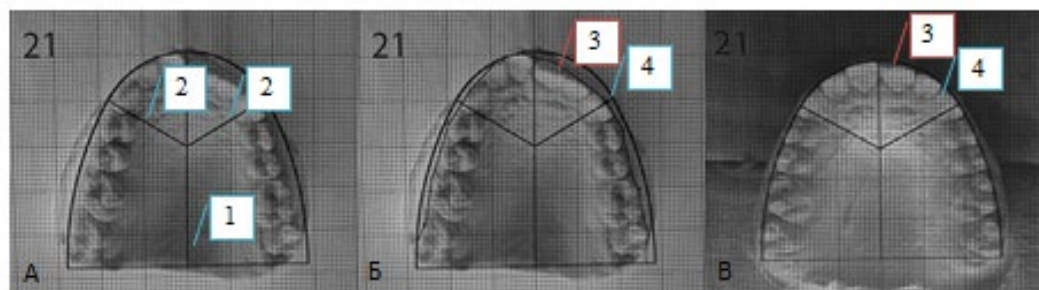


Рис. 1. Клинический случай № 1: А и Б – модель верхней зубной дуги с трафаретом и миллиметровой сеткой до ортодонтической коррекции, В – модель верхней зубной дуги с трафаретом и миллиметровой сеткой после ортодонтической коррекции

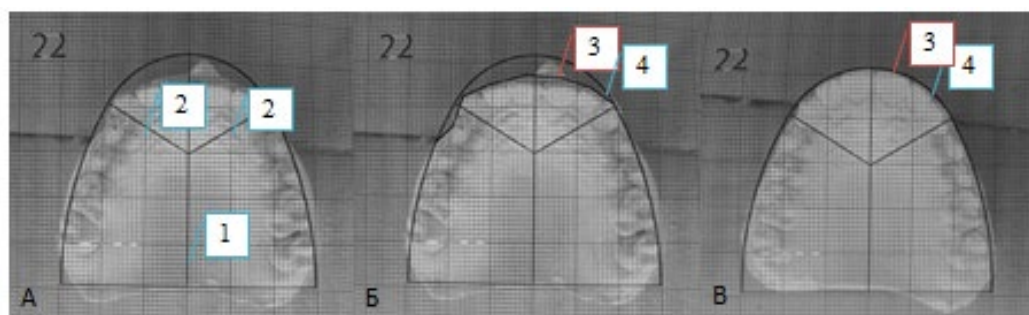


Рис. 1. Клинический случай № 2: А и Б – модель верхней зубной дуги с трафаретом и миллиметровой сеткой до ортодонтической коррекции, В – модель верхней зубной дуги с трафаретом и миллиметровой сеткой после ортодонтической коррекции

Клинический случай 2. Пациентка С., 15 лет. Обратилась с жалобами на нарушение положения передних верхних зубов. Проведено комплексное первичное стоматологическое обследование. Сформулирован предварительный диагноз: Нейтральная окклюзия (1 класс по Энгля), глубокая резцовая дизокклюзия, укорочение переднего отдела верхнего зубного ряда, вестибулопозиция клыков.

На диагностической модели верхней челюсти измеряли ширину коронковой части центральных резцов, боковых резцов и клыков в миллиметрах (Табл. 1). Вычисляли полусумму значений ширины коронковой части резцов и клыков (22,25 мм), выбрали трафарет-схему № 22 (Рис. 2А). Далее выполнили манипуляции аналогичные для клинического случая № 1. Провели необходимые вычисления и получили следующий результат: $\Sigma n = 120$, $\Sigma n' = 72$, $S = 120 + 72:2 = 156$. В клиническом случае № 2 площадь отклонения зубной дуги верхней челюсти от индивидуальной нормы составила 156 мм². План ортодонтического лечения в клиническом случае № 2 включал удлинение переднего отдела верхнего зубного ряда, перемещение центральных и боковых резцов в вестибулярном направлении, нормализацию положения зубов, формы зубной дуги, окклюзии. Для ортодонтического лечения применили брекет-систему Dimond Clear, с последовательной заменой ортодонтических дуг, использованием необходимых эластических тяг. На этапе завершения ортодонтического лечения вновь получили модель верхней зубной дуги и определили отклонение зубной дуги от индивидуальной нормы, которое оказалось равным нулю.

Выводы

1. Применение типовых трафаретов-схем с миллиметровой сеткой даёт возможность количественно выявлять отклонения верхней зубной дуги и её сегментов от индивидуальной нормы, достоверно контролировать эффективность ортодонтического вмешательства и уточнять план коррекции.

2. Фотографирование модели с наложенным трафаретом обеспечивает документальную регистрацию изменений зубной дуги в процессе ортодонтической коррекции, не трудоёмко и доступно для врача-ортодонта любого лечебного учреждения.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются выявленные возможности дать количественную оценку степени деформации зубного ряда и получаемых изменений в динамике ортодонтического лечения в условиях применения современных несъёмных конструкций, которые позволяют одновременно перемещать все неправильно расположенные зубы в правильное положение. При этом перспективным является применение данного подхода автоматизированным способом.

Цитируемая литература

1. *Ужумецкене И. И.* Методы исследования в ортодонтии. М.: Медицина, 1970. С. 42-46.

2. *Хорошилкина Ф.Я., Френкель Р., Демнер Л.М., Фальк Ф., Малыгин Ю.М., Френкель К.*: Диагностика и функциональное лечение зубочелюстно-лицевых аномалий. // (Совместное издание СССР-ГДР). М.: Медицина, 1987. С. 218-219.

3. *Попова И. В., Персин Л.С., Кузнецова Г.В.* Диагностика аномалий зубов и зубных рядов с помощью прозрачных трафаретов. // Наука – практике: м-лы науч. сессии ЦНИИС, посв. 35-летию института. М., 1998. С. 240-243.

4. *Петрова Ю.К.* Способ определения размеров зубных дуг в трансверсальном и сагиттальном направлениях // Информационный листок ВНПО «Стоматология» МЗ СССР, 1990. Регистрационный №10-11/80.

5. Аюпова Ф.С., Брижак А.Ю., Восканян А.Р., Вишневецкая Д.Ю. Способ контроля ортодонтической коррекции верхней зубной дуги и её сегментов. // Патент № 2486875

6. Аюпова Ф.С. Способ выявления отклонений от нормы верхней зубной дуги и её сегментов. // Казанский медицинский журнал. Казань, 2013. Т.ХСIV. №1. С.131-133.

7. Брижак А.Ю. Графический метод определения отклонений формы и размеров верхней зубной дуги от индивидуальной нормы. // Аспирантские и докторантские чтения: дерзания нового времени – поиск инноваций: Сборник тезисов науч.-практ. конференции. Москва, 2012. С. 37-38.

8. Аюпова Ф.С. Планиметрический способ контроля коррекции верхней зубной дуги // Патент № 2386393, (RU). опубл. 20.04.2010, Бюл. № 11. С. 7.

Сведения об авторе

Фарида Сагитовна Аюпова

канд. мед. наук, доц.

Эл. почта: farida.sag@mail.ru

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Россия, Краснодар

Information about author

Farida Sagitovna Ayupova

Assistant Professor

E-mail: farida.sag@mail.ru

Kuban State Medical University

Russia, Krasnodar

УДК 614.25:378:331:004

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.40

Ахеджак-Нагузе С.К.

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

**ФОРМИРОВАНИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-УПРАВЛЕНЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ
ВЫПУСКНИКОВ МЕДИЦИНСКОГО ВУЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИННОВАЦИОННЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ**

Использование современных инновационных подходов к формированию организационно-управленческой деятельности выпускников медицинского вуза, базирующихся на внедрении новых достижений в науке и технике, направленное на формирование компетенций, востребованных обществом, повышает качество подготовки выпускников.

Ключевые слова: *информационные ресурсы, инновационные подходы, качество образования, компетенции, «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения», «Административно - правовое регулирование медицинской деятельности».*

Akhedzhak-Naguzе S.K.

Kuban State Medical University

FORMATION OF ORGANIZATIONAL AND MANAGEMENT ACTIVITIES OF GRADUATES OF A MEDICAL UNIVERSITY

The use of modern innovative approaches to the formation of organizational and managerial activities of graduates of a medical university, based on the introduction of new achievements in science and technology, aimed at the formation of competencies in demand by society, increases the quality of graduate training.

Keywords: *information resources, innovative approaches, quality of education, competencies, "Public health and health care, health economics", "Administrative and legal regulation of medical activities."*

Введение. Инновационная деятельность в сфере высшего образования является одной из важнейших составляющих модернизации образовательной системы [1 - 6].

В целях формирования организационно - управленческой деятельности выпускников медицинского вуза, овладения соответствующими компетенциями при изучении дисциплин «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения», «Общественное здоровье и здравоохранение» и «Административно - правовое регулирование медицинской деятельности» внедряются в учебный процесс инновационные технологии обучения, которые делают образовательный процесс практико-ориентированным, проблемно-исследовательским, прикладным, способствуя активизации самостоятельной работы и улучшению учебной деятельности студентов, применению ими формируемых компетенций для решения многих задач.

Целью работы явилось изучение основ формирования организационно - управленческой деятельности выпускников в ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Материалы и методы. В ходе исследования анализировались рабочие программы по дисциплинам «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения», «Общественное здоровье и здравоохранение», «Административно - правовое регулирование медицинской деятельности», методические, статистические и аналитические материалы и др.. на кафедре общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России с использованием статистического, аналитического методов.

Полученные результаты. Учебный процесс на кафедре общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России осуществляется с учетом требований ФГОС ВО 3 плюс, рабочих программ по дисциплинам «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения», «Общественное здоровье и здравоохранение», «Административно - правовое регулирование медицинской деятельности».

Изучение данных дисциплин направлено на формирование у обучающихся общекультурных, общепрофессиональных и профессиональных компетенций, позволяющих выпускнику медицинского вуза решать различные профессиональные задачи в соответствии с видами профессиональной деятельности, на которые ориентирована программа специалитета: медицинская деятельность, организационно-управленческая деятельность, научно-исследовательская деятельность.

Формирование организационно-управленческой деятельности выпускников включает знания и умения:

- применение основных принципов организации оказания медицинской помощи в медицинских организациях и их структурных подразделениях;
- ведение медицинской документации в медицинских организациях;
- организация проведения медицинской экспертизы;
- участие в организации оценки качества оказания медицинской помощи пациентам;
- соблюдение основных требований информационной безопасности;

В программу практических занятий по дисциплинам «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения» и «Общественное здоровье и здравоохранение» включены вопросы по медико-социальным аспектам демографических процессов, заболеваемости, инвалидности, физического развития, статистическим методам обработки результатов медико-биологических исследований, организации охраны здоровья населения, по социальному и медицинскому страхованию, ведомственной и вневедомственной экспертизе качества медицинской помощи, экономике здравоохранения.

Применение современных инновационных технологий в преподавании дисциплины «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения», «Общественное здоровье и здравоохранение» и «Административно - правовое регулирование медицинской деятельности» студентам реализуется традиционными методами с применением современной компьютерной и мультимедиа проекционной техники, созданием современных презентационных программ с включением в них аудио — визуальных образов в ключевых, требующих обязательного запоминания и длительного сохранения в памяти важнейших положений предмета, постулатов, принципов и закономерностей, базирующихся на внедрении новых достижений в науке и технике, направленных на формирование компетенций, востребованных обществом.

Информационные компьютерные технологии, активно применяемые при подготовке учебно-методических пособий, методических рекомендаций, лекций, наглядного материала, повышают информативность и наглядность, способствуют формированию у студентов навыков самостоятельной работы [3,4].

Успешность овладения этими дисциплинами достигается в процессе совместной работы преподавателя и студента, учета индивидуальных возможностей студентов, правильной организации самостоятельной работы студентов, доступности учебного материала.

Учебно-методические пособия, методические рекомендации, составленные преподавателями кафедры, соответствуют структуре и содержанию данных учебных программ, обеспечивают координацию в процессе преподавания, раскрывают методы, средства, различные приемы, формы обучения студентов.

Применение интерактивных досок на практических занятиях позволяют объединить экран для отображения информации, обычную маркерную доску и интерактивный монитор. Возможность анимации, изменение и выделение значимых элементов при помощи цвета и шрифта позволяет задействовать визуальные, аудиальные, а также кинестетические каналы усвоения информации.

Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», включающие электронные библиотеки, электронные учебники, ссылки на периодические публикации, информационные ресурсы здравоохранения обеспечивает доступ обучающихся к современным профессиональным базам данных и информационным справочным системам, состав которых определяется в рабочей программе дисциплин, способствует уменьшению времени на поиски нужной информации, в том числе оперативной и сводной статистической отчетности на сайте ГБУЗ «Медицинский информационно-аналитический центр» Министерства здравоохранения Краснодарского края, на портале Федеральной службы государственной статистики, что облегчает проведение статистического анализа показателей: медико-демографических, заболеваемости, инвалидности, деятельности медицинских организаций [3-6].

В качестве доступного обучающего материала в социальных сетях используются электронные лекции, в том числе в режиме онлайн на платформе для вебинаров Cisco Webex Meetings, фотографии, видео материалы, учебно-методические пособия, книги и др., что позволяет сделать образовательный процесс более наглядным, демонстративным и предоставляет возможность использования восприятия зрительных образов как дополнительный источник информации.

Комплексная оценка качества учебной работы студентов с использованием рейтинговой системы является накопительной и применяется для управления образовательным процессом.

Объективное представление об уровне знаний студентов по дисциплине можно получить при условии осуществления систематического контроля учебного процесса преподавателем. Контрольно-оценочная составляющая образовательного процесса происходит в форме текущего и промежуточного контроля освоения знаний студентами. Для контроля усвоения учебных дисциплин «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения», «Общественное здоровье и здравоохранение» и «Административно -

правовое регулирование медицинской деятельности» используются тесты и ситуационные задачи, разработанные сотрудниками кафедры, а также устный опрос. Система стандартизированных заданий, позволяет автоматизировать процедуру измерения уровня знаний и умений обучающегося, оценить и проанализировать наиболее часто встречающиеся ошибки. Тесты разработаны для программной оболочки «MyTest». Фонд оценочных средств сотрудниками кафедры составлен ко всем темам практических занятий, промежуточному контролю для студентов, ординаторов и аспирантов по всем специальностям. Промежуточный контроль происходит по дисциплинам: «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения» на лечебном и педиатрическом факультетах и «Общественное здоровье и здравоохранение» на медико-профилактическом факультете в виде «экзамена», «Общественное здоровье и здравоохранение» на стоматологическом и «Административно - правовое регулирование медицинской деятельности» на лечебном, педиатрическом, стоматологическом факультетах в виде «зачтено».

Мобильные компьютерные классы на базе планшетов активно применяются на занятиях. Базовый компьютер – ноутбук преподавателя является сервером информационной обучающей среды, содержащей электронные учебно-методические пособия, индивидуальные задания для практических занятий, контрольные вопросы, тесты, базы архивов тестовых отчетов. Пакет учащегося включает программы для обучения.

Освоение студентами медицинских электронных информационных систем, автоматизированных рабочих мест врача, электронных систем помощи в принятии решений, доступа к электронным информационным и обучающим ресурсам, применяемых в практическом здравоохранении способствуют успешному прохождению первичной аккредитации, работе врачей при оказании первичной медико-санитарной помощи и ознакомлению будущих специалистов с функциональными характеристиками и доступными возможностями портала непрерывного медицинского образования Минздрава России [1 - 6].

Под руководством преподавателя в рамках преподавания данных дисциплин проводятся научные исследования студентами, представляются в виде мультимедийной презентации с устным докладом на студенческом кружке, что позволяют проявить интерес к исследуемой теме не только докладчика, но и других студентов.

В целях подготовки выпускников к государственной итоговой аттестации проводится актуализация тестов и ситуационных задач по дисциплинам «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения», «Общественное здоровье и здравоохранение», включенных в ситуационные задачи «вида аттестационных испытаний государственного экзамена».

На практических занятиях по выше, указанным дисциплинам студенты:

- анализируют состояние общественного здоровья с учетом демографической ситуации, данных заболеваемости и показателей физического развития на конкретных, реальных материалах официальной статистической отчетности медицинских организаций Краснодарского края в целом и разрабатываются комплексные планы оздоровительных мероприятий;

- оценивают деятельность медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь в амбулаторных, стационарных условиях и в условиях дневного стационара, а также врачей, используя данные официальной статистической отчетности.

Для закрепления вопросов общественного здоровья и здравоохранения на практических занятиях для выпускных курсов дополнительно по дисциплине «Административно - правовое регулирование медицинской деятельности» систематизированы и конкретизированы знания и умения по организации и административно-правовому обеспечению и комплексной оценки деятельности врача-терапевта участкового, врача-педиатра участкового, новой модели медицинской организации, оказывающей первичную медико-санитарную помощь, ориентированную на потребности пациента, бережное отношение к временному ресурсу как основной ценности за счет оптимальной логистики реализуемых процессов, организованную с учетом принципов эргономики и соблюдения

объема рабочего пространства, создающую позитивный имидж медицинского работника, организация оказания медицинской помощи, в которой основана на внедрении принципов бережливого производства в целях повышения удовлетворенности пациентов доступностью и качеством медицинской помощи, эффективного использования ресурсов системы здравоохранения.

Выводы. Таким образом, формирование организационно - управленческой деятельности выпускников медицинского вуза базируется на внедрении новых достижений в науке и технике с применением инновационных технологий и направлено на повышение качества подготовки выпускников ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Заключение. Проведенное исследование показало, что на кафедре общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России в целях формирования организационно - управленческой деятельности выпускников медицинского вуза, овладения соответствующими компетенциями при изучении дисциплин «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения», «Общественное здоровье и здравоохранение» и «Административно - правовое регулирование медицинской деятельности» внедряются в учебный процесс современные инновационные технологии обучения, которые делают образовательный процесс практико-ориентированным, проблемно-исследовательским, прикладным, способствуя активизации самостоятельной работы и улучшению учебной деятельности студентов, применению ими формируемых компетенций для решения многих задач.

Литература

1. 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.
2. Алексеенко С.Н., Гайворонская Т.В., Ахеджак-Нагузе С.К. Пути эффективного продвижения выпускников на рынке труда // Материалы междунар. конф. «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии», «New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology» IT + ME`, 2017.– Крым, Ялта-Гурзуф, с 02 по 12 июня 2018 года. – 2018. – С. 35-38.
3. Ахеджак-Нагузе С.К., Редько А.Н. Современные инновационные подходы к преподаванию дисциплины «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения» студентам ФГБОУ КубГМУ Минздрава России // Материалы междунар. конф. «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии», «New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology» IT + ME` 2017 Крым, Ялта-Гурзуф, с 02 по 12 июня 2017 года. – 2017. – С 231-234.
4. Редько А.Н., Зобенко А.В., Рубцова И.Т., Губарев С.В. Применение инновационных методов, форм и средств обучения дисциплинам «Медицинская информатика», «Информационные технологии в науке и медицине» в Кубанском государственном медицинском университете // Междунар. журнал экспериментального образования. – 2017. – №4. – С. 225-228.
5. Редько А.Н., Губарев С.В., Зобенко А.В. Преемственность преподавания информационных технологий на различных этапах обучения студентов в медицинском вузе // Материалы IX межвуз. учеб-метод. конф. с межд. участием «Инновации в образовании». г. Краснодар, 28 марта 2018г. С.230-234
6. Редько А.Н., Ахеджак-Нагузе С.К. Реализация образовательной программы по дисциплине «Общественное здоровье и здравоохранение, экономика здравоохранения»

в ФГБОУ ВО КУБГМУ Минздрава России // Материалы IX межвуз. учеб-метод. конф. с междунар. участием «Инновации в образовании». г. Краснодар, 28 марта 2018г. С.227-230.

Сведения об авторе

Саида Казбековна Ахеджак-Нагузе

канд. мед. наук, доц. каф.

Эл. почта: naguzesk@mail.ru

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Россия, Краснодар

Information about author

Saida Kazbekovna Akhedzhak-Naguze

candidate of medical sciences, associate professor

E-mail: naguzesk@mail.ru

FSBEI HE KubSMU

Russia, Krasnodar

УДК 614.25: 378.374:004

ГРНТИ 76.01.79

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.41

Алексеев С.Н., Гайворонская Т.В.,

Ахеджак-Нагузе С.К.

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

**ПРИМЕНЕНИЕ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В РАБОТЕ
ЦЕНТРА СОДЕЙСТВИЯ ТРУДОУСТРОЙСТВУ ВЫПУСКНИКОВ
ФГБОУ ВО КУБГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ**

Применение современных информационных технологий в работе Центра содействия трудоустройству выпускников ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России способствует активному взаимодействию с местными органами власти, предприятиями и организациями для достижения эффективного содействия трудоустройству студентов и выпускников, ординаторов и аспирантов.

Ключевые слова: *трудоустройство, информационные технологии, семинары по содействию трудоустройству выпускников, ярмарка вакансий рабочих мест врачей и провизоров, рынок труда, студенты, выпускники, ординаторы, аспиранты.*

Alekseenko S.N., Gaivoronskaya T.V., Akhedzhak-Naguze S.K.

FSBEI HE KubSMU of the Ministry of Health Care of the Russian Federation

APPLICATION OF INFORMATION TECHNOLOGIES IN THE WORK OF THE CENTER FOR PROMOTING EMPLOYMENT OF GRADUATES OF THE FSBEI VO KUBSMU OF THE MINISTRY OF HEALTH OF THE RUSSIAN FEDERATION

The use of modern information technologies in the work of the Center for Assisting the Employment of Graduates of the FSBEI HE KubSMU of the Ministry of Health of Russia promotes active interaction with local authorities, enterprises and organizations to achieve effective assistance in the employment of students and graduates, residents and graduate students.

Keywords: *employment, information technology, seminars to promote the employment of graduates, job fair for doctors and pharmacists, labor market, students, graduates, residents, graduate students.*

Введение. Содействие трудоустройству выпускников является одним из приоритетных направлений работы медицинского вуза. Применение информационных технологий в продвижении выпускников медицинского вуза на рынке труда является актуальным [1-4].

Цель работы: изучить применение информационных технологий в работе Центра содействия трудоустройству выпускников ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Материалы и методы. Анализировались нормативные и аналитические документы Центра содействия трудоустройству выпускников ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (далее Центра) с использованием теоретического, статистического, аналитического методов.

Полученные результаты. Работа Центра содействия трудоустройству выпускников ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (далее Университет) направлена на объединение усилий всех подразделений ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, взаимодействие с местными органами власти, предприятиями и организациями для достижения эффективного содействия трудоустройству студентов, выпускников, в том числе ординаторов и аспирантов.

Центр в целях содействия трудоустройству выпускников Университета с применением инновационных информационных технологий осуществляет:

- методическое и информационное обеспечение формирования и функционирования системы содействия трудоустройству выпускников Университета;
- сопровождение программного обеспечения автоматизированной информационной системы содействия трудоустройству выпускников (АИСТ) Университета, обеспечивающей выпускников и студентов данными о рынке труда;
- анализ трудоустройства выпускников Университета;
- представление аналитической информации в части содействия трудоустройству выпускников органам государственной исполнительной власти, в том числе органам управления образованием.
- организацию проведения ярмарок вакансий, тренингов, семинаров, презентаций профессий, специальностей и направлений подготовки, анкетирования работодателей, студентов, выпускников, ординаторов, аспирантов, иных мероприятий по направлениям деятельности Центра;
- оказание консультационных и информационных услуг по вопросам трудоустройства и занятости студентов и выпускников;
- организацию встреч заинтересованных студентов, выпускников, в том числе ординаторов, аспирантов с потенциальными работодателями;
- взаимодействие с территориальными органами государственной службы занятости населения;
- предоставление информации по содействию трудоустройству выпускников для размещения на официальном сайте Университета по адресу: ksma.ru/structure/cstv в сети интернет;
- содействие профориентации студентов, выпускников;
- иные виды деятельности, разрешенные действующим законодательством для федеральных государственных образовательных учреждений в целях содействия трудоустройству.

С целью содействия трудоустройству студентов, выпускников, ординаторов, аспирантов ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, в том числе обучающихся по договорам о целевом обучении и с ограниченными возможностями здоровья и инвалидностью, адаптации их на рынке труда согласно Положению о Центре содействия трудоустройству выпускников ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России и утвержденным планам работы Центра организованны и проведены с применением инновационных информационных технологий в дистанционном режиме на платформе для вебинаров Cisco Webex Meetings 13 семинаров по содействию трудоустройству выпускников (далее - семинары) для обучающихся всех факультетов и курсов, для ординаторов 1-го и 2-го годов обучения в декабре 2020 года, в январе – апреле 2021 года в рамках дней карьеры - 6 семинаров и ярмарка вакансий рабочих мест врачей и провизоров для выпускников всех факультетов, ординаторов, аспирантов (Приказы ректора Университета от 23 ноября 2020 года № 792 «О проведении семинаров по содействию трудоустройству выпускников» и от 05 февраля 2021 №42 «О проведении дней карьеры по содействию трудоустройству выпускников»).

Приняло участие в выше перечисленных мероприятиях в декабре 2020 года более 5768 участников, из которых 5256 студентов Университета, что составило 86% от всех обучающихся, в том числе с ограниченными возможностями здоровья и инвалидностью – 129 человек (100 %), ординаторов – 320, что составило 24% от всех обучающихся в ординатуре, в январе-апреле 2021 г. - выпускники всех факультетов Университета (100%), аспиранты (100%), ординаторы (100%), руководство и сотрудники различных подразделений Университета, Министерства здравоохранения Краснодарского края, Министерства труда и социального развития Краснодарского края, Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Краснодарскому краю, руководители и специалисты ГКУ КК «Центров занятости населения в муниципальных образованиях» (далее ЦЗН) (19 ЦЗН, 42 специалиста), ФБУЗ «Центров гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» (далее ЦГиЭ) (8 ЦГиЭ), ГКУ КК «Центр молодежных инициатив Краснодарского края» (участие 3 специалистов в 20 семинарах), представители более 90 медицинских и фармацевтических организаций Краснодарского края и др.

В рамках проведенных мероприятий по содействию трудоустройству выпускников (семинаров, дней карьеры, ярмарки вакансий рабочих мест врачей и провизоров) с применением инновационных информационных технологий в дистанционном режиме на платформе для вебинаров Cisco Webex Meetings:

1. Студенты, выпускники, ординаторы, аспиранты, работодатели и другие участники информированы:

- о работе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России по содействию трудоустройству выпускников»;
- о возможности участия в Проекте «Профстажировка 2.0» в рамках проекта АНО «Россия - страна возможностей» и Общероссийского народного фронта, который реализуется в форме всероссийского конкурса студенческих работ по решению задач (кейсов) компании, как новый формат дистанционного взаимодействия между работодателем и студентом;
- о правилах поступления в ординатуру;
- о профориентационной работе, взаимодействии с образовательными учреждениями по временной занятости студентов в рамках работы волонтерского центра, о работе волонтеров - медиков в медицинских организациях г.Краснодара и Краснодарского края;
- о возможности участия работодателей в мероприятиях по содействию трудоустройству выпускников;
- о состоянии и тенденциях рынка труда (спросе и предложениях, вакансиях);
- о вакансиях и о возможностях трудоустройства молодежи на временную и сезонную занятость в составе трудовых студенческих отрядов на территории Краснодарского края;

2. Оказаны консультационные и информационные услуги по вопросам трудоустройства и занятости студентов, выпускников, ординаторов, аспирантов;

3. Проведены тренинги по технологиям поиска работы и формированию электронного портфолио обучающихся;

4. Организованы встречи заинтересованных студентов, выпускников, в том числе ординаторов и аспирантов с потенциальными работодателями.

Участники семинаров отметили высокую организацию проведения мероприятий с применением современных информационных технологий, информативность, важность и своевременность полученной информации, реально содействующих трудоустройству студентов, выпускников, в том числе ординаторов, аспирантов.

В адрес ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России поступило большое количество благодарственных писем от участников семинаров о высоком уровне организации и проведении семинаров по содействию трудоустройству выпускников.

Выводы. Таким образом, применение современных информационных технологий в работе Центра содействия трудоустройству выпускников ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России способствует активному взаимодействию с местными органами власти, предприятиями и организациями для достижения эффективного содействия трудоустройству студентов и выпускников, в том числе ординаторов и аспирантов.

Заключение. Работа Центра содействия трудоустройству выпускников ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России направлена на объединение усилий всех подразделений ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, взаимодействие с местными органами власти, предприятиями и организациями для достижения эффективного содействия трудоустройству студентов и выпускников, в том числе ординаторов и аспирантов. В своей работе Центр активно применяет инновационные информационные технологии эффективного содействия трудоустройству выпускников.

Литература

1. Алексеенко С.Н., Гайворонская Т.В., Ахеджак-Нагузе С.К. О деятельности центра содействия трудоустройству выпускников ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России // Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – №4. – С. 20-25.
2. Алексеенко С.Н. Гайворонская Т.В., Ахеджак-Нагузе С.К. Инновационные технологии эффективного продвижения выпускников на рынке труда // Материалы междунар. конф. «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии», «New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology» IT + ME`, 2017.– Крым, Ялта-Гурзуф, с 02 по 12 июня 2017 года. – 2017. – С. 224-231.
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.
4. Алексеенко С.Н., Гайворонская Т.В., Ахеджак-Нагузе С.К. Современные инновационные технологии содействия трудоустройству выпускников // Материалы междунар. конф. «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии», «New Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology» IT + ME`, 2019.– Крым, Ялта-Гурзуф. Весенняя сессия. – 2019 – С. 112-117.

Сведения об авторах

Сергей Николаевич Алексеенко

д-р мед. наук

ректор

E-mail: Corpus@ksma.ru

Татьяна Владимировна Гайворонская

д-р мед. наук

проректор по учебной и воспитательной работе

E-mail: T.Gaivoronskaya@rambler.ru

Саида Казбековна Ахеджак-Нагузе

канд. мед. наук

рук. центра содействия трудоустройству выпускников, пом. проректора по учебной и воспитательной работе по практическим навыкам, доц. каф. общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины

Эл. почта: naguzesk@mail.ru

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Россия, Краснодар

Information about authors

Sergei Nikolaevich Alekseenko

M.D.

Rector

E-mail: Corpus@ksma.ru

Tatiana Vladimirovna Gaivoronskaya

M.D.

Vice-chancellor

E-mail: T.Gaivoronskaya@rambler.ru,

Saida Kazbekovna Arkhedzhak-Naguze

Ph.d., Associate Professor

Head of the Centre for Assistance in Graduates' Employment, Assistant of Vice Chancellor for Teaching Process and Educative Wor, Assistant professor of the Chair of Public Health, Health Care and the History of Medicine

E-mail: naguzesk@mail.ru

FSBEI HE KubSMU

Russia, Krasnodar

КОСМИЧЕСКАЯ ПОГОДА И СОЦИАЛЬНОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ:
ГЕНОГЕОГРАФИЯ ПАНДЕМИИ COVID-19

Особенностью пандемии COVID-19 является значительная вариабельность числа летальных исходов на 1 млн населения в разных странах (4-10 раз) при норме для обычного гриппа в 1,5-2 раза. Максимальные значения летальности наблюдаются в странах с доминантной гаплогруппой R1b при высоком уровне развития и организации медицины. В докладе рассматривается существенная роль солнечной активности, генетического состава населения и степени социального регулирования в географической неравномерности тяжести протекания пандемии SARS-CoV-2. В ближайшие 40 лет предполагается сохранение низкой солнечной активности. В этих условиях можно ожидать двукратное увеличение числа пандемий (каждые 5-6 лет вместо 10-11 лет) с выраженными геноегеографическими отличиями в развитии локальных эпидемий.

Ключевые слова: пандемии гриппа, SARS-CoV-2, гаплогруппы R1b и R1a, экстремумы солнечной активности, ультрафиолетовое излучение, космические лучи

Ragulskaya M.V.

Institute of Terrestrial Magnetism and Radio Wave Propagation RAS

SPACE WEATHER AND SOCIAL REGULATION: COVID-19 PANDEMIC
GENOGEOGRAPHIC

A feature of the COVID-19 pandemic is a significant variability in the number of deaths per 1 million of population in different countries (4-10 times), while the norm for ordinary flu is 1.5-2 times. The maximum mortality are observed in countries with a high level of development and organization of medicine, but with a dominant haplogroup R1b. The report examines the significant role of solar activity, genetic composition of the population and the degree of social regulation in the geographical unevenness of the severity of the SARS-CoV-2 pandemic. Low solar activity is expected to persist for the next 40 years. Under these conditions, a twofold increase in the number of pandemics can be expected (every 5-6 years instead of 10-11 years) with pronounced genoegeographic differences in the development of local epidemics.

Key words: influenza pandemics, SARS-CoV-2, haplogroups R1b and R1a, extrema of solar activity, ultraviolet radiation, cosmic rays

Введение. Регуляторные механизмы биосферы откликаются как на высокие, так и на низкие периоды солнечной активности (СА), меняется только удельный вклад основных действующих факторов космической погоды [1]. 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]. В докладе рассматриваются четыре основных фактора, модулирующих развитие пандемии: динамика солнечной активности и галактических космических лучей; геноегеографическое распределение населения (в частности, характерные для данной местности гаплогруппы); температурный режим окружающей среды; уровень медицины и локадауны.

Космическая погода и геноегеография пандемии SARS-CoV-2. Солнечная активность и интенсивность УФ-излучения имеют периоды различной длительности, из которых наибольшее эпидемиологическое значение имеют около 11-летний цикл и около-100 летний цикл динамики. Такая же цикличность, но в противофазе, характерна для

космических лучей. В 19-21 веках все пандемии гриппа происходили в экстремумах СА. В России разница заболеваемости ОРВИ и гриппом в максимуме и минимуме СА составляет более 26 миллионов человек (Рисунок 1, данные РОССТАТ и ИЗМИРАН).

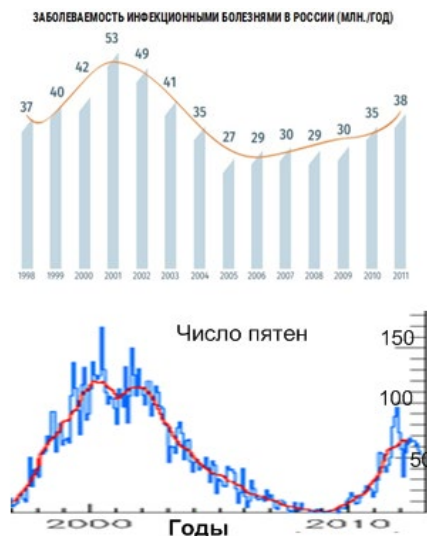


Рисунок 1.
Число инфекционных заболеваний в России за 1998-2011 год по данным Федеральной службы государственной статистики (млн. человек), и динамика солнечной активности 23-24 циклов (число ежедневных и сглаженных солнечных пятен).

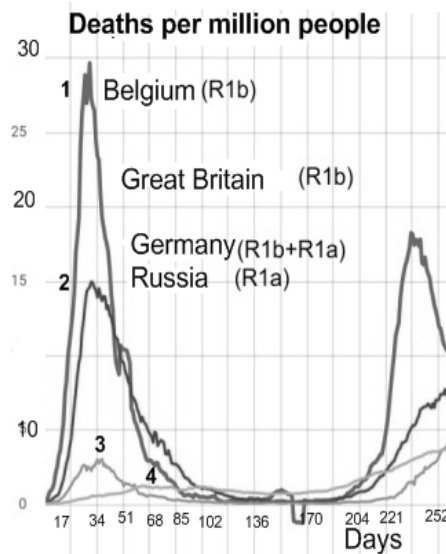


Рисунок 2.
Динамика относительной заболеваемости (слева) и смертей (справа) на 1 млн человек в странах с доминантной гаплогруппой R1, пандемия COVID-19 по декабрь 2020 года (до начала всеобщей вакцинации).
1. Бельгия (гаплогруппа R1b),
2. Великобритания (гаплогруппа R1b),
3. Германия (гаплогруппа R1b + R1a),
4. европейская часть России (гаплогруппы R1a + N).

В 2019-2020 годах наблюдался одновременный глубокий минимум квази-столетнего и минимум 11-летнего цикла солнечной активности. Это сказалось на эпидемиологической обстановке в мире, и особенностях течения пандемии COVID-19. Особенностью пандемии COVID-19 является значительная вариабельность числа летальных исходов на 1 млн населения в разных странах (4-10 раз) при норме для обычного гриппа в 1,5-2 раза. Максимальные значения летальности наблюдаются в благополучных странах с высоким уровнем развития и организации медицины. При этом самые строгие карантинные меры оказываются неэффективными: в первую волну относительная смертность в Швеции без локдауна была в 4-5 раз ниже, чем в Испании и Италии с жестким локдауном. А относительная летальность в Иране и России в 5 раз меньше, чем в Великобритании и Бельгии (в первую волну разница составляла больше порядка).

Анализ статистических данных показал, что текущая пандемия COVID -19 наиболее тяжело протекает в странах с доминантной гаплогруппой R1b (Испания, Бельгия, Великобритания, Франция, северная Италия, Швейцария, частично – США) [4]. Генетические вариации объясняют различия в силе иммунных реакций лейкоцитарных антигенов. В работе [5] было обнаружено, что антиген HLA-B * 46: 01 (соответствующий одной из ветвей гаплогруппы R1b) имел наименьшее связывание пептидов как для SARS-CoV в 2003 году, так и для SARS-CoV-2 в 2019-2020 годах. Аллели антигенов HLA-B * 15: 03; HLA-A * 02: 02; HLA-C * 12: 03 (гаплогруппа R1a) показали наибольшую способность связывать пептиды SARS-CoV-2, а значит и большую устойчивость к вирусу для их обладателей.

Исследования степени окислительного повреждения ДНК как молекулярного предиктора экзогенных нарушений показали, что после обработки сыворотки крови и лимфоцитов (выделенных из периферической крови здоровых доноров) переменным магнитным полем и гамма-излучением наблюдается достоверное изменение уровня содержания 8-OHdG и одонитевых разрывов ДНК. Наибольшее количество повреждений ДНК зафиксировано в возрастных группах старше 60 и младше 20 лет. Полученный эффект может быть связан с генерацией активных форм кислорода и азота при воздействии излучений на процесс репарации ДНК, и влиять на адаптационные возможности конкретного организма [6].

На европейской территории России доминантной гаплогруппой является R1a, для которой оказалось характерно быстрое развитие эпидемии при низкой летальности и большом количестве бессимптомных больных (Россия, частично – Германия, Индия, Иран). В северных областях России удельный вес R1a сокращается почти вдвое, уступая место гаплогруппе Nc1. Различия в генетическом составе населения может объяснить существенную разницу развития первой волны эпидемии COVID-19 в Москве и Санкт-Петербурге (Рисунок 3).

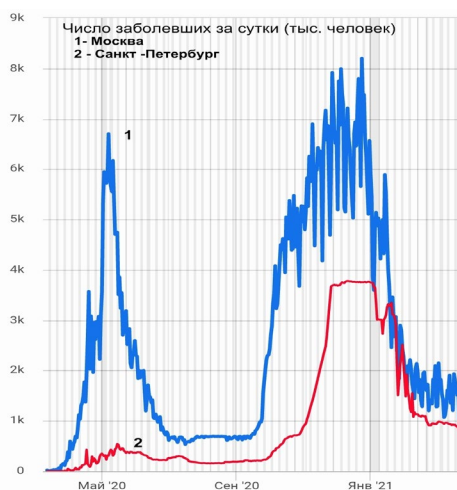


Рисунок 3
Число заболевших за сутки апрель 2020 – март 2021.
1- Москва, 2- Санкт-Петербург.



Рисунок 4
Заражений на 1 млн человек, Чехия
(сглаженное среднее за 7 дней).

Волны заболеваемости пандемии COVID-19 (и любой другой эпидемии) представляют собой реализацию классических нелинейных уравнений «хищник – жертва». В качестве хищника выступает вирус SARS-CoV-2, а человеческая популяция реализуется в качестве жертвы. В данное время наблюдается как конкуренция хищников (возникновение новых штаммов коронавируса), так и адаптивная и генетическая конкуренция жертв. Влияние факторов космической погоды прежде всего сказывается на управляющем коэффициенте хищников, а успехи медицины по борьбе с болезнью проявляются в управляющем факторе численности жертв. Медицинское вмешательство искусственно снижает естественную конкуренцию среди жертв. Процесс медицинской регуляции приводит к сильной «пятнистости» интенсивности заболеваемости (распространения хищника-вируса), в основном за счет усиления роли фундаментальных генетических различий в иммунных системах жертв. Введение национальных локдаунов и запретов на перемещение жертв также способствует возникновению сильной неравномерности в динамике заболеваемости и смертности в различных странах (см. решение уравнений Вольтера с запаздыванием и диссипацией, [7]). В предельном случае, при небольшой территории стран, находящихся в

длительном локдауне, вместо волн затухания возникают самоподдерживающиеся автоколебательные волны заболеваемости и смертности. Чехия является ярким примером трех автоколебательных волн локальной эпидемии в динамике второй общемировой волны пандемии COVID-19 (Рисунок 4).

Таким образом, роль космофизических факторов и локальных факторов внешней среды усиливается после искусственной медицинской ликвидации основного управляющего фактора естественной конкуренции жертв. Динамика солнечной активности и геомагнитного поля повышает эволюционную приспособленность человечества к следующим пандемиям, несмотря на активное медицинское и социальное вмешательство в эволюционные процессы.

Заключение. Пандемия COVID-19 происходит одновременно в минимуме 11-летнего и квази-столетнего цикла СА. Автор считает, что геногеографические особенности населения стали одним из существенных факторов, определяющих развитие локальных эпидемий COVID-19. Страны с наибольшим относительным числом смертей и тяжелых пациентов имеют население с доминантной гаплогруппой R1. Понимание геногеографических особенностей развития пандемии COVID-19 способствует грамотному распределению медицинских ресурсов по регионам, подбору персонала и оценке возможной тяжести протекания заболевания у пациентов.

В ближайшие 40 лет предполагается сохранение низкой солнечной активности с максимальным числом пятен не выше 100 [8]. В этих условиях можно ожидать двукратное увеличение числа пандемий (каждые 5-6 лет вместо 10-11 лет) с выраженными геногеографическими отличиями в развитии локальных эпидемий. Воздействие космической погоды способствует повышению variability адаптационных возможностей человеческой популяции в целом.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы 17 Президиума РАН «Эволюция органического мира и планетарных процессов».

Список литературы

1. М.В. Рагульская, В.Н. Обридко, Е.Г. Храмова. Галактические факторы, молодое Солнце, Земля и биофизика живых систем/ Биофизика, 2020, том 65, № 4, с. 804–817
2. Atri D., Melot A/ Cosmic rays and Terrestrial Life: a Brief Review. Astroparticle Physics, 2014, V. 53, pp. 186-90
3. М. В. Рагульская, Н. К. Белишева/ Космические лучи как фактор эволюционного отбора. Физика авроральных явлений, 2019, с 250-252
4. Ragulskaya M.V/ Space weather and COVID-19 pandemic genogeography. 2020, J Nov Physiother Phys Rehabil 7(1): 031-032
5. Austin Nguyen, Julianne K. David, Sean K. Maden, Mary A. Wood, Benjamin R. Weeder, Abhinav Nellore, Reid F. Thompson. Human leukocyte antigen susceptibility map for SARS-CoV 2/ JVI, 2020 - DOI: 10.1128/JVI.00510-20
6. Tekutskaya E.E., Baryshev M.G., Gusaruk L.R., Ilchenko G.P. Oxidative damage to DNA under the action of an alternating magnetic field / Biophysics, 2020, Vol. 65, No. 4, p. 564–568
7. Проблемы регуляции в биологических системах (под редакцией А. Б. Рубина). Издательство «РХД», 2007, 477 с
8. В. Ишков. Прогноз космической погоды/ Космические исследования, 2017, 55, № 6, 391-98

Сведения об авторе

Мария Валерьевна Рагульская

канд. физ-мат. наук, ст. науч. сотр. отдела
солнечной физики и солнечно-земных связей
Институт земного магнетизма и
распространения радиоволн РАН
Эл. почта: ra_mary@mail.ru
Москва, Россия

Information about author

Mariya Ragulskaya

Senior Researcher, Department of Solar Physics and
Solar-Terrestrial Relations, Institute of Terrestrial
Magnetism and Radio Wave Propagation RAS
E-mail: ra_mary@mail.ru
Moscow, Russia

УДК 57.05; 577.3; 616.9; 616-092
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.43

¹Нечипуренко Ю.Д., ²Семёнов Д.А., ³Лавриненко И.А.,
⁴Лагуткин Д.А., ⁵Генералов Е.А., ⁶Зайцева А.Ю.,
⁷Матвеева О.В., ⁸Егоров Е.Е.

¹Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН

²Институт биофизики СО РАН

³Воронежский государственный университет

⁴Московский физико-технический институт

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

⁶Институт аналитического приборостроения РАН

⁷Сендай Вириалитикс

⁸Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН

ПАТОГЕНЕЗ COVID-19: РОЛЬ АЦИДОЗА

В статье рассмотрен ряд положительных обратных связей между повреждающими факторами COVID-19 и ацидозом. Показано взаимовлияние гипоксии и ацидоза. В частности, в соответствии с эффектом Вериге-Бора снижение рН крови приводит к падению сатурации и способствует дальнейшему развитию ацидоза.

Ключевые слова: SARS-Cov-2, COVID-19, ацидоз, сатурация, гемоглобин, эффект Вериге-Бора, положительная обратная связь, триггерные явления.

¹Nechipurenko Yu.D., ²Semyonov D.A., ³Lavrinenko I.A.,
⁴Lagutkin D.A., ⁵Generalov E.A., ⁶Zaitceva A.Yu.,
⁷Matveeva O.V., ⁸Yegorov Ye.E.

¹Engelhardt Institute Molecular Biology RAS

²Institute of Biophysics Siberian Branch RAS

³Voronezh State University

⁴Moscow Institute of Physics and Technology

⁵Lomonosov Moscow State University

⁶Institute for Analytical Instrumentation RAS

⁷Sendai Viralytics LLC

⁸Engelhardt Institute Molecular Biology RAS

PATHOGENESIS OF COVID-19: THE ROLE OF ACIDOSIS

The article considers a number of positive feedbacks between the damaging factors of COVID-19 and acidosis. The interaction of hypoxia and acidosis is shown. In particular, in accordance with the Bohr effect, a decrease in blood pH leads to a drop in saturation and contributes to the further development of acidosis.

Keywords: SARS-Cov-2, COVID-19, acidosis, saturation, Bohr effect, positive feedback, trigger phenomena.

Введение

Одним из важнейших условий адаптации и выживания организма является поддержание кислотно-щелочного равновесия внутренней среды. В процессах метаболизма постоянно образуется избыток кислот, которые могут быть удалены из организма при помощи лёгких (углекислый газ уходит с дыханием) и почек (протоны экскретируются в мочу). Изменения рН крови сглаживаются за счет нескольких буферных систем: гемоглобиновой, бикарбонатной, фосфатной и белков плазмы крови. Буферные системы обладают ёмкостью, что позволяет создать определенный «запас прочности», при котором рН остается постоянным.

В последнее время в ряде работ приведены свидетельства того, что при тяжелом течении COVID-19 у пациентов часто встречается ацидоз и описаны причины его возникновения, связанные со спецификой поражения организма вирусом SARS-Cov-2 (см., напр., [1-3]).

Группа риска тяжелого течения пневмонии при COVID-19 объединяет людей старше 65 лет, пациентов с диабетом, сердечно-сосудистыми заболеваниями, ожирением, деменцией, онкологическими заболеваниями, хронической обструктивной болезнью лёгких, хронической болезнью почек и беременностью [4-7]. При всех этих состояниях, в том числе в силу побочных эффектов принимаемых препаратов, организм испытывает гипоксию и метаболический ацидоз. В целом метаболический ацидоз проявляется в форме лактацидоза, кетоацидоза, и реже связан с потерей оснований [8, 9]. Чаще всего основным метаболитом, характеризующим степень метаболического ацидоза, является лактат [10].

Цель работы

Целью данной работы является рассмотрение механизмов и последствий возникновения ацидоза при COVID-19, которые могут приводить к отягощению течения болезни и системное описание пороговых изменений, ухудшающих состояние пациентов скачкообразно, благодаря наличию положительных обратных связей.

Полученные результаты

Любое развившееся воспаление способствует росту ацидоза, особенно локального.

Во-первых, при повреждении мелких сосудов возникает гипоксия и возрастает метаболическая активность инфильтрирующих лейкоцитов, в которых в результате этого происходит сдвиг в сторону гликолитического метаболизма, ведущий к накоплению лактата [11].

Во-вторых, в процессе окислительного взрыва происходит массовая продукция протонов нейтрофилами и рост закисления [12].

Можно выделить по меньшей мере три причины нарушения газообмена при COVID-19.

1. Воздействие вируса приводит к гибели альвеолоцитов 2 типа, что нарушает структуру альвеол, в результате чего альвеолы могут коллапсировать и выключаться из газообмена. Этому способствует уменьшение продукции сурфактанта альвеолоцитами, что ведет к изменению поверхностного натяжения. В следствии этого изменения давления воздуха в легких не приводят к сжатию и растяжению альвеолярных пузырьков, возрастает «мертвый» объем и, таким образом, снижается газообмен.

2. Тромбирование легочных капилляров приводит к нарушению трофики легкого и ограничивает диффузию кислорода в эритроциты.

3. Интенсивный выход внеклеточного матрикса, богатого гиалуроновой кислотой призван «заклеивать» области обширного повреждения легких, чтобы не допустить их общего коллапса.

Следует отметить пороговый характер этих явлений: образование гидрогеля гиалуроновой кислоты и снижение продукции сурфактанта качественно меняют газообмен в легких. Локально в некотором участке легкого развивается гипоксия и респираторный ацидоз. Для восстановления повреждений в лёгких организму требуется длительное время и значительные ресурсы.

Локальная концентрация кислорода, необходимая для поддержания нормального метаболизма клеток периферических тканей, связана со значением рН в этих тканях. Кривая насыщения гемоглобина кислородом имеет S-образный вид. По мере роста парциального давления кислорода в крови его связывание вначале практически не меняется до некоторого граничного значения (1-ая точка перегиба), потом резко возрастает – и выходит на плато по насыщению (2-ая точка перегиба) [13] (см. рис. 1).

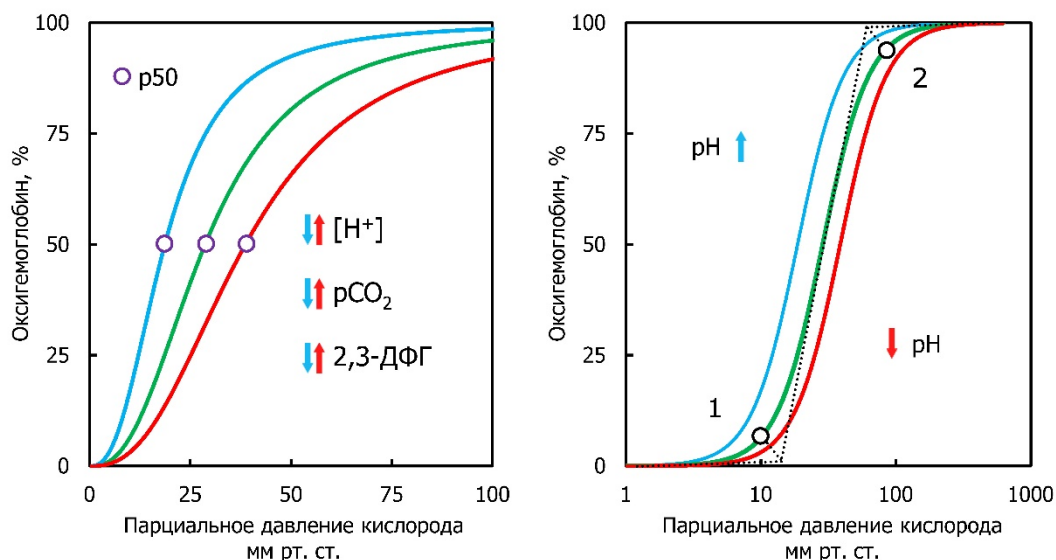


Рис. 1. Различные факторы, влияющие на насыщение гемоглобина кислородом, и, как следствие на сатурацию.

Концентрация 2,3-дифосфоглицерата существенно влияет на насыщение гемоглобина кислородом, наряду с давлением CO_2 . Обозначения: $[\text{H}^+]$ – концентрация протонов, pH – кислотность раствора, $p\text{CO}_2$ – парциальное давление углекислого газа, 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат, p50 – величина полунасыщения гемоглобина кислородом.

Интенсивный обмен веществ приводит к снижению pH, и гемоглобин легче отдает O_2 , связывая при этом избыток протонов. В целом так обеспечивается транспорт кислорода от лёгких к тканям, а углекислоты (в основном, в форме гидрокарбоната) – в обратном направлении. Эта система регуляции метаболизма с отрицательной обратной связью основана на кооперативном pH-зависимом изменении конформации гемоглобина и более 100 лет известна как эффект Вериги-Бора (именуемый в англоязычной литературе как «эффект Бора») [14-17].

Даже незначительное отклонение кислотности крови от физиологической нормы способно существенным образом изменить способность гемоглобина связывать кислород. Следует подчеркнуть, что эффект Вериги-Бора является ключевым элементом регуляции газообмена. Понижение pH в плазме крови в лёгких с 7.4 до 7.2 приводит примерно к двукратному сокращению количества O_2 , которое способна связать кровь (при парциальном давлении кислорода в тканевой жидкости 20–40 мм рт. ст.). Поэтому при оксигенации организму критически важно поддерживать оптимальное значение pH в плазме крови альвеолярных капилляров.

Метаболический ацидоз вызывает учащенное дыхание и снижение концентрации углекислого газа в лёгких (гипокапнию). Когда химические раздражения, соответствующие гипоксии и гиперкапнии, распознаются хеморецепторами, в дыхательном центре головного мозга повышается поток импульсов к респираторным мотонейронам, что вызывает повышение вентиляции. Артериальная гипокапния, наоборот вызывает уменьшение вентиляции [18]. При заражении лёгких вирусом SARS-CoV-2 нарушение в выведении CO_2 через выдыхаемый воздух, связанное с поражением лёгких приводят к стимуляции гипервентиляции и попытке снизить концентрацию CO_2 . Если альвеолярная вентиляция недостаточна для элиминации CO_2 , продуцируемой в организме, происходит гиперкапнический сдвиг, давление двуокиси углерода повышается [18, 19]. Если снижение сатурации уже произошло, то это означает, что компенсаторные возможности организма по регуляции ацидоза исчерпаны [20]. Видимо, зачастую это и происходит при инфекции SARS-CoV-2, поскольку падение сатурации является характерной особенностью тяжелого течения COVID-19.

Помимо поражения альвеолоцитов, в патогенезе COVID-19 имеет место поражение клеток эндотелия. Последующая дисфункция эндотелия приводит к вазоконстрикции, провоспалительным явлениям и переходу микроокружения в прокоагулянтное состояние [21]. Миграция моноцитов к пораженному эндотелию индуцирует активацию каскадов свертывания и агрегацию тромбоцитов, в результате чего может развиваться ДВС-синдром [22, 23]. COVID-ассоциированный ДВС-синдром приводит как к тромбозам, так и к кровоизлияниям – этот парадокс обусловлен сменой фаз гиперкоагуляции и интенсивного фибринолиза, происходящей в результате нарушения регуляции свертывания [24].

Гиперкоагуляция провоцирует микротромбоз в периферических сосудах как лёгких, так и других органов. В большинстве тканей организма тромбы создают острую гипоксию и значительно увеличивают выработку лактата, а в лёгких они также способны нарушать газообмен. Выработку лактата локально повышает и миграция активированных нейтрофилов и моноцитов к очагу поражения эндотелия.

Известно, что вирус SARS-CoV-2 способен поражать кишечник, так как там в большом количестве присутствуют клетки с рецептором ACE2, который подвергается атаке со стороны вируса [25]. Иногда болезнь сопровождается расстройством кишечника и это ассоциировано с дальнейшим тяжелым течением болезни [26]. В связи с этим следует отметить, что диарея приводит к резкой и значительной потере бикарбонатов. Истощение бикарбонатного буфера приводит к тому, что организм не может сдерживать развивающийся ацидоз.

Для пациентов с COVID-19 повышение концентрации лактата выше 2 ммоль/л связано с увеличением вероятности летального исхода. Исчерпав углеводные депо, организм может пойти по пути синтеза углеводов из аминокислот, что приведет к необходимости нейтрализации и удаления продуктов азотного обмена (аммиака и мочевины), увеличит нагрузку на почки.

Необходимо обратить внимание на наличие двух порогов: при концентрации лактата выше 2 ммоль/л отключается липолиз, при 4 ммоль/л организм не в состоянии длительное время поддерживать в равновесии синтез и утилизацию лактата [27, 28].

Показано, что умеренный ацидоз, в том числе вызванный повышенной концентрацией лактата, вызывает обратимое снижение свертываемости крови [29, 30]. Локальное снижение pH и истощение факторов свертывания, по-видимому, приводит к антикоагуляционным эффектам, внося таким образом вклад в переключение гиперкоагуляции в интенсивный фибринолиз, который затем снова переходит в компенсаторную коагуляцию [31]. Декомпенсация на одном из этих этапов приводит к критическому состоянию, отражаемому в показателях коагуляционных тестов [24, 31]. По всей видимости, способность организма компенсировать ацидоз является одним из важных факторов, определяющих устойчивость к смене фаз коагуляции и фибринолиза. Повышенная концентрация лактата является предиктором злокачественного течения ДВС-синдрома и легочной эмболии [32-34].

Хотя все перечисленные триггеры, приближающие наступление ацидоза, могут быть значимы и при других заболеваниях, но их сочетание в одном заболевании выглядит уникальным явлением. Необходимо подчеркнуть, что гипоксия и ацидоз позволяют привести вклад всех указанных механизмов к одному «общему знаменателю». В конечном счёте, ацидоз с одной стороны, является следствием падения сатурации, а с другой стороны, является её причиной и способствует дыхательной недостаточности.

На рис. 2 показана система прямых и обратных связей, возникающая в организме при тяжелом течении болезни и развитии ацидоза.

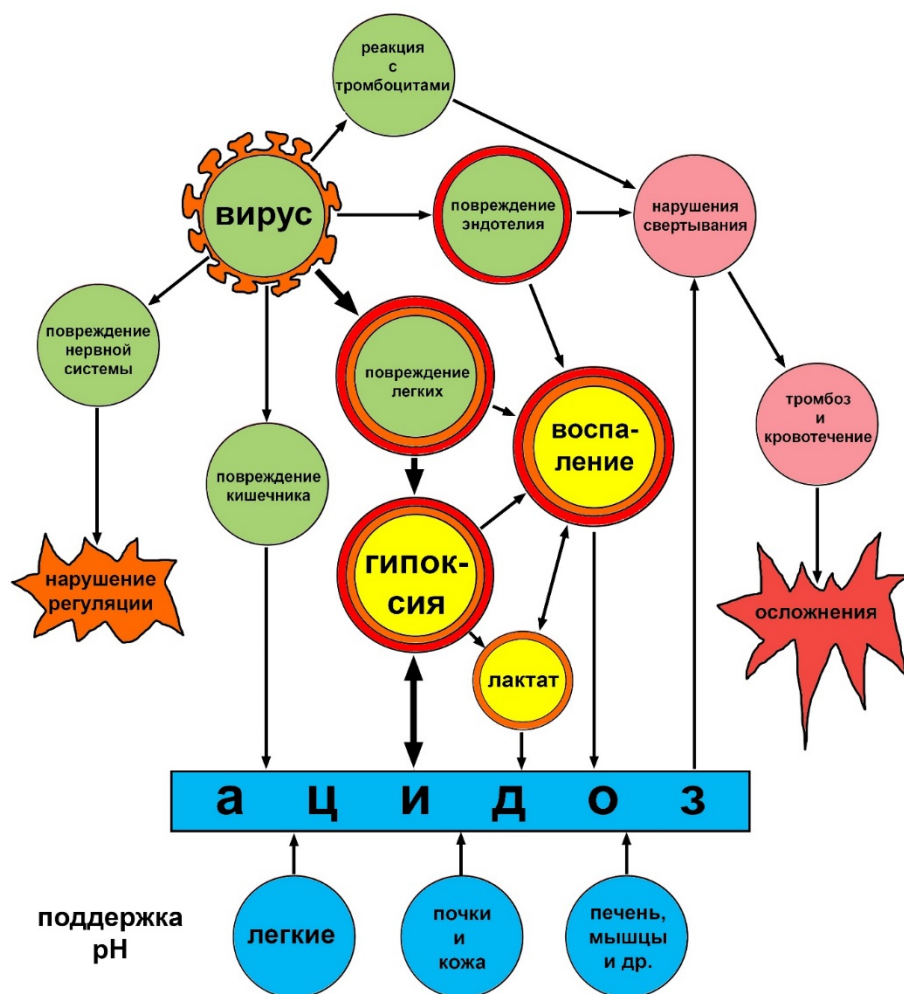


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая систему прямых и обратных связей в патогенезе COVID-19.

Наиболее распространенный вариант тяжелого течения COVID-19 наблюдается, когда после повреждения альвеоцитов, начинается повреждение эндотелия легких, что ведет к развитию гипоксии, которая приводит к ацидозу посредством двух основных механизмов: во-первых, концентрации лактата нарастает из-за интенсификации анаэробного гликолиза и во-вторых, выведение углекислого газа из организма затрудняется вследствие повреждения легких. Развивается ацидоз, который влияет на многие базовые процессы (в том числе систему свертывания крови). Локальные изменения не совпадают с общими и происходит дерегуляция свертывающей системы. Противостоят ацидозу могут почки (посредством удаления нелетучих кислот и прямой экскреция протонов). Сопутствующие нарушения почек резко утяжеляют процесс. При наличии достаточного снабжения кислородом, ряд органов (печень, мышцы и почки) способны противостоят ацидозу за счет изъятия лактата из циркуляции. При этом могут происходить два процесса: глюконеогенез (включение цикла Кори), либо окислительный метаболизм лактата, состоящий в митохондриальном превращении в пируват и далее в оксалоацетат и в цикл Кребса. Однако, повреждение легких тормозит эти процессы.

Менее типично развивается кишечная форма COVID-19. Поскольку в эпителии кишечника расположено большинство рецепторов для вируса, то априорно, можно было бы ожидать, что инфекция будет развиваться преимущественно в кишечнике. Вероятно, в силу приоритета воздушно-капельной передачи инфекции, кишечная форма развивается редко. При этом в силу диареи, происходит большая потеря электролитов, что снижает устойчивость организма к ацидозу.

Во многих случаях инфекции COVID-19 наблюдают поражение нервной системы. Это сопровождается потерей обоняния, изменениями вкуса и, в редких случаях, наблюдают изменения нервной регуляции (счастливая гипоксия), которые могут привести к дальнейшему развитию гипоксии и ацидоза и, связанной с этим, дегенерацией нервной системы.

Важно заметить, что к изменениям pH чувствителен наиболее распространенный антиген вируса – шиповидный S-белок, являющийся мишенью защитных антител. Существуют прямые экспериментальные данные, указывающие на снижение аффинности антител к S-белку при понижении pH [35]. Хотя в плазме крови в лёгких pH меняется в диапазоне 7.2–7.6, но локально в пораженной вирусом части лёгкого может быть тромб, нарушение циркуляции крови, затрудненный газообмен. Локальный ацидоз может приводить к концентрации лактата 40 ммоль/л в поврежденной ткани и приводить к значительному смещению pH в очаге воспаления. Заметим, что ранее была высказана гипотеза о том, что изменение конформации S-белка может приводить к ускользанию вируса от иммунного ответа [36, 37]. Следует также отметить работу Летарова и др., где высказано предположение, что высвобождаемые в результате спонтанного срабатывания шипов вируса S1 частицы могут связываться с рецепторами и вызывать снижение представленности ACE2 на неинфицированных клетках, что может приводить к локальному дисбалансу ренин-ангиотензиновой системы и еще большей активации тромбоза в патогенезе COVID-19 [38].

Выводы

Мы рассмотрели несколько механизмов влияния гипоксии и ацидоза на развитие тяжелого течения COVID-19. Эти механизмы имеют триггерный, ступенчатый характер действия с выраженными положительными обратными связями. Падение сатурации крови кислородом вследствие понижения pH крови в соответствии с эффектом Веригго-Бора, является характерной особенностью тяжелого течения болезни, вызванной SARS-CoV2. Такое падение является следствием истощения компенсаторных возможностей организма по регуляции ацидоза. Болезнь COVID-19 имеет системный характер поражения органов и тканей: здесь и ДВС-синдром, и пневмония, и поражение нервной системы. Эта болезнь приводит к множеству разнообразных осложнений, она как бы проверяет организм на наличие «слабых мест» и контуров регуляции, которые имеют малую устойчивость.

Мы полагаем, что для предотвращения тяжелых случаев COVID-19 следует уделять повышенное внимание диагностике и возможному купированию ацидоза. Данная работа является частью более полного исследования, в котором рассматриваются различные аспекты системного поражения организма при COVID-19, связанные с ацидозом (Nechipurenko *et al.*, *in press*).

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые в системе рассмотрены поражающие факторы болезни COVID-19, связанные с ацидозом. Показано, что стабилизирующие систему поддержания уровня pH в организме отрицательные обратные связи, охватывающие различные уровни структурной и функциональной организации при COVID-19 могут дать сбой. В частности, регуляция по типу отрицательной обратной связи, обусловленная эффектом Веригго-Бора, может претерпеть изменения и привести к разрегуляции по типу положительной обратной связи, когда «точкой разгрузки» гемоглобина кислородом становится не «конечная точка пути» – периферические ткани, а промежуточный участок транспортировки кислорода от лёгких к тканям (возможно, даже поражённые участки лёгких, где протекает воспалительный процесс).

Благодарности

Авторы считают своим долгом выразить благодарность за полезные обсуждения Андрею Викторовичу Летарову, Роберту Валентиновичу Полозову, Дмитрию Вячеславовичу Мазурову, а также Андрею Борисовичу Рубину и Галине Юрьевне Ризниченко, руководителям семинара кафедры биофизики Биологического факультета МГУ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (темы №01201363818 и № 01201363820) и также гранта Президиума РАН по Молекулярной и клеточной биологии, а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фундаментальные и прикладные исследования космоса» МГУ имени М.В. Ломоносова.

Цитируемая литература

1. *Chhetri S., Khamis F., Pandak N., Al Khalili H., Said E., Petersen E.* A fatal case of COVID-19 due to metabolic acidosis following dysregulate inflammatory response (cytokine storm) // *IDCases*. – 2020. – Vol. 21. – P. e00829.

2. *Shevel E.* Conditions Favoring Increased COVID-19 Morbidity and Mortality: Their Common Denominator and Treatment // *Isr Med Assoc J*. – 2020. – Vol. 11, № 22. – P. 680.

3. *Лодягин А.Н., Бытоцыренов Б.В., Шикалова И.А., Вознюк И.А.* Ацидоз и токсический гемолиз – цели патогенетического лечения полиорганной патологии при COVID-19 // *Вестник восстановительной медицины*. – 2020. – №. 3. – С. 25–30.

4. *Andersen L.W., Mackenhauer J., Roberts J.C., Berg K.M., Cocchi M.N., Donnino M.W.* Etiology and therapeutic approach to elevated lactate levels // *Mayo Clin Proc*. – 2013. – Vol. 88, № 10. – P. 1127–1140.

5. *Newington J.T., Harris R.A., Cumming R.C.* Reevaluating Metabolism in Alzheimer's Disease from the Perspective of the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle Model // *J Neurodegener Dis*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 234572.

6. *Kraut J.A., Madias N.E.* Lactic acidosis // *N Engl J Med*. – 2014. – Vol. 371, № 24. – P. 2309–2319.

7. *Ma L.N., Huang X.B., Muyayalo K.P., Mor G., Liao A.H.* Lactic Acid: A Novel Signaling Molecule in Early Pregnancy? // *Front Immunol*. – 2020. – Vol. 11. – P. 279.

8. *Chycki J., Kurylas A., Maszczyk A., Golas A., Zajac A.* Alkaline water improves exercise-induced metabolic acidosis and enhances anaerobic exercise performance in combat sport athletes // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13, № 11. – P. e0205708.

9. *Pillai S., Davies G., Lawrence M., Whitley J., Stephens J., Williams P.R., Morris K., Evans P. A.* The effect of diabetic ketoacidosis (DKA) and its treatment on clot microstructure: Are they thrombogenic? // *Clin Hemorheol Microcirc*. – 2021. – Vol. 77, № 2. – P. 183–194.

10. *Kraut J.A. and Madias N.E.* Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management // *Nat Rev Nephrol*. – 2010. – Vol. 6, № 5. – P. 274–285.

11. *Lunt S.Y., Vander Heiden M G.* Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation // *Annu Rev Cell Dev Biol*. – 2011. – Vol. 27. – P. 441–464.

12. *Borregaard N., Schwartz JH., Tauber A.I.* Proton secretion by stimulated neutrophils. Significance of hexose monophosphate shunt activity as source of electrons and protons for the respiratory burst // *J Clin Invest*. – 1984. – Vol. 74, № 2. – P. 455–459.

13. *Popel A.S.* Theory of oxygen transport to tissue // *Crit Rev Biomed Eng*. – 1989. – Vol. 17, № 3. – P. 257–321.

14. *Ahmed M.H., Ghatge M.S., Safo M.K.* Hemoglobin: Structure, Function and Allostery // *Subcell Biochem*. – 2020. – Vol. 94. – P. 345–382.

15. *Gell D.A.* Structure and function of haemoglobins // *Blood Cells Mol Dis*. – 2018. – Vol. 70. – P. 13–42.

16. *Werigo B.* Zur Frage über die Wirkung des Sauerstoffs auf die Kohlensäureausscheidung in den Lungen // Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere. – 1892. – Vol. 51, № 6. – P. 321–361.
17. *Bohr C., Hasselbalch K., Krogh A.* Concerning a biologically important relationship—the influence of the carbon dioxide content of blood on its oxygen binding // Skand. Arch. Physiol. – 1904. – Vol. 16. – P. 401–412.
18. *Кисляков Ю.Я. и Бреслав И.С.* Дыхание, динамика газов и работоспособность при гипербарии. АН СССР, Ин-т физиологии им. И. П. Павлова. – Л. : Наука : Ленингр. отд., 1988.
19. *Кисляков Ю.Я.* Механизмы транспорта O₂ в системе микроциркуляции // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. 1987. № 5. С. 569.
20. *Зайцева А.Ю., Кисляков Ю.Я., Мазинг М.С., Давыдов В.В.* Применение неинвазивной оптической обучаемой диагностической системы и математических методов анализа многомерных данных для оценки кислородного статуса тканей человека. // Научное приборостроение. 2020. Том 30. № 4, С. 113–118.
21. *Mosleh W., Chen K., Pfau S. E., Vashist A.* Endotheliitis and Endothelial Dysfunction in Patients with COVID-19: Its Role in Thrombosis and Adverse Outcomes // J Clin Med. – 2020. – Vol. 9, № 6.
22. *Hottz E.D., Azevedo-Quintanilha I.G., Palhinha L., Teixeira L., Barreto E.A., Pao C.R.R., Righy C., Franco S., Souza T.M.L., Kurtz P., Bozza F A., Bozza P.T.* Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19 // Blood. – 2020. – Vol. 136, № 11. – P. 1330–1341.
23. *Iba T., Levy J. H., Levi M., Thachil J.* Coagulopathy in COVID-19 // J Thromb Haemost. – 2020. – Vol. 18, № 9. – P. 2103–2109.
24. *Asakura H., Ogawa H.* COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation // Int J Hematol. – 2021. – Vol. 113, № 1. – P. 45–57.
25. *Xu J., Chu M., Zhong F., Tan X., Tang G., Mai J., Lai N., Guan C., Liang Y., Liao G.* Digestive symptoms of COVID-19 and expression of ACE2 in digestive tract organs // Cell Death Discov. – 2020. – Vol. 6. – P. 76.
26. *D'Amico F., Baumgart D.C., Danese S., Peyrin-Biroulet L.* Diarrhea During COVID-19 Infection: Pathogenesis, Epidemiology, Prevention, and Management // Clin Gastroenterol Hepatol. – 2020. – Vol. 18, № 8. – P. 1663–1672.
27. *Hogan M.C.* What Wasserman wrought: a celebratory review of 50 years of research arising from the concept of an 'anaerobic threshold' // J Physiol. – 2021. – Vol. 599, № 4. – P. 1005.
28. *Poole D.C., Rossiter H.B., Brooks G.A., Gladden L.B.* The anaerobic threshold: 50+ years of controversy // J Physiol. – 2021. – Vol. 599, № 3. – P. 737–767.
29. *Engstrom M., Schott U., Nordstrom C.H., Romner B., Reinstrup P.* Increased lactate levels impair the coagulation system—a potential contributing factor to progressive hemorrhage after traumatic brain injury // J Neurosurg Anesthesiol. – 2006. – Vol. 18, № 3. – P. 200–204.
30. *Engstrom M., Schott U., Romner B., Reinstrup P.* Acidosis impairs the coagulation: A thromboelastographic study // J Trauma. – 2006. – Vol. 61, № 3. – P. 624–628.
31. *Tang N., Li D., Wang X., Sun Z.* Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia // J Thromb Haemost. – 2020. – Vol. 18, № 4. – P. 844–847.
32. *Kobayashi S., Gando S., Morimoto Y., Nanzaki S., Kemmotsu O.* Serial measurement of arterial lactate concentrations as a prognostic indicator in relation to the incidence of disseminated intravascular coagulation in patients with systemic inflammatory response syndrome // Surg Today. – 2001. – Vol. 31, № 10. – P. 853–859.
33. *Vanni S., Jimenez D., Nazerian P., Morello F., Parisi M., Daghini E., Pratesi M., Lopez R., Bedate P., Lobo J.L., Jara-Palomares L., Portillo A.K., Grifoni S.* Short-term clinical

outcome of normotensive patients with acute PE and high plasma lactate // *Thorax*. – 2015. – Vol. 70, № 4. – P. 333–338.

34. *Zabczyk M., Natorska J., Janion-Sadowska A., Malinowski K.P., Janion M., Undas A.* Elevated Lactate Levels in Acute Pulmonary Embolism Are Associated with Prothrombotic Fibrin Clot Properties: Contribution of NETs Formation // *J Clin Med*. – 2020. – Vol. 9, № 4.

35. *Zhou T., Tsybovsky Y., Gorman J., Rapp M., Cerutti G., Chuang G.Y., Katsamba P.S., Sampson J.M., Schön A., Bimela J., Boyington J.C., Nazzari A., Olia A.S., Shi W., Sastry M., Stephens T., Stuckey J., Teng I.T., Wang P., Wang S., Zhang B., Friesner R.A., Ho D.D., Mascola J.R., Shapiro L., Kwong P.D.* Cryo-EM Structures of SARS-CoV-2 Spike without and with ACE2 Reveal a pH-Dependent Switch to Mediate Endosomal Positioning of Receptor-Binding Domains // *Cell Host Microbe*. – 2020. – Vol. 28, № 6. – P. 867–879 e5.

36. *Нечипуренко Ю.Д., Анашкина А.А., Матвеева О.В.* Изменение антигенных детерминант S-белка вируса SARS-CoV-2 как возможная причина антителозависимого усиления инфекции и цитокинового шторма // *Биофизика*. – 2020. – Том 65. – С. 824–832.

37. *Зайчук Т.А., Нечипуренко Ю.Д., Аджубей А.А., Оникиенко С.Б., Черешнев В.А., Зайнутдинов С.С., Кочнева Г.В., Нетесов С.В., Матвеева О.В.* Проблемы создания вакцин против бетакоронавирусов: антителозависимое усиление инфекции и вирус Сендай как возможный вакцинный вектор // *Молекулярная биология*. – 2020. – Том 54. – №. 6. – С. 922–938.

38. *Летаров А.В., Бабенко В.В., Куликов Е.Е.* Свободные S1-субъединицы белка шипов вируса SARS-CoV-2 могут действовать в качестве фактора патогенеза COVID-19 // *Биохимия*. – 2021. – Том 86. – №. 3. – С. 451–456.

Сведения об авторах

Юрий Дмитриевич Нечипуренко

д.ф.-м.н., вед. науч. сотр.
Эл. почта: nech99@mail.ru
Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН
Москва, Россия

Денис Александрович Семёнов

к.б.н., науч. сотр.
Эл. почта: dasem@mail.ru
Красноярск, Россия

Игорь Андреевич Лавриненко

к.б.н., доц.
E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru
Воронежский государственный университет
Воронеж, Россия

Денис Анатольевич Лагуткин

аспирант
E-mail: lagutkin.da@phystech.edu
Московский физико-технический институт
Московская область, Россия

Евгений Александрович Генералов

к.ф.-м.н., ст. науч. сотр.
E-mail: generals1179@gmail.com
МГУ им. М.В. Ломоносова
Москва, Россия

Анна Юрьевна Зайцева

к.ф.-м.н., ст. науч. сотр.
E-mail: anna@da-24.ru
Институт аналитического приборостроения РАН
Санкт-Петербург, Россия

Ольга Вячеславовна Матвеева

основатель

Information about authors

Yury Dmitrievich Nechipurenko

Leading Researcher
Эл. почта: nech99@mail.ru
Engelhardt Institute Molecular Biology RAS
Moscow, Russia

Denis Aleksandrovich Semyonov

Research Associate
Эл. почта: dasem@mail.ru
Institute of Biophysics Siberian Branch RAS
Krasnoyarsk, Russia

Igor Andreevich Lavrinenko

Professor Associate
E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru
Voronezh State University
Voronezh, Russia

Denis Anatolievich Lagutkin

Ph.D. Student
E-mail: lagutkin.da@phystech.edu
Moscow Institute of Physics and Technology
Moscow region, Russia

Evgenii Aleksandrovich Generalov

Senior Researcher
E-mail: generals1179@gmail.com
Lomonosov Moscow State University
Moscow, Russia

Anna Yurevna Zaitceva

Senior Researcher
E-mail: anna@da-24.ru
Institute for Analytical Instrumentation RAS
St. Petersburg, Russia

Olga Vyacheslavovna Matveeva

founder of Sendai Viralytics

E-mail: olga.matveeva@gmail.com

Сендай Вириалитикс

Массачусетс, США

Егор Евгеньевич Егоров

Д-р биол. наук, проф., вед. науч. сотр.

E-mail: yegorov58@gmail.com

Москва, Россия

E-mail: olga.matveeva@gmail.com

Sendai Viralytics LLC

Massachusetts, USA

Yegor Evgenievich Yegorov

Leading Researcher

E-mail: yegorov58@gmail.com

Engelhardt Institute Molecular Biology RAS

Moscow, Russia

УДК 57577.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.44

¹Космачевская О.В., ²Новикова Н.Н., ¹Топунов А.Ф.

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха,

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

²НИЦ "Курчатовский институт"

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МЕТАЛЛ-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЦЕНТРЫ В БЕЛКАХ: ПОВРЕЖДЕНИЕ ИЛИ ЗАЩИТА?

Рассматривается проблема формирования дополнительных центров связывания металлов в белках в условиях повышенного образования реакционно-активных соединений. В некоторых случаях формирование комплекса металла с посттрансляционно измененным белком является способом настройки его активности и стабильности.

Ключевые слова: белки, гемоглобин, металл-связывающие центры, железо, цинк, тиолы, активные формы кислорода

¹Kosmachevskaya O.V., ²Novikova N.N., ¹Topunov A.F.

¹Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the RASciences

²National Research Center "Kurchatov Institute"

ADDITIONAL METAL-BINDING CENTERS IN PROTEINS: DAMAGE OR PROTECTION?

The problem of the formation of additional metal-binding centers in proteins under conditions of increased production of reactive species is considered. In some cases, the formation of a complex of a metal with a post-translationally altered protein is a modulation mechanism its activity and stability.

Keywords: proteins, hemoglobin, metal-binding centers, iron, zinc, thiols, reactive oxygen species.

Введение

Роль ионов переходных металлов в биохимии белков разнообразна. Они входят в состав активного центра, способствуют формированию правильной укладки, участвуют в образовании сложных белков типа липопротеидов и нуклеопротеидов, стабилизируют структуру мультисубъединичных белков. Металлы участвуют в катализе, транспорте газов, переносе электронов, детекции редокс-условий. Во всех случаях связывание металлов осуществляется по генетически запрограммированным сайтам. Однако многие белки в стрессовых условиях обнаруживают дополнительные центры связывания металлов, которые называют абберантными (aberrant) или нетипичными (abnormal). Такое дополнительное связывание влияет на физико-химические свойства и активность белков и может способствовать формированию труднообмениваемых белковых агрегатов, в которых металлы действуют как «сшивающие» (cross-linking) агенты. Накопление стабильных нефункциональных белковых агрегатов провоцирует развитие болезней аномальной полимеризации: прионные заболевания, болезни Альцгеймера, Хантингтона и др. Известна

роль aberrантного взаимодействия белков с металлами в развитии диабета, атеросклероза, хронической почечной недостаточности, хронической обструктивной болезни легких, нейродегенеративных заболеваний и нарушений обмена. Во всех случаях происходит повышенное образование реакционно-активных молекул: активных форм кислорода и азота и карбонильных соединений, которые могут спонтанно реагировать с белками, приводя к посттрансляционным модификациям, а образовавшиеся химические группы будут выступать в качестве лигандов для связывания ионов металлов.

Дополнительные центры связывания металлов могут возникать и вследствие демаскировки аминокислотных остатков при изменении конформации белка. При слабом и обратимом повреждении белок может переходить в подобное нативному состоянию «расплавленной глобулы» с доступными дополнительными центрами связывания металлов. Мы полагаем, что в некоторых случаях связывание металлов с этими центрами стабилизирует измененную конформацию белка, а также наделяет его новыми функциональными возможностями. При таком сценарии появление дополнительных металлсвязывающих центров можно рассматривать как реакцию белка на изменившиеся условия. Особое внимание должно быть уделено роли SH-групп цистеина в формировании дополнительных центров связывания металлов, поскольку эти группы являются основной мишенью действия «активных форм».

Появление дополнительных металлсвязывающих центров в белках обычно рассматривают как признак или причину развития патологического процесса. Такой односторонний подход не позволяет получить целостную картину явления, оставляя без внимания случаи, когда образование комплексов металла с измененным белком является способом настройки свойств белка, его активности и стабильности.

1. Связывание белками металлов - реакция на повреждение

Образование дополнительных центров связывания металлов является одним из проявлений общих неспецифических изменений, происходящих при повреждении белков. Еще в 1980-е гг. Д.Н. Насонов и В.Я. Александров сформулировали денатурационную теорию повреждения и возбуждения [1]. Они предположили, что при действии на клетки повреждающих агентов белки цитоплазмы претерпевают изменения, сходные с теми, которые происходят при их переходе в денатурированное или частично денатурированное состояние. Происходит разрыхление молекулы, активация аминных, карбоксильных и сульфгидрильных групп, экспонирование неполярных участков, увеличением объема и снижение гидратированности [1]. Следствием может быть коагуляция, снижение дисперсности раствора, усиление сорбции красителей и образование дополнительных центров связывания металлов.

Общность изменений белков при действии физиологических и повреждающих агентов объясняется тем, что изменение структуры молекулы на начальных стадиях происходит сходными путями, через одни и те же промежуточные состояния. Это может быть состояние расплавленной глобулы, которое показано для многих белков при переходе из нативного в денатурированное состояние [2]. Переход в состояние расплавленной глобулы вызывают изменение pH, умеренные концентрации денатураторов и некоторых солей, а также тепловые воздействия [2]. Для гемоглобина и миоглобина это состояние обнаружено при разворачивании и фолдинге [3, 4].

В белках наиболее предпочтительными для связывания цинка и железа являются остатки цистеина, константа связывания с которыми на 4-5 порядков выше, чем с атомом азота имидазола гистидина. В координации металлов участвуют активированные тиолы, образующиеся при действии активных форм кислорода на белок. При умеренном окислительном стрессе окисление цистеина происходит через образование тиолят-аниона (Cys-S^-), который окисляется до сульфеновой кислоты (Cys-SOH). Цистеинсульфеновая кислота быстро претерпевает необратимое окисление до дисульфидов (Cys-SS-Cys), сульффиновых ($\text{Cys-SO}_2\text{H}$) и сульфоновых кислот ($\text{Cys-SO}_3\text{H}$) [5]. Высокореакционный

Cys-SOH в белке может стабилизироваться гидрофобным микроокружением и водородными связями. Эти активные формы тиолов являются предпочтительными лигандами для связывания металлов. Так, тиолят-анион обладает высокой металлсвязывающей способностью, ~в 20 раз превышающей протонированную форму (Cys-SH) [6]. Цистеинсульфеновая кислота также может связывать металлы с образованием металл-сульфенатных центров [7-11], однако из-за высокой реактивности и нестабильности эти центры мало распространены в биологии. Показано, что цистеинсульфенат координирует ионы Fe в нитрилгидратазе [12] и в N-синтазе изопенициллина [8]. Высказывалась точка зрения, что окисленные формы цистеина стабилизируют редокс-активные металлы в металлсвязывающем центре, подавляя их потенциальную токсичность [6, 13].

2. Роль металлов в самоорганизации белков

Доказано, что многие белки обладают способностью к самоорганизации [14]. Внутри клетки в условиях стресса, когда происходит истощение источников энергии, цитоплазматические белки могут агрегироваться [15-19]. При этом происходит уплотнение цитоплазмы – переход в структурированное гелеподобное состояние (золь-гель переход) [20]. В составе ансамблей белки остаются защищенными за счет изоляции в механически более стабильных структурах, для сохранения которых не нужна энергия [18-19]. Такая сборка обратима, при нормализации условий ансамбли распадаются, и клетка переходит в состояние активного метаболизма [16, 19, 21].

Изменение структуры цитоплазмы за счет самоорганизации белков считается быстрым, простым и эффективным путем адаптации клетки к внезапно изменившимся условиям [16, 17]. Поскольку многие метаболические реакции и сигнальные процессы происходят именно в цитоплазме, изменения в ее организации скажутся на функциональной активности клетки и ее выживаемости. Процесс самоорганизации белков был показан для бактерий, дрожжей, простейших и клеток млекопитающих при их переходе в состояние метаболического покоя [17, 18, 21].

До сих пор непонятно, что заставляет изначально растворимые белки самоорганизовываться в фибриллы, пленки, слои, кристаллы. Поэтому стоит задача понять молекулярные механизмы изменения физико-химических свойств белков, которые приводят к появлению в белках распознающих элементов –«липких» участков. Такие участки «сообщают» белкам, в каком именно месте образовать связь, чтобы произошел переход от белковой молекулы к супрамолекулярной архитектуре. Имеется точка зрения, что в нативной структуре белков распознающие элементы скрыты, но они могут экспонироваться при переходе в состояние расплавленной глобулы. Также в этом состоянии возникают дополнительные центры связывания металлов, которые могут быть связывающими агентами между белковыми макромолекулами [22-24].

Белки связывают металлы за счет координационной связи, которая по прочности занимает промежуточное положение между ковалентными и нековалентными химическими взаимодействиями. Благодаря этому свойству белки за счет металлов ассоциируются в структуры, обладающие такими уникальными свойствами как адгезия, прочность, устойчивость к истиранию, твердость и самовосстановление [23, 25]. В природе существуют необычные белковые полимеры, созданные с помощью «металлических скрепок». Это биссусные нити морских мидий, клеи червей, слизней, улиток, морских огурцов, режущие и колющие приспособления членистоногих [23].

3. Дополнительные металлсвязывающие центры в гемоглобине

Гемоглобин (Hb) эритроцитов, как и многие белки, способен связывать ионы металлов по белковой части. Для этого белка показана способность формировать комплексы с ионами железа и цинка. Оба металла являются эссенциальными макроэлементами и в больших количествах накапливаются в эритроцитах. Высокое содержание железа и цинка в крови отмечено у больных хронической почечной недостаточностью и сахарным диабетом [26].

Способность Hb связывать ионы цинка была обнаружена еще в 70-х годах XX века. Было изучено их влияние на свойства Hb и определены кинетические константы связывания этого металла [27, 28]. Наиболее активными цинк-связывающими аминокислотными остатками является цистеин, гистидин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Однако константа связывания ионов цинка с атомом серы на 4-5 порядков выше, чем с атомом азота. Поэтому при доступности всех возможных связующих центров цинк будет предпочтительно связываться по остаткам цистеина.

В Hb были выявлены центры связывания ионов цинка со средней и высокой афинностью. Первые являются внутримолекулярными и участвуют в регуляции кислородсвязывающих свойств гемоглобина. В этих сайтах в качестве потенциальных лигандов для ионов цинка рассматриваются Cys-93 и His-143 β -цепи [29]; в другой работе [28] – His-116, His-117 и His-146 β -цепи. В работе [30] постулируется участие следующих аминокислот: His-146 и Cys-93 одной β -цепи и His-2 другой β -цепи, а также делается вывод, что таких цинк-связывающих сайтов, регулирующих сродство к кислороду, в молекуле Hb два – один для оху- ($K=1,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $\text{pH}=7,11-6,83$), другой для деоху-Hb ($K=1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $\text{pH}=7,42-7,10$). Константа ассоциации для охуHb примерно в 20 раз выше, чем для деохуHb. Блокирование Cys-93 β снижало сродство к цинку как для оху- так и для деоху-формы Hb ($K=3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) [29, 30]. Причем концентрация ионов водорода не влияла на способность Hb связывать цинк [30, 31].

Вторые высокоафинные (межмолекулярные) цинк-связывающие сайты (константа ассоциации $K=1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) формируются на границе контакта тетрамеров в области, где Gys-116, Gys-117 и Glu-26 в $\beta 1$ -цепи одного тетрамера находятся в непосредственной близости от Lys-16 и Glu-116 в $\alpha 2$ -цепи соседнего тетрамера [27]. Высокоафинный межмолекулярный сайт связывания цинка был обнаружен в концентрированных растворах Hb и может возникать внутри эритроцита [29]. В работе [32] в качестве наиболее вероятных центров связывания ионов цинка рассматриваются атомы серы Cys-93 β . Остаткам гистидина отводится роль альтернативных сайтов. В этой работе связывание ионов цинка гемоглобином приводило к его коагуляции.

Изучение модуляции сродства Hb к кислороду ионами металлов показало, что ионы цинка предпочтительнее связывается с лигандированными формами Hb (R-конформерами) [28, 29, 31]. За счет стабилизации цинком R-конформации происходит увеличение сродства Hb к кислороду в 3,7 раз по сравнению с нативным белком [29].

Представляет интерес тот факт, что аминокислотные остатки, образующие высокоафинный сайт, консервативны у всех изученных гемоглобинов млекопитающих, что служит указанием на возможную роль этих центров адсорбции цинка в обеспечении какой-то важной физиологической функции белка [33]. Для среднеафинных центров такая функция известна, это аллостерическая регуляция.

4. ДНКЖ как модуляторы активности цистеинов гемоглобина

Одним из железосодержащих соединений, способных связываться с Hb, являются динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), являющиеся физиологической формой депонирования и транспорта оксида азота (NO) [34]. ДНКЖ могут быть важны для участия Hb в системе метаболизма NO и его доноров в организме [35, 36]. Также ДНКЖ поддерживают про/антиоксидантное равновесие в клетке благодаря антиоксидантному, антирадикальному и хелатному свойствам [37-39].

Нами было показано образование ДНКЖ, связанных с SH-группой остатка цистеина β -цепи Hb (Cys-93 β) [37]. При индуцированном окислительном стрессе эти комплексы защищали тиоловые группы Hb от окисления [38], и ДНКЖ могут быть регуляторами реакционной способности белковых SH-групп Hb человека [40]. В нормальных условиях включение SH-групп в ДНКЖ является обратимой модификацией, снижающей реакционную способность тиолов. При окислительном стрессе комплексы распадаются, высвобождая тиолят-анион (R-S⁻), находящийся в состоянии повышенной готовности к

реакции с активными формами кислорода и электрофилами, поскольку не нуждается в предварительном депротонировании.

Образование аддуктов с электрофильными соединениями приводит к формированию стабильной модификации белка. Иными словами, ДНКЖ являются меткой на реакционноспособные цистеины, предрасполагая их к стабильной модификации, и обеспечивая тем самым ее селективность. Регуляторное действие ДНКЖ связано и с тем, что они влияют на равновесие тиол/тиолат в белке, смещая его в сторону тиолата. Стабилизируя тиолат-анионы, ДНКЖ повышают энергетический барьер реакции с перекисями. Таким образом, они модулируют реакционную способность цистеина по отношению к действию перекисей и электрофилов.

ДНКЖ-зависимая настройка реакционной способности цистеинов – один из путей структурно-функциональной регуляции белка благодаря связыванию ионов металлов или их комплексов [6, 41], поскольку тиолатная группа – хороший лиганд для ионов железа, меди и цинка [6, 41-43]. При этом связывание металлов цистеиновыми лигандами не только изменяет структуру белка, но и оказывает комплексное защитное действие из-за одновременного снижения реакционной способности тиола и металла. Это позволяет отсрочить образование стабильных модификаций белковых тиолов при слабом окислительном стрессе и, наоборот, ускорить их при сильном стрессе.

Заключение

Изучение механизмов образования дополнительных центров связывания металлов белками при действии на них различных токсических метаболитов (мочевина, активные карбонильные соединения) и реакционно-активных молекул (активные формы кислорода и азота) позволит приблизиться к пониманию механизмов заболеваний аномальной полимеризации. Мы полагаем, что такие болезни возникают при проявлении природной способности белков к самоорганизации, благодаря которой им удается сохранить свою структуру в неблагоприятных условиях. Наиболее известным примером, демонстрирующим стабилизирующее действие ионов металлов, является способность кальция повышать прочность белковой молекулы и по отношению к повреждающим агентам, и по отношению к протеолизу.

Точка зрения на белки, как адаптируемые системы, позволяет лучше понять молекулярные механизмы перехода клетки от состояния активности к покою. Изучение участия металлов в самоорганизации белков может объяснить известный феномен накопления металлов при старении и нарушении обменных процессов в организме [44].

В данной работе новыми являются следующие положения:

- 1) Гомеостаз цинка и железа тесно связан с физико-химическим состоянием белков, особенно с состоянием SH-групп и окислительно-восстановительными условиями;
- 2) Связывание белками металлов, индуцируемое внешними условиями, может быть механизмом изменения функций или стабилизации молекулы белка;
- 3) ДНКЖ стабилизируют SH-группы в виде тиолат-аниона, проявляющего повышенную реакционную способность по отношению к электрофильным агентам. В ДНКЖ тиолы защищены от окислительной модификации, поэтому их включение в комплексы можно рассматривать как защиту от необратимого окисления.
- 4) Постулируется участие металлов как связующих агентов в самоорганизации белков, что увеличивает адаптивные возможности протеома к стрессовым условиям.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература

1. Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. / Л.: Наука. – 1985. – 318 с.

2. Бычкова В.Е., Басова Л.В., Балобанов В.А. Как мембранная поверхность воздействует на структуру белков. // Успехи биологической химии. – 2014. – 54. – 133-202.
3. Jennings P.A., Wright P.E. Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. // Science. – 1993. – 262. – 892-896.
4. Culbertson D.S., Olson J.S. Folding and assembly of myoglobins and hemoglobins. In protein folding and metal ions: mechanisms, biology, disease, P. Wittung-Stafshede, C.M. Gomes, eds. (Taylor and Francis, Inc.) – 2010. – 97-122.
5. Jia P.W., Buehler R.A., Boykins R.M., Venable R.M., Alayash I. Structural basis of peroxide mediated changes in human hemoglobin: a novel oxidative pathway. // J. Biol. Chem. – 2007. – 282. – 4894-4907.
6. Giles N.M., Watts A.B., Giles G.I., Fry F.H., Littlechild J.A., Jacob C. Metal and redox modulation of cysteine protein function. // Chem. Biol. – 2003. – 10. – 677-693.
7. Bonnet D., Stevens J.M., de Sousa, R.A., Sari M.A., Mansuy D., Artaud I. New inhibitors of iron-containing nitrile important biological control mechanisms ranging from hydratases. // J. Biochem. (Tokyo) – 2001. – 130. – 227-233.
8. Ge W., Clifton I.J., Stok J.E., Adlington R.M., Baldwin J.E., Rutledge P.J. Isopenicillin N synthase mediates thiolate oxidation to sulfenate in a depsipeptide substrate analogue: Implications for oxygen binding and a link to nitrile hydratase? // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – 130. – 10096-10102.
9. Arakawa T., Kawano Y., Katayama Y., Nakayama H., Dohmae N., Yohda M., Odaka M. Structural basis for catalytic activation of thiocyanate hydrolase involving metal-ligated cysteine modification. // J. Am. Chem. Soc. – 2009. – 131. – 14838-14843.
10. Sieracki N.A., Tian S., Hadt R.G., Zhang J.-L., Woertink J.S., Nilges M.J., Sun F., Solomon E.I., Lu Y. Copper–sulfenate complex from oxidation of a cavity mutant of *Pseudomonas aeruginosa* azurin. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – 111. – 924-929.
11. Poole L.B., Karplus P.A., Claiborne A. Sulfenic acids in redox signaling. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2004. – 44. – 325-347.
12. Murakami T., Nojiri M., Nakayama H., Odaka M., Yohda M., Dohmae N., Takio K., Nagamune T., Endo I. Post-translational modification is essential for catalytic activity of nitrile hydratase. // Protein Sci. – 2000. – 9. – 1024-1030.
13. Claiborne A., Mallett T.C., Yeh J.I., Luba J., Parsonage D. Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. // Adv. Protein Chem. – 2001. – 58. – 215-276.
14. Garcia-Seisdedos H., Villegas J.A., Levy E.D. Infinite assembly of folded proteins in evolution, disease, and engineering. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2019. – 58. – 17. – 5514-5531.
15. O'Connell J.D., Zhao A., Ellington A.D., Marcotte E.M. Dynamic reorganization of metabolic enzymes into intracellular bodies. // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. – 28. – 2012. – 89-111.
16. Petrovska I., Nüske E., Munder M.C., Kulasegaran G., Malinowska L., Kroschwald S., Richter D., Fahmy K., Gibson K., Verbavatz J.-M. Filament formation by metabolic enzymes is a specific adaptation to an advanced state of cellular starvation. // eLife. – 2014. – 3.10.7554/eLife.02409.
17. Munder M.C., Midtvedt D., Franzmann T., Nüske E., Otto O., Herbig M., Ulbricht E., Müller P., Taubenberger A., Maharana S., Malinowska L., Richter D., Guck J., Ziburdaev V., Alberti S. A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid- to a solid-like state promotes entry into dormancy. // eLife. – 2016. – 5. 10.7554/eLife.09347.
18. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. Stress, order and survival. // Nature Reviews Molec. Cell. Biol. – 2002. – 3. – 50-60.
19. Rabouille C., Alberti S. Cell adaptation upon stress: the emerging role of membraneless compartments. // Curr. Opin. Cell Biol. – 2017. – 47. – 34-42.

20. *Fels J., Orlov S.N., Grygorczyk R.* The hydrogel nature of mammalian cytoplasm contributes to osmosensing and extracellular pH sensing. // *Biophys. J.* – 2009. – 96. – 4276-4285.
21. *Parry B.R., Surovtsev I.V., Cabeen M.T., O'Hern C.S., Dufresne E.R., Jacobs-Wagner C.* The bacterial cytoplasm has glass-like properties and is fluidized by metabolic activity. // *Cell.* – 2014. – 156. – 183-194.
22. *Salgado E.N., Ambroggio X.I., Brodin J.D., Lewis R.A., Kuhlman B., Tezcan F.A.* // Metal templated design of protein interfaces. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – 107. – 1827-1832.
23. *Degtyar E., Harrington M.J., Politi Y., Fratzl P.* The Mechanical Role of Metal Ions in Biogenic Protein Based Materials. // *Angewandte Chemie.* – 2014. – 53. – 45.12026-12044.
24. *Матвеева А.Д., Москалец А.П., Фельдштейн М.М.* Влияние катионов металлов на механические и адгезионные свойства адгезивов. // *Universum: Химия и биология: Электрон. научн. журн.* – 2016. – 1.-31.
25. *Lee B.P., Messersmith P.B., Israelachvili J.N., Waite J.H.* Mussel-inspired adhesives and coatings. // *Annu.Rev.Mater. Res.* – 2011. – 41. – 99-132.
26. *Гарипова М.И., Ильина О.С., Буторина О.Л., Веселов С.Ю., Шуганова А.И., Новоселова Е.И., Гарипов О.С., Зинатуллина Л.Г., Цветков В.О.* Повышение общей концентрации катионов цинка и снижение концентрации лабильного цинка в крови больных сахарным диабетом типа I. // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – 4-2. – 368-370.
27. *Arnone A., Williams D.* The binding of zinc to human deoxyhemoglobin and its possible relevance to the anti-sickling effect of zinc. // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1977. – 14. – 317-328.
28. *Rifkind J.M.* Zinc and its role in biology and nutrition. // *Metal Ions in Biological Systems.* – 1983. – 15. – 275-309.
29. *Rifkind J.M., Heim J.M.* Interaction of zinc and hemoglobin: binding of zinc and the oxygen affinity. // *Biochemistry.* – 1977. – 16. – 4438-4443.
30. *Gilman J.G., Brewer G.J.* The oxygen-linked zinc-binding site of human haemoglobin. // *Biochem J.* – 1978. – 169. – 625-632.
31. *Oelshlegel Jr. F.J., Brewer G.J., Knutsen C., Prasad A.S., Schoemaker E.B.* Studies on the interaction of zinc with human hemoglobin // *Arch. Biochem. Biophys.* 1974. – 163. – 742-748.
32. *Хромова В.С., Мышкин А.Е.* Коагуляция цинк-модифицированного гемоглобина. // *Журнал общей химии.* – 2002. – 72. – 10. – 1645-1649.
33. *Blindauer C.A., Harvey I., Bunyan K.E., Stewart A.J., Sleep D., Harrison D.J., Bezenko S., Sadler P.J.* Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – 284. – 34. – 23116-23124.
34. *Ванин А.Ф.* Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физикохимия, биология, медицина. / М.: Ин-т комп. исследований. – 2015. – 219 с.
35. *Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф.* Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции. // *Прикл. биохим. микробиол.* – 2019. – 55. – 2. – 107-123.
36. *Космачевская О.В., Топунов А.Ф.* Альтернативные и дополнительные функции эритроцитарного гемоглобина. // *Биохимия.* – 2019. – 84. – 1. – 3-23.
37. *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. – 436. – 445-461.
38. *Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F.* Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin – and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes. // *Nitric Oxide.* – 2008. – 18. – 37-46.

39. *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. – 58. – 2. – 239-245.

40. *Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Шумаев К.Б., Новикова Н.Н., Топунов А.Ф.* Влияние комплексов железа с оксидом азота на реакционную способность цистеинов гемоглобина. // *Прикл. биохим. микробиол.* – 2020. – 56. – 5. – 436-445.

41. *Novikova N.N., Kovalchuk M.V., Yurieva E.A., Kononov O.V., Stepina N.D., Rogachev A.V., Yalovega G.E., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Yakunin S.N.* The enhancement of metal-binding properties in hemoglobin: the role of mild damaging factors. // *J. Phys. Chem. B*. – 2019. – 123. – 40. – 8370-8377.

42. *Jakob U., Eser M., Bardwell J.C.A.* Redox switch of Hsp33 has a novel zinc-binding motif. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – 275. – 49. – 38302-38310.

43. *Kaim W., Schwederski B.* The bioinorganic chemistry of the quintessentially toxic metals. // *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life.* / G.N.A. Meyer (Ed.). Chichester, UK: John Wiley & Sons. – 1991. – 330-350.

44. *Дубина Т.Л., Леонов В.А.* Металлы в организме и их роль в процессах старения. // *Успехи современной биологии*. – 1968. – 66. – 3(6). – 453-470.

Сведения об авторах

Ольга Владимировна Космачевская

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: rizobium@yandex.ru

Институт биохимии им. А.Н. Баха,

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Россия, Москва

Наталья Николаевна Новикова

д-р физ.-мат. наук., вед. науч. сотр.

Эл. почта: nn_novikova@crys.ras.ru

НИЦ «Курчатовский институт»

Алексей Федорович Топунов

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией

Эл. почта: aftopunov@yandex.ru

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Россия, Москва

Information about authors

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya

PhD, Senior research scientist

Senior research scientist

E-mail: rizobium@yandex.ru

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

Russian Federation, Moscow

Natalya Nikolaevna Novikova

DSc, Head of laboratory

National Research Center "Kurchatov Institute",

Moscow, Russia

Alexey Fedorovich Topunov

DSc, Head of laboratory

E-mail: aftopunov@yandex.ru

Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the RAS

Russian Federation, Moscow

УДК 577.112.4

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.45

¹Топунов А.Ф., ¹Космачевская О.В., ²Новикова Н.Н.

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха,
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

²НИЦ "Курчатовский институт"

СВЯЗЫВАНИЕ МЕТАЛЛОВ ГЕМОГЛОБИНОМ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Установлен факт образования дополнительных центров связывания ионов переходных металлов (Zn и Fe) в гемоглобине в условиях, моделирующих эндогенную интоксикацию. Предложен механизм возникновения таких дополнительных центров.

Ключевые слова: гемоглобин, переходные металлы, железо, цинк, мягкие повреждающие факторы, рентгеновская спектроскопия отражения.

METAL BINDING BY HEMOGLOBIN AT DIFFERENT CONDITIONS

The fact of the formation of additional binding centers of transition metal ions (Zn and Fe) in hemoglobin under conditions simulating endogenous intoxication was revealed. A mechanism for the emergence of such additional centers was proposed.

Keywords: hemoglobin, transition metals, iron, zinc, mild damaging factors, X-ray absorption spectroscopy.

Введение

Как известно, гемоглобин (Hb) содержит атомы железа в составе гема, что облегчает получение структурной информации об этом белке методом стоячих рентгеновских волн [1, 2]. В то же время, Hb, как и многие белки, способен связывать ионы металлов и на белковой части. Такие комплексы формируются с Fe и Zn, которые в больших количествах накапливаются в крови, в том числе у больных хронической почечной недостаточностью и сахарным диабетом [3]. Способность Hb связывать ионы Zn была описана в 70-х годах XX века [4, 5]. Наиболее активными цинк-связывающими аминокислотами являются цистеин и гистидин. При этом механизм связывания ионов железа белковой частью Hb изучен слабо.

Внешние условия существенно влияют на особенности связывания белками ионов металлов. Целью нашей работы было изучение действия слабых денатурирующих факторов на способность Hb связывать ионы железа и цинка по белковой части. Выбор гемоглобина, важнейшего транспортного белка крови, в качестве объекта исследования обусловлен тем, что при развитии синдрома эндогенной интоксикации в первую очередь нарушается функционирование системы крови, выполняющей в организме интегративные функции.

Результаты и обсуждение

Для решения поставленной задачи была использована разновидность рентгеновской спектроскопии – определение околопороговой тонкой структура рентгеновского спектра поглощения (X-ray absorption near edge structure – XANES). Анализ XANES-спектров позволяет определять координаты окружающих атомов, межатомные расстояния, локальную симметрию окружения.

Метод XANES-спектроскопии неоднократно применялся для исследования локального окружения металлов в активных центрах металлопротеинов [6, 7]. Новые возможности для изучения объектов с крайне низкой концентрацией поглощающих атомов, таких как металлопротеины, открывают измерения XANES-спектров во флуоресцентной моде в условиях полного внешнего отражения. В нашей работе были проведены XANES-измерения для пленок Hb, сформированных на поверхности жидкости, когда не нарушается нативная конформация белковых молекул, а следовательно, сохраняются их биологические функции. Было исследовано действие на Hb одного из наиболее известных “уремических” токсикантов – мочевины. Опыты проводили на экспериментальной станции «Ленгмюр» Курчатовского источника синхротронного излучения (Москва, Россия).

Был впервые установлен факт образования дополнительных высокоаффинных центров связывания металлов (Zn и Fe) в гемоглобине в условиях, моделирующих эндогенную интоксикацию в организме (мочевина, соли металлов, умеренный нагрев) [8, 9]. Связанные ионы Zn координируются в кластер с четырехкоординатным окружением, где двумя лигандами являются остатки цистеина и гистидина, а другими двумя лигандами могут быть карбоксильная группа аминокислотного остатка и молекула воды. Отметим, что наиболее предпочтительными для связывания цинка и железа в белках являются

остатки цистеина, константа связывания с которыми на 4-5 порядков выше, чем с атомом азота имидазола гистидина.

Предложен механизм возникновения дополнительных центров связывания металлов под действием повреждающих факторов. Сначала происходит лабилизация конформации Hb с демаскировкой «скрытых» цистеинов, затем образуются интермедиаты окисления тиолов, выступающих в роли лигандов для формирования комплексов с Zn. Эти рассуждения основываются на том, что при денатурационных воздействиях и окислительном стрессе белки претерпевают структурные изменения, влияющие на SH-группы остатков цистеина. В частности, повышение доступности и реакционной способности «скрытых» SH-групп происходит при переходе глобулярных белков, таких, как гемоглобин и миоглобин, из нативного состояния в состояние расплавленной глобулы при слабых повреждающих воздействиях [10, 11]. Полученные результаты позволяют объяснить возникновение многих патологий при эндогенной интоксикации.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: Установлен факт образования дополнительных центров связывания ионов переходных металлов (Zn и Fe) на белковой части Hb при действии мягких повреждающих факторов. Предложен механизм возникновения дополнительных центров в таких условиях.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература

1. Новикова Н.Н., Ковальчук М.В., Степина Н.Д., Коновалов О.В., Юрьева Э.А., Чухрай Е.С. Спектрально-селективные рентгеновские методы для структурной диагностики упорядоченных биоорганических наносистем на поверхности жидкости // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2011. – 9. – 6-11.
2. Ковальчук М.В., Новикова Н.Н., Якунин С.Н. Стоячие рентгеновские волны и биологическое материаловедение. // Природа. – 2012. – 12. – 3-14.
3. Гарипова М.И., Ильина О.С., Буторина О.Л., Веселов С.Ю., Шуганова А.И., Новоселова Е.И., Гарипов О.С., Зинатуллина Л.Г., Цветков В.О. Повышение общей концентрации катионов цинка и снижение концентрации лабильного цинка в крови больных сахарным диабетом типа I. // Фундаментальные исследования. – 2013. – 4-2. – 368-370.
4. Arnone A., Williams D. The binding of zinc to human deoxyhemoglobin and its possible relevance to the anti-sickling effect of zinc. // Prog. Clin. Biol. Res. – 1977. – 14. – 317-328.
5. Rifkind J.M. Zinc and its role in biology and nutrition. // Metal Ions in Biological Systems. – 1983. – 15. – 275-309.
6. Boffi F., Ascone I., Della-Longa S., M. Girasole M., Yalovega G., Soldatov A.V., Varoli-Piazza A., Congiu Castellano A. X-ray absorption near-edge spectroscopy of transferrins: a theoretical and experimental probe of the metal site local structure. // Eur. Biophys. J. – 2003. – 32. – 329-341.
7. Mara M.W., Hadt R.G., Reinhard M.E., Kroll T., Lim H., Hartsock R.W., Alonso-Mori R.A., Chollet M., Glowacki J.M., Nelson S., Sokaras D., Kunnus K., Hodgson K.O., Hedman B., Bergmann U., Gaffney K.J., Solomon E.I. Metalloprotein entatic control of ligand-metal bonds quantified by ultrafast x-ray spectroscopy. // Science. – 2017. – 356. – 6344. – 1276-1280.
8. Novikova N.N., Kovalchuk M.V., Yurieva E.A., Kononov O.V., Stepina N.D., Rogachev A.V., Yalovega G.E., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Yakunin S.N. The enhancement of metal-binding properties in hemoglobin: the role of mild damaging factors. // J. Phys. Chem. B. – 2019. – 123. – 40. – 8370-8377.

9. Новикова Н.Н., Якунин С.Н., Ковальчук М.В., Юрьева Э.А., Степина Н.Д., Рогачев А.В., Кременная М.А., Яловега Г.Э., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Возможности рентгеновской абсорбционной спектроскопии в геометрии полного внешнего отражения для исследования белковых пленок на жидкости. // Кристаллография. – 2019. – 64. – 6. – 945-951.

10. Jennings P.A., Wright P.E. Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. // Science. – 1993. – 262. – 892-896

11. Culbertson D.S., Olson J.S. Folding and assembly of myoglobins and hemoglobins. // Protein Folding and Metal Ions: Mechanisms, Biology, Disease. (P. Wittung-Stafshede, C.M. Gomes, eds.). Abingdon, UK: Taylor and Francis. – 2010. – 97-122.

Сведения об авторах

Алексей Федорович Топунов

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией
Эл. почта: aftopunov@yandex.ru
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Россия, Москва

Ольга Владимировна Космачевская

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.
Эл. почта: rizobium@yandex.ru
Институт биохимии им. А.Н. Баха,
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Россия, Москва

Наталья Николаевна Новикова

д-р физ.-мат. наук., вед. науч. сотр.
Эл. почта: nn_novikova@crys.ras.ru
НИИ «Курчатовский институт»

Information about authors

Alexey Fedorovich Topunov

DSc, Head of laboratory
E-mail: aftopunov@yandex.ru
Bach Institute of Biochemistry, Research Center of
Biotechnology of the RAS
Russian Federation, Moscow

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya

PhD, Senior research scientist
Senior research scientist
E-mail: rizobium@yandex.ru
Bach Institute of Biochemistry, Research Center of
Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Russian Federation, Moscow

Natalya Nikolaevna Novikova

DSc, Head of laboratory
National Research Center "Kurchatov Institute",
Moscow, Russia

УДК 612.111.11

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.46

Юшков Б.Г., Бриллиант С.А.

Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения
Российской академии наук

ИЗОФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

В статье показаны изменения соотношения изоформ гемоглобина периферической крови и костного мозга, их распределение по типам эритроцитов. Один эритроцит несет в себе две изоформы гемоглобина. Эритроциты с меньшим молекулярным весом содержат меньший процент кислото- и щелочеустойчивых свойств.

Ключевые слова: система гемоглобинов, изоформы гемоглобина, гетерогенность, молекулярный вес, костный мозг

Yushkov B.G., Brilliant S.A.

Institute Immunology and Physiology

HEMOGLOBIN ISOFORMS AND ERYTHROCYTE HETEROGENEITY

The work shows changes in the ratio of blood hemoglobin isoforms and of bone marrow their distribution by types of erythrocytes. One erythrocytes carries two isoforms of hemoglobin. Erythrocytes with a lower molecular weight contain a lower percentage of acid- and alkali-resistant properties.

Keywords: hemoglobin system, hemoglobin isoforms, heterogeneity, reticulocyte, molecular weight, bone marrow

В настоящее время описаны первичные структуры более 600 вариантов гемоглобинов различных организмов [1, с.251; 2, с.23]. Показано, что в крови одного организма довольно часто присутствуют несколько гемоглобинов, как близких по свойствам, так и различающихся по структуре и функциям, которые принято называть изоформами. У взрослого человека в крови циркулирует три изоформы гемоглобина, у птиц - две, у собаки, лошади, кошки – две, соотношение которых может варьировать от эмбриональной к постнатальной жизни, у крысы – шесть, по некоторым данным девять фракций, отличающиеся по своей молекулярной структуре [3, с.83; 4, с.3].

Уникальным свойством гемоглобинов является их гетерогенность, как по электрофоретической подвижности, так и по функциональным свойствам. Все большее распространение получает представление, что функции гемоглобина не ограничиваются двумя основными: транспорт кислорода и буферная, а значительно многообразнее и шире. В литературных источниках обсуждаются следующие функции гемоглобина: 1- теплопередатчик через его цикл оксигенации-дезоксигенации, 2- модулятор метаболизма эритроцитов, 3- окисление гемоглобина как начало старения эритроцитов, 4- влияние на генетическую устойчивость к малярии, 5- ферментативная активность и взаимодействие с лекарственными препаратами, 6- физиологически активных веществ, 7- связывание экзогенных лигандов, 8- роль в сигнале [2, с.23].

Все многообразие типов гемоглобина можно разделить на постоянно присутствующие в крови и появляющиеся в крови только на определенных этапах развития организма и патологические формы. Кроме того, выделяют функциональные формы гемоглобина (дезоксигемоглобин, оксигемоглобин, карбгемоглобин и метгемоглобин) и его производные – результат взаимодействия с различными веществами (карбоксигемоглобин, циангемоглобин, солянокислый гематин, метгемоглобин, азид-метгемоглобин и другие).

Гетерогенность может быть «постоянной», когда несколько гемоглобинов присутствует в организме одновременно, и «переменной», когда гемоглобины сменяют друг друга в процессе индивидуального развития организма. Последний случай хорошо известен для гемоглобинов крови человека [2, с.23]. Отмечены изменения фракций гемоглобина в процессе эволюции [4, с.3; 5, с.1-240]. Благодаря современным методам исследований оказалось возможным реконструировать структуру ранних предковых гемоглобинов и рассчитать скорость их эволюции на разных этапах [6, с.701; 7, с.359; 8, с.1178].

В гематологии давно и прочно устоялось представление о неоднородности эритроцитов, которое находит своё отражение в анизоцитозе, пойкилоцитозе, различиях в степени насыщения клеток гемоглобином (гипер- и гипохромия), в циркуляции в крови определённого количества клеток с его фетальными формами и др. Открытие различных изоформ гемоглобина(-ов) ставит вопрос о их вкладе в формировании эритроцитарной неоднородности.

Цель работы. Изучить изменения соотношения между изоформами гемоглобина костного мозга и периферической крови у крыс, оценить распределение фракций в эритроцитах.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на 30 крысах-самцах линии Wistar массой 250-300 г. Животных содержали в соответствии рекомендациям международных этических комитетов (Директива Совета ЕС2010/63/EU).

Для выявления эритроцитов, содержащих фетальные формы гемоглобина, мазки крови выдерживали в цитратно-фосфатном буфере (pH=4,5), затем в 1% растворе эозина (метод К.Ветке-Е.Клейхауер. Подсчет ретикулоцитов осуществляли в мазках крови и костного мозга, окрашенных бриллиантовым крезиловым синим. Ретикулоциты и клетки с фетальным гемоглобином считали в мазках крови на 1000 эритроцитов, при увеличении

100× на световом микроскопе Leica DM 2500 (Германия). Приготовляли гемолизат из периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ) крыс с для последующей разгонкой белковых фракций гемоглобина. Для точного определения молекулярных масс использовали белковый стандарт Precision Plus Protein Standards Dual Color фирмы Bio-Rad (США). Диапазон молекулярных масс составлял от 10 до 250 кДа. Исследование качественных характеристик эритроцитов и фракций гемоглобина проводили в цельной крови и после разделения форменных элементов на 6 фракций методом фракционного центрифугирования [9, с.1313]. Соотношения между фракциями гемоглобина периферической крови определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле по - Г. Мауреру. Полученные данные статистически обрабатывали в программе Statistica 8 (StatSoft, Inc.) и представляли в виде среднего значения и ошибки среднего ($M \pm m$). Ввиду небольшого объёма выборок сравнение групп проводили с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Полученные результаты. В костном мозге и периферической крови у крыс методом электрофореза в полиакриламидном геле определяются 6 белковых фракций гемоглобина. Рассматривая данные соотношения белковых фракций гемоглобина, как костного мозга, так и периферической крови крыс, следует отметить, что преобладают 3, 4 изоформы гемоглобина (в костном мозге $F3=44,87 \pm 0,52\%$, $F4=18,95 \pm 0,3\%$ и в периферической крови $F3=43,97 \pm 0,8\%$, $F4=20,52 \pm 0,5\%$). 1, 2 – минорные, а 5, 6 – тождественны молодым изоформам гемоглобина (фетальные клетки, несущие кислотоустойчивые свойства и ретикулоциты).

Периферическая кровь отличается от костного мозга содержанием 6 белковой фракции гемоглобина. В костном мозге данная изоформа гемоглобина составляет $F6=4,1 \pm 0,2\%$, а в периферической крови $F6=2,85 \pm 0,57\%$, соответственно. Процентное распределение фракций в костном мозге и периферической крови одинаково.

В периферической крови путем фракционного центрифугирования выделяют 6 фракций эритроцитов различных по молекулярной массе. Клетки каждой фракции эритроцитов содержат две изоформы гемоглобина — одну более тяжёлую и одну более лёгкую. F1 эритроцитов является тяжелой. F6 эритроцитов - легкой. Средние фракции эритроцитов F3-F5 образуют наибольшее количество от общей массы клеток и обладают кислото- и щелочестойчивыми свойствами, выполняют ключевые функции в организме. (таблица 1).

Полученные данные в изменении соотношения между изоформами гемоглобина костного мозга и периферической крови могут отражать участие пигмента в адаптивных реакциях при действии на организм экстремальных факторов.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: Эритроциты разных типов отличаются по своему гемоглобиновому профилю. Один эритроцит несет в себе две изоформы гемоглобина. Эритроциты с меньшими молекулярными массами гемоглобина содержат меньший процент кислото- и щелочестойчивых свойств.

Литература

1. *Топунов А.Ф., Космачевская О.В.* Множественные функциональные формы гемоглобина в организме человека: современный взгляд и практическое использование. Биомика. 10(3): 251–267. 2018
2. *Юшков Б.Г., Черешнев В.А., Бриллиант С.А.* Гетерогенная система гемоглобина и ее роль в норме и при патологии. Клиническая патофизиология. 2020; 26(2):22-36.
3. *Проскурина И. К., Титовский А. В.* Фракционный состав гемоглобина крысы при экспериментальной дегидратации. Ярославский педагогический вестник. 1999; 3 (21): 83–5.

4. *Сумин М. Н.* Гетерогенная система гемоглобина в условиях нормального и измененного эритропоэза. Автореф. Дис. канд. мед. наук. Челябинск; 2002. 25с.
5. *Иржак Л. И.* Гемоглобины и их свойства. М.: Наука; 1983. 240с.
6. *Datta M. C., Gilman J. G.* Rat hemoglobin heterogeneity: postnatal changes in proportions of multiple components and effects of erythropoietin on marrow cell cultures. *Hemoglobin*. 1981; 5 (7–8): 701–14
7. *Luo H. Y., Liang X. L., Frye C., Wonio M., Hankins G. D., Chui D. H., Alter B. P.* Embryonic hemoglobins are expressed in definitive cells. *Blood*. 1999; 94 (1): 359–61.
8. *Storz J. F., Natarajan C., Moriyama H., Hoffmann F. G., Wang T., Fago A., Malte H., Overgaard J., Weber R. E.* Oxygenation properties and isoform diversity of snake hemoglobins. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2015; 309 (9): 1178–91.
9. *Юшков Б.Г., Бриллиант С.А.* Особенности распределения различных изоформ гемоглобина в эритроцитах крыс / Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2020. Т. 106. № 10. С. 1312–1320. DOI: 10.31857/S0869813920090095.

**Таблица 1. Фракции эритроцитов в кДа после фракционного центрифугирования/
Table 1. Erythrocytes fractions in kDa after fractional centrifugation**

	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6
контроль/ control	52,27 ± 1,33	56,9 ± 1,21	63,0 ± 1,43	70,71 ± 0,31	81,67 ± 0,97	86,86 ± 0,54
1 фракция/ 1 fraction	-	-	-	74,51 ± 0,84*	-	85,79 ± 1,37
2 фракция/ 2 fraction	-	-	66,68 ± 0,83*	-	82,74 ± 0,98	-
3 фракция/ 3 fraction	-	-	64,04 ± 1,08	71,89 ± 0,57	-	-
4 фракция/ 4 fraction	-	-	64,55 ± 0,46	73,46 ± 1,04*	-	-
5 фракция/ 5 fraction	-	55,3 ± 0,80	61,70 ± 0,52	-	-	-
6 фракция/ 6 fraction	50,76 ± 0,82	59,09 ± 0,75	-	-	-	-

Примечание: *p* – достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$); F1-F6 – белковые фракции гемоглобина/
Note: *p* - significant differences from control ($p < 0.05$); F1-F6 - hemoglobin protein fractions

Сведения об авторах

Борис Германович Юшков

чл.-корр. РАН, ЗДН РФ, д-р мед. наук, проф., зав. лаб.

Светлана Александровна Бриллиант

аспирантка

E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН

Екатеринбург, Россия

Information about authors

Boris Germanovich Yushkov

Professor

Institute Immunology and Physiology

Svetlana Alexandrovna Brilliant

Postgraduate

E-mail: svetlana.brilliant@bk.ru

Institute Immunology and Physiology

Ekaterinburg, Russia

УДК 576.5
ГРНТИ 31.27.53
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.47

Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Ерохина П.Д.,
Щулькин А.В., Якушева Е.Н.
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

РОЛЬ ПРЕГНАН X РЕЦЕПТОРА В РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК К НИТРОЗАТИВНОМУ И ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

В статье обсуждается роль прегнан X рецептора (PXR) в условиях окислительного и нитрозативного стресса. Полученные результаты показали, что воздействие пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона на клетки линии Caco-2 приводит к снижению жизнеспособности клеток, что сопровождается увеличением количества PXR. Данные изменения нивелируются внесением в питательную среду кетоконазола (ингибитора PXR).

Ключевые слова: окислительный и нитрозативный стресс, клетки линии Caco-2, прегнан X рецептор, жизнеспособность клеток.

Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Shchulkin A.V., Erokhina P.D.,
Shchulkin A.V., Yakusheva E.N.
Ryazan State Medical University

ROLE OF PREGNAN-X-RECEPTOR IN CELL RESISTANCE TO NITROSATIVE AND OXIDATIVE STRESS.

The article discusses the new role of pregnane X receptor (PXR) under conditions of oxidative and nitrosative stress. The results showed that the effect of hydrogen peroxide and S-nitrosoglutathione in high concentrations on Caco-2 cells leads to a decrease in cell viability, which is accompanied by an increase in the amount of PXR. These changes are offset by the addition of ketoconazole (inhibitor of PXR) to the medium.

Keywords: oxidative and nitrosative stress, Caco-2 cells, pregnane X receptor, cell viability.

Активные формы кислорода и азота (АФК и АФА) образуются во время физиологических процессов и в умеренных концентрациях принимают участие в регуляции клеточных функций. Однако, гиперпродукция АФК и АФА приводит к их взаимодействию с белками, липидами и углеводами, в следствие чего происходят структурные и функциональные изменения, а также повреждение клеток [1, с. 20]. Поэтому поддержание баланса между генерацией и утилизацией АФК и АФА имеет важное значение в регуляции выживаемости клеток.

Защита организма от токсических агентов происходит в результате биотрансформации химических веществ, детоксикации метаболитов с помощью ферментов антиоксидантной защиты или при участии транспортных белков в печени и кишечнике.

Ксеносенсорный рецептор прегнана X (PXR; NR1I2) играет важную роль в этом процессе. PXR, член суперсемейства ядерных рецепторов лиганд-зависимых факторов транскрипции, может быть активирован различными лигандами, включая лекарственные препараты (ампренавир, литохолевая кислота, солостерол А и В, дексаметазон, никардипин), факторы окружающей среды (например, полихлорированные бифенилы) и эндогенные соединения (желчные кислоты, оксистерины, стероидные гормоны) [2, с. 2395]. Активированный PXR связывается с элементами промотора и регулирует транскрипцию ферментов, метаболизирующих лекарственные средства (цитохром P450, глутатион S-трансфераза), а также белков-переносчиков (MDR1) [3, с. 677], что имеет важное значение в регуляции выживаемости клеток.

В связи с этим целью исследования было изучить роль PXR в изменении жизнеспособности клеток линии Caco-2 *in vitro* при моделировании окислительного и нитрозативного стресса.

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 CO₂ 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. Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, экспрессирующие PXR [4, с. 93].

Эксперимент включал следующие серии:

- 1) контрольная серия - клетки, которые инкубировали в питательной среде с добавлением эквивалентного количества воды для инъекций;
- 2) моделирование окислительного стресса пероксидом водорода (Sigma-Aldrich) в концентрациях 1; 5; 10; 50 и 100 мкМ и сроком инкубации 24 ч;
- 3) моделирование нитрозативного стресса S-нитрозоглутатионом (Sigma-Aldrich) в концентрациях 1; 10; 50; 100 и 500 мкМ и сроком инкубации 24 ч;
- 4) моделирование ингибирования PXR, при воздействии комбинации ингибитора прегнан-Х-рецептора - кетоконазола 10 мкМ (Sigma-Aldrich) и пероксида водорода в концентрациях 1; 5; 10; 50 и 100 мкМ при инкубации 24 ч;
- 5) моделирование ингибирования PXR, при воздействии комбинации ингибитора прегнан-Х-рецептора - кетоконазола 10 мкМ (Sigma-Aldrich) и S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1; 10; 50; 100 и 500 мкМ при инкубации в течение 24 ч;

Каждая серия экспериментов была выполнена в 3 повторах.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью цитотоксического теста (МТТ-тест). Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета 10⁴ клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли питательную среду с исследуемыми веществами в соответствии с экспериментальными сериями. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0.5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия) [5, с. 335]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Жизнеспособность клеток Caco-2 в присутствии пероксида водорода рассчитывали по формуле (ОП – оптическая плотность):

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%$$

Определение количества PXR в клетках линии Caco-2 проводили методом вестерн-блот, лизированных NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (Sigma-Aldrich).

Электрофорез проводили в соответствии с протоколом Bio-Rad.

Определение количества PXR методом вестерн-блот проводили с использованием первичных мышинных моноклональных антител (MA5-31808 PXR Monoclonal Antibody (1D12G1), Invitrogen, США) в концентрации 1:200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen) в разведении 1:4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (Bio-Rad). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad). Количество PXR оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные GAPDH Loading Control Monoclonal

Antibody (GA1R), DyLight 68, Invitrogen, разведение 1:1000, вторичные антитела - вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, разведение 1:4000).

Полученные результаты анализировали с помощью программ «StatSoft Statistica 13.0» и Microsoft Excel. Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Результаты

Цитотоксическое действие H_2O_2 и GSNO оценивалось в ходе МТТ-теста. В контрольной группе жизнеспособность клеток составила 100%. Данный показатель статистически значимо не отличался при воздействии H_2O_2 в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ, при концентрации прооксиданта 50 мкМ жизнеспособность клеток снижалась до $54.1\% \pm 9.5\%$ ($p = 0.001$), а при 100 мкМ - $26.8\% \pm 14.3\%$ ($p = 0.0003$) (рис. 1).

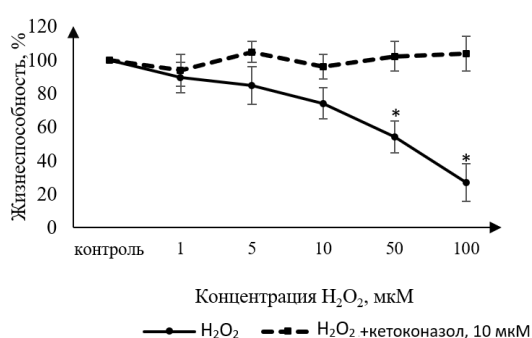


Рис. 1. Жизнеспособность клеток линии Сасо-2 в условиях моделирования окислительного стресса и в условиях ингибирования PXR на фоне применения пероксида водорода.

Примечание: * - статистически значимые отличия от контроля $p < 0.05$

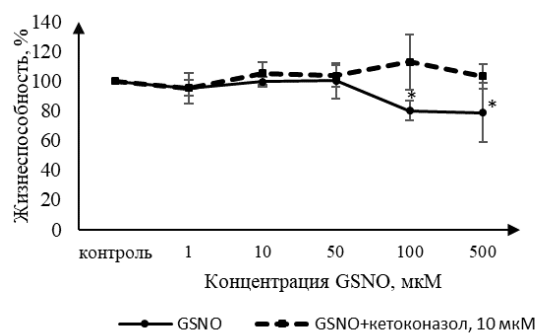


Рис. 2. Жизнеспособность клеток линии Сасо-2 в условиях моделирования нитрозативного стресса и в условиях ингибирования PXR на фоне применения S-нитрозоглутатиона.

Примечание: * - статистически значимые отличия от контроля $p < 0.05$

При воздействии GSNO в концентрациях 1-50 мкМ жизнеспособность клеток не изменялась, а при концентрациях 100 мкМ и 500 мкМ снижалась до $79.9 \pm 6.7\%$ ($p = 0.02$) и $78.8 \pm 7.2\%$ ($p = 0.03$) соответственно (рис. 2).

При внесении в питательную среду ингибитора PXR жизнеспособность клеток не изменялась в условиях окислительного и нитрозативного стресса (рис. 1 и рис. 2).

При воздействии пероксида водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 24 ч происходило повышение количества PXR при концентрации H_2O_2 10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ на 67.1% ($p=0.03$), 25.9% ($p=0.0003$) и 35.9% ($p=0.0003$) соответственно по сравнению с контролем.

При инкубации клеток линии Сасо-2 с GSNO и экспозиции 24 ч относительное количество транскрипционного фактора увеличивалось при концентрации GSNO 1 мкМ на 154.9% ($p=0.0002$), 10 мкМ – на 110.3% ($p=0.01$), 50 мкМ – на 32.8% ($p=0.001$). При концентрации S-нитрозоглутатиона 100 мкМ уровень PXR достоверно не отличался от показателей контроля, а в концентрации 500 мкМ был его ниже на 14.0% ($p=0.004$).

Эффективность преодоления окислительного и нитрозативного стресса имеет важное значение для выживания клеток. Ядерный рецептор прегнан X играет огромную роль

в детоксикации ксенобиотиков, однако в этом исследовании мы доказали, что увеличение количества PXR в клетках линии Сасо-2 приводит к повышенной чувствительности клеток к воздействию пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона.

Известно, что индукция PXR может приводить к развитию окислительного стресса и повреждению клеток, за счет активации метаболизма ксено- и биобиотиков с участием изоферментов цитохрома P450 (CYP2B1 / 2B2, CYP3A1 / 3A2 и CYP2C6) [6, с. 393], а также за счет снижения активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы [7, с. 282].

Авторы считают, что данное исследование демонстрирует новую роль прегнан-Х-рецептора в условиях окислительного и нитрозативного стресса, что может иметь регуляторное значение при развитии патологических состояний, сопряженных с накоплением АФК/АФА.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-1856.2020.7.

Цитируемая литература:

1. Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets*. 2020. 20 (1). 16-26.
2. Daujat-Chavanieu M., Gerbal-Chaloin S. Regulation of CAR and PXR Expression in Health and Disease. *Cells*. 2020. 9 (11). P. 2395.
3. Swales K.E., Moore R., Truss N.J., Tucker A., Warner T.D., Negishi M., Bishop-Bailey D. Pregnane X receptor regulates drug metabolism and transport in the vasculature and protects from oxidative stress. *Cardiovasc Res*. 2012. 93(4). 674–681.
4. Garg A., Zhao A., Erickson S.L., Mukherjee S., Lau A.J., Alston L., Chang T.K., Mani S., Hirota S.A. Pregnane X Receptor Activation Attenuates Inflammation-Associated Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Inhibiting Cytokine-Induced Myosin Light-Chain Kinase Expression and c-Jun N-Terminal Kinase 1/2 Activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016. 359 (1), 91-101.
5. Tolosa L., Donato M.T., Gómez-Lechón M. J. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. *Methods Mol. Biol*. 2015. 1250, 333-348.
6. Kakehashi A., Hagiwara A., Imai N., Nagano K., Nishimaki F., Banton M., Wei M., Fukushima S., Wanibuchi H. Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat: Evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013. 273. 390–400.
7. Gong H., Singh S.V., Singh S.P., Mu Y., Lee J.H., Saini S.P.S., Toma D., Ren S., Kagan V.E., Day B.W., Zimniak P., Xie W. Orphan Nuclear Receptor Pregnane X Receptor Sensitizes Oxidative Stress Responses in Transgenic Mice and Cancerous Cells. *Molecular Endocrinology*, 2006. 20 (2). P. 279–290.

Сведения об авторах

Юлия Владимировна Абаленихина

канд. биол. наук., доц. каф. биологической химии
Эл. почта: abaleniuhina88@mail.ru
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Елена Александровна Судакова

ассист. каф. биологической химии
Эл. почта: sudakova.ea@inbox.ru
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Information about authors

Yulia V. Abalenikhina

PhD, Associate Prof. of the Depart. biological chemistry
E-mail: abaleniuhina88@mail.ru
Ryazan State Medical University,
Ryazan, Russia.

Sudakova Elena A.

assistant of the Department biological chemistry
Эл. почта: sudakova.ea@inbox.ru
Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia.

Пелагея Дмитриевна Ерохина
студентка лечебного факультета
Эл. почта: hippopotamus-cat-19@yandex.ru
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Алексей Владимирович Шулькин
канд. мед. наук, доц., доц. каф. фармакологии
Эл. почта: alekseyshulkin@rambler.ru
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Елена Николаевна Якушева
д-р, мед. наук, проф., зав. каф. фармакологии с
курсом фармации ФДПО
Эл. почта: e.yakusheva@rzgmu.ru
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Pelageya D. Erokhina
student of the therapeutic faculty
E-mail: hippopotamus-cat-19@yandex.ru
Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia

Aleksey V. Shchulkin
MD, PhD, Ass. Prof.r of the Department
E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru
Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia.

Elena N. Yakusheva
MD, PhD, Professor, Head of the Department of Pharma-
cology with Course of PFAPЕ
E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru
Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia.

УДК 573.2: 577.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.48

Горина С.С., Топоркова Я.Ю.
Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕМОПРОТЕИНОВ (P450 И КАТАЛАЗ), УЧАСТВУЮЩИХ В БИОСИНТЕЗЕ ОКСИЛИПИНОВ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

В статье обсуждается сравнительная характеристика гемопротеинов, участвующих в метаболизме гидроперекисей жирных кислот растений и кораллов.

Ключевые слова: гемопротеины, цитохромы P450, каталазы, оксилипины

Gorina S.S. Toporkova Ya.Yu.
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of KazNC RAS

COMPARATIVE ANALYSIS OF HEMOPROTEINS (CYTOCHROME P450 AND CATALASE) PARTICIPATING IN THE BIOSYNTHESIS OF OXYLIPINS IN PLANTS AND ANIMALS

The article discusses the comparative characteristics of hemoproteins involved in the metabolism of fatty acid hydroperoxides in plants and corals.

Keywords: hemoproteins, cytochromes P450, catalases, oxylipins

Введение

Оксилипины – окисленные производные полиеновых жирных кислот – представляют собой обширный класс биологически значимых метаболитов, образующихся как при участии ферментов, так и неферментативным путем. Эти соединения широко представлены в аэробных организмах (животных, растениях, бактериях, водорослях и др.) [1; 2]. В растительных организмах они участвуют в регуляции роста, клеточной дифференцировке, морфогенезе, органогенезе, формировании устойчивости растений к различным биотическим и абиотическим стрессорам [3], а также обуславливают ценные органолептические и лекарственные свойства [4; 5]. Оксилипины животных обладают сходными функциями, отвечая за поддержание гомеостаза и генерацию иммунного ответа [6].

Ферментативное преобразование полиеновых жирных кислот происходит при участии диоксигеназ, включающих липоксигеназы, циклооксигеназы [3], альфа-диоксигеназы, которые продуцируют гидроперекиси жирных кислот и эндоперекиси [7]. Последующее превращение может происходить при участии цитохромов суперсемейства P450. В растениях одним из ключевых путей биосинтеза оксилипинов является липоксигеназный

каскад. Его первая стадия инициируется липоксигеназами, катализирующими превращение линолевой и альфа-линоленовой кислот в соответствующие гидроперекиси, которые в дальнейшем преобразуются при участии цитохромов P450 семейства CYP74: алленоксидсинтаз (АОС), гидропероксидлиаз (ГПЛ), дивинилэфирсинтаз (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтаз (ЭАС). В то время как большинство цитохромов P450 являются монооксигеназами и требуют последовательной поставки двух электронов через различные типы окислительно-восстановительных партнеров, ферменты CYP74 катализируют превращение субстрата с помощью независимой внутримолекулярной системы переноса (Рис. 1). Вследствие этого, у них отсутствует необходимость в молекулярном кислороде и восстановительных партнерах для протекания реакции [8; 9]. У животных, в том числе у человека, второй этап превращения гидроперекисей и эндоперекисей осуществляется при участии тромбоксансинтаз и простагландинсинтаз, приводящих к биосинтезу эйкозаноидов – обширной группы оксипинов, образуемых из полиеновых жирных кислот, содержащих 20 углеродных атомов, таких как арахидоновая кислота [6].

У беспозвоночных животных, таких как коралловые полипы, было показано, что за биосинтез ряда оксипинов отвечают не цитохромы P450, а каталазы. Хотя в большинстве своем каталазы это группа гемопротеинов, известная своей ролью в метаболизме перекиси водорода, ферменты, описанные у кораллов, участвуют в метаболизме гидроперекисей жирных кислот с образованием соединений, подобных продуктам АОС реакции, поэтому данные ферменты были обозначены как каталазо-подобные алленоксидсинтазы [10; 11].

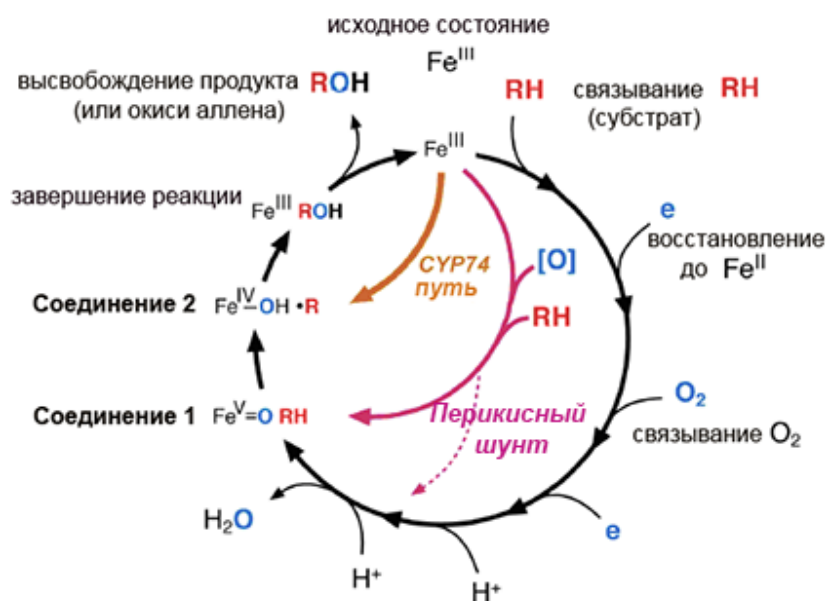


Рисунок 1. Каталитический цикл цитохромов P450. Классический монооксигеназный путь показан черными стрелками (полный круг). Каталитический цикл, осуществляемый ферментами CYP74, тромбоксансинтазами и простагландинсинтазами показан оранжевой стрелкой [8].

Цель данного исследования заключалась в сравнительной характеристике гемопротеинов, участвующих в метаболизме гидроперекисей жирных кислот растений и кораллов.

Материалы и методы

Выбор ферментов биосинтеза оксипинов у представителей растений и кораллов проводили путем биоинформационного скрининга геномных и транскриптомных баз данных (NCBI, Phytozome, Ensembl Metazoa, PlantGDB) с помощью программ BLASTX и BLASTP относительно референсной последовательности АОС *Arabidopsis thaliana*

(AtAOS, NP_199079.1). Парное и множественное выравнивание аминокислотных последовательностей относительно охарактеризованного фермента AtAOS1 проводили на основе пакета программ Vector NTI Advance и Mega7. Конструирование праймеров для молекулярного клонирования целевых генов осуществляли с использованием программы Vector NTI Advance. Амплификацию открытых рамок считывания целевых генов проводили с применением высокоточной полимеразы KOD Hot Start DNA Polymerase (Merck KGaA, Германия) в термоциклере C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Открытые рамки считывания (ОРС) целевых генов клонировали с использованием векторной системы pGemT и pGemT-Easy (Promega, США) по прилагаемому протоколу производителя. Для получения рекомбинантных белков ОРС целевых генов клонировали в экспрессирующие векторы системы pET (Novagen, США). В качестве продуцентов использовали штаммы *E. coli* BL21(DE3)pLysS и Tuner(DE3)pLysS (Novagen, США).

Результаты и обсуждение

В качестве объектов исследований выступали представители семейства CYP74 растений *Solanum tuberosum*, *Linum usitatissimum*, *Asparagus officinalis*, *Daucus carota*, а также предполагаемые каталазо-подобные ферменты кораллов *Dendronephthya gigantea* и *Acropora millepora*.

Множественное выравнивание целевых последовательностей относительно референсной последовательности охарактеризованного фермента AtAOS *Arabidopsis thaliana* (NP_199079.1) показало, что в структуре целевых последовательностей растений присутствуют характерные для всех цитохромов P450 домены и аминокислотные мотивы, такие как ERR-триада (формируемая мотивами ETLR и P(E/D)RF) и аминокислотный остаток цистеина (пятый лиганд гемового железа) в гем-связывающем домене, а также отличительные особенности, присущие ферментам CYP74 и определяющие их катализ, а именно «F/L toggle» и гидропероксид-связывающий домен (ГСД). В то же время, анализ первичных последовательностей кораллов показал, что они состоят из трех доменов: домена, относящегося к белкам семейства каталаз, PLAT-домена и липоксигеназного домена, что соответствует архитектуре охарактеризованной каталазо-подобной АОС *Plexaura homomalla* (Ph-cAOS-LOX, O16025.1). Таким образом, анализируемые последовательности растений принадлежат к одной группе гемопротеинов - цитохромам P450, тогда как ферменты кораллов к другой – каталазам.

Интересно, что обладая различающейся структурой белковых молекул (Рис. 2), эти ферменты катализируют образование одинаковых по своим структурным особенностям оксипинов, например, в случае АОС растений и охарактеризованного фермента *P. homomalla* (Ph-cAOS-LOX, O16025.1) короткоживущих окисей аллена.

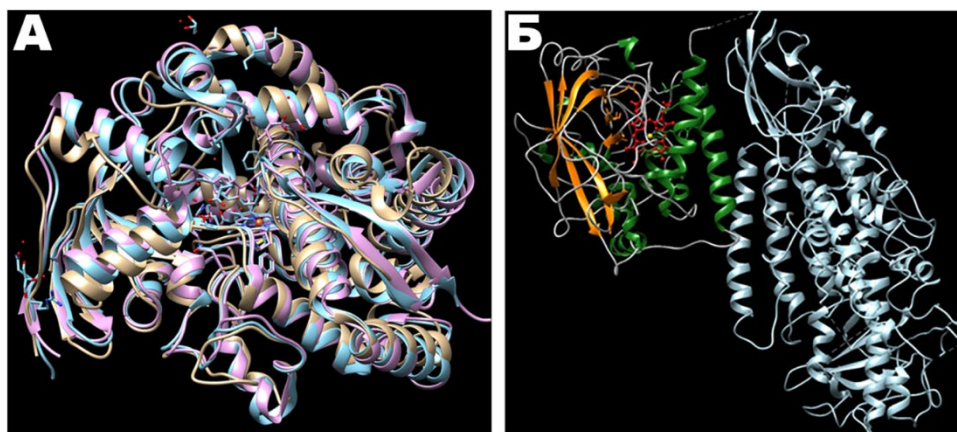


Рисунок 2.

А) Результат наложения нескольких третичных структур ферментов CYP74 растений, включая охарактеризованную AtAOS;

Б) модель трехмерной структуры белка Ph-cAOS-LOX.

В растениях окиси аллена образуются из C18 гидроперекисей жирных кислот и подвергаются либо спонтанному гидролизу (с образованием кетолов), либо спонтанной или ферментативной циклизации с образованием циклопентенонов, например, 12-ОФДК. Образование окиси аллена при участии фермента Ph-cAOS-LOX происходит из (8*R*)-гидроперекиси эйкозатетраеновой кислоты и претерпевает сходные преобразования (Рис. 3). Вышеописанные реакции являются ярким примером конвергентной эволюции метаболических путей, когда основным является конечный продукт; при этом ферменты, катализирующие его образование у разных организмов, могут быть разными.

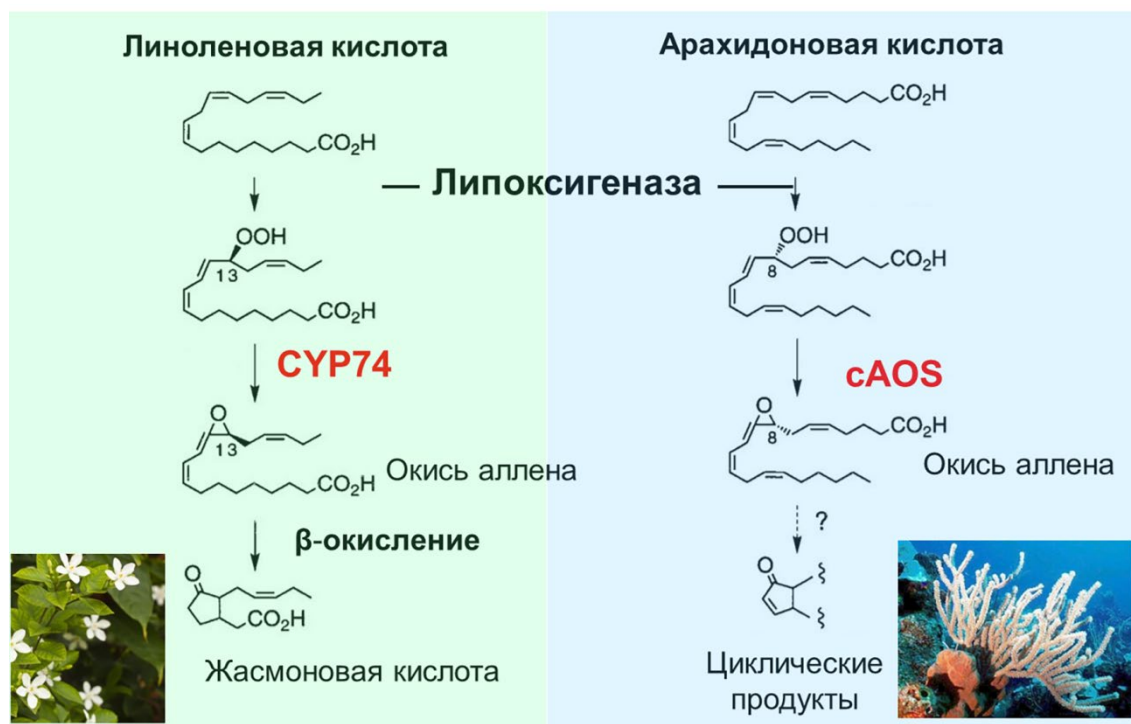


Рисунок 3. Сопоставление путей биосинтеза окисей аллена в растениях и кораллах [12].

Поскольку состав оксипинов и ферментов их биосинтеза отличается не только у разных видов растений, но также зависит от состояния растительного организма, для установления наличия определенных классов оксипинов и их биологического значения было проведено профилирование оксипинов интактных растений и растений, подвергнутых стрессу, методом газовой хромато-масс-спектрометрии. В качестве модельного объекта выступали растения *S. tuberosum*, подвергнутые окислительному и солевому стрессу. Хотя одним из основных сигнальных медиаторов среди оксипинов являются производные жасмоновой кислоты – продукта АОС пути – увеличение продуктов этой ветви метаболизма по сравнению с контрольными растениями не происходило. В профиле преобладали 9-гидроперекиси жирных кислот (линолевой и альфа-линоленовой), а также различные изомеры эпокиспиртов – продуктов ЭАС пути. В геноме *S. tuberosum* присутствует 6 генов CYP74, два из которых были нами охарактеризованы. Один из них кодирует фермент CYP74B3, обладающий наряду с ГПЛ активностью дополнительной минорной ЭАС активностью [13]. Другой ген кодирует дуалистичный фермент CYP74C4, обладающий двойной ГПЛ/ЭАС активностью [14]. Интересно, что в ходе наших исследований каталазо-подобных ферментов кораллов было также обнаружено, что они наряду с основной могут обладать дополнительной активностью. При этом среди каталазо-подобных ферментов кораллов, также как среди ферментов CYP74 рас-

тений, присутствуют АОС, ЭАС и ГПЛ. До настоящего времени не описаны только каталазо-подобные ферменты, обладающие ДЭС активностью. Таким образом, метаболические пути биосинтеза оксипинов растений и кораллов практически полностью идентичны по функционалу присутствующих ферментов и свидетельствуют о важности синтезируемых продуктов.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Впервые клонированы каталазо-подобные ферменты кораллов *D. gigantea* и *A. millepora*; показано, что растительные ферменты CYP74 могут обладать несколькими каталитическими активностями; биосинтез оксипинов растений и кораллов является ярким примером конвергентной эволюции метаболических путей, когда основным является конечный продукт.

Работы изучению ферментов CYP74 *S. tuberosum* и их метаболитов выполнены при финансовой поддержке гранта МК-903.2020.4. Работы по изучению каталазо-подобных ферментов кораллов проводились при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-04-01069-а. Культивирование растений *S. tuberosum* проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".

Литература

- [1] William H. Gerwick, Philip J. Proteau, Dale G. Nagle, Mitchell L. Wise, Zhi D. Jiang, Matthew W. Bernart, Mats Hamber. Biologically active oxylipins from seaweeds. *Hydrobiologia*, 1993. V. 260. P. 653–665
- [2] Göbel C., Feussner I. Methods for the analysis of oxylipins in plants. *Phytochemistry*. 2009. V. 70. P. 1485-1503.
- [3] Wasternack C, Feussner I. The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annu Rev Plant Biol*, 2018. V. 69. P. 363-386.
- [4] Kiritsakis A.K. Flavor components of olive oil. Review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998. V. 75. P. 673–681
- [5] Chi-Tang Ho, Xin Zheng, Shiming Li. Tea aroma formation. *Food Science and Human Wellness*, 2015. V. 4. P. 9-27
- [6] Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Review. *Science*, 2001. V. 294. P. 5548):1871-1875.
- [7] Hamberg M, Ponce de Leon I, Rodriguez M.J., Castresana C. Alpha-dioxygenases. Review. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. V. 338. P. 169-74.
- [8] Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry*, 2009. V. 70. P. 1522-1531.
- [9] Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova .FK., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017. V. 1862. P. 1099-1109.
- [10] Koljak R., Boutaud O., Shieh B.H., Samel N., Brash A.R. Identification of a naturally occurring peroxidase-lipoxygenase fusion protein. *Science*, 1997. V. 277 P. 1994–1996.
- [11] Boeglin W.E., Brash A.R. Cytochrome P450-type Hydroxylation and Epoxidation in a Tyrosine-liganded Hemoprotein, Catalase-related Allene Oxide Synthase *J Biol Chem*, 2012. V. 287. P. 24139-24147.
- [12] Tijet N., Brash A. Allene oxide synthases and allene oxides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002. V. 68-69. P. 423-431.
- [13] Toporkova Y.Y., Askarova E.K., Gorina S.S., Ogorodnikova A.V., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Epoxyalcohol synthase activity of the CYP74B enzymes of higher plants. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020. V. 1865. P. 158743.
- [14] Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Bessolitsyna E.K., Smirnova E.O., Fatykhova V.S., Brühlmann F., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Double function hydroperoxide

lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018. V. 1863. P. 369-378.

Сведения об авторах

Светлана Сергеевна Горина

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: gsvetlana87@gmail.com

Казанский институт биохимии и биофизики

КазНЦ РАН

Казань, Россия

Яна Юрьевна Топоркова

канд. биол. наук, вед. науч. сотр.

Эл. почта: yanchens@yandex.ru

Казанский институт биохимии и биофизики

КазНЦ РАН

Казань, Россия

Information about authors

Svetlana Sergeevna Gorina

PhD, Senior Researcher

E-mail: gsvetlana87@gmail.com

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of KazNC

RAS

Kazan, Russia

Yana Yurievna Toporkova

PhD, Leading researcher

E-mail: yanchens@yandex.ru

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of KazNC

RAS

Kazan, Russia

УДК 543.544.613.2:615.916

ГРНТИ 34.17.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.49

¹Текуцкая Е.Е., ¹Рябова И.С., ²Гусарик Л.Р.

Кубанский государственный университет

²Кубанский государственный медицинский университет

**СТЕПЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК *IN VITRO*, КАК
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПРЕДИКТОР НАРУШЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИМИ И ЭКЗОГЕННЫМИ ФАКТОРАМИ**

В работе изучены механизмы окислительных повреждений молекул ДНК, выделенной из цельной крови здоровых доноров и больных эпигенетическим заболеванием (буллезным эпидермолизом) при воздействии переменным магнитным полем низкой частоты in vitro, связанные с образованием активных форм кислорода.

Ключевые слова: 8-гидрокси-2-деоксигуанозин, активные формы кислорода, буллезный эпидермолиз, переменное магнитное поле, флуоресцентная спектроскопия

¹Tekutskaya E.E., ¹Raybova I.S., ²Gusaruk L.R.

¹Kuban State University

²The Kuban state medical university

**THE DEGREE OF OXIDATIVE DAMAGE TO DNA IN VITRO AS A MOLECULAR
PREDICTOR OF DISORDERS CAUSED BY EPIGENETIC AND EXOGENOUS FAC-
TORS**

In this work, we studied the mechanisms of oxidative damage to DNA molecules isolated from whole blood of healthy donors and patients with epigenetic disease (epidermolysis bullosa) when exposed to an alternating magnetic field of low frequency in vitro, associated with the formation of reactive oxygen species.

Keywords: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, reactive oxygen species, epidermolysis bullosa, alternating magnetic field, fluorescence spectroscopy

Введение

Переменные магнитные поля низкой частоты (МП НЧ) занимают особое место в медицинских исследованиях особенно в области лечения рака и обезболивании [1 - 4]. Сообщается, что сочетание МП с химиотерапевтическими препаратами имеет многообещающие результаты [4]. Предполагается, что под действием МП может изменяться скорость диффузии через биологические мембраны, ориентация и конформация биологических макромолекул, а также состояние свободных радикалов [1]. МП НЧ не вызывают тепловые эффекты напрямую, эти поля могут воздействовать опосредованно, изменяя концентрацию или активность некоторых кинетически значимых молекул в водном растворе. Одним из ключевых биомаркеров окислительных повреждений нуклеиновых кислот, опосредованных с генерацией активных форм кислорода (АФК), является образование 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG) в ДНК [5]. Уровни содержания 8-OHdG и его аналогов 8-гидроксигуанозина и 8-гидроксигуанина связаны со многими дегенеративными заболеваниями. Появление в генетическом материале клетки 8-охоG приводит к дестабилизации генома, повышение уровней содержания 8-OHdG и его аналогов 8-гидроксигуанозина и 8-гидроксигуанина связывают с мутагенезом, старением и воспалением [6].

В качестве эндогенного фактора, влияющего на динамику ДНК, выбран буллезный эпидермолиз (Epidermolysis bullosa) (БЭ). БЭ - клинически и генетически гетерогенная группа орфанных заболеваний, характеризующихся врожденной склонностью к образованию булл (пузырей) на коже и слизистых оболочках пищевода, кишечника, дыхательной системы. Заболевание обусловлено 1500 мутациями более чем в восемнадцати различных генах структурных белков дермо-эпидермального соединения (KRT5 и KRT14, LAMB3, LAMA3, LAMC2, COL17A1 и др.) [7].

Цель работы заключалась в оценке степени окислительных повреждений ДНК периферической крови здоровых доноров и больных буллезным эпидермолизом, вызванных появлением АФК после воздействия переменным МП в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vitro* с помощью определения уровня содержания 8-OHdG в ДНК с использованием иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

Объектом исследований были образцы сыворотки крови, собранные у добровольцев (мужчины 20-25 лет, некурящие, $n = 10$) и водные растворы ДНК. Сведения о больных БЭ в регионах Краснодарского края, их возрасте, типе заболевания, были получены по данным информационного центра департамента здравоохранения Краснодарского края.

Выделение ДНК из крови человека проводили с помощью реактивов готовых коммерческих наборов АмплиСенс – «ДНК-сорб-В» (Москва) сорбционным способом по методике, подробно описанной в работах [8-10]. Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции, равный $E_{260\text{nm}} = 200$.

Обработка проб электромагнитным полем. Обработку проб сыворотки крови переменным МП проводили в химически чистой стерильной пластиковой посуде при температуре 20–22⁰С и толщине облученного слоя 2 мм. В ходе экспериментов использовалось разработанное нами устройство для автоматизированного исследования биологических жидкостей в переменном МП, описанное в [11]. Эффективное значение напряженности МП в месте нахождения образца составляло $(550 \pm 30 \text{ А/м})$. Измерение напряженности МП производилось прибором «Экофизика-110А» с цифровым измерительным преобразователем для измерения переменных электрических и магнитных полей ПЗ-80-ЕН500.

Степень окислительных повреждений ДНК оценивали по уровням концентрации

8-охоG в сыворотке крови. Для количественного определения 8-гидрокси-2-деоксигуанозина в ДНК использовали иммуноферментный анализ с применением моноклональных антител, специфичных к 8-OHdG. Чувствительность метода Stress Xpress DNA Damage ELISA составила 0.59 нг/мл. Диапазон калибровочной кривой составил 0,94 - 60 нг/мл. Измерения проводили на микропланшетном иммуноферментном анализаторе Multyscan (Финляндия) при длине волны 450 нм. Флуоресцентные исследования проводили на спектрофлуориметре Hitachi F-2700 (Япония)

Лабораторное диагностическое обследование выполнено в соответствии с обязательным соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 г. с дополнениями 1983 года.

Результаты обрабатывали статистически (ПО StatPlus). Достоверность различий между выборками оценивали, используя непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [12].

Полученные результаты

Длины волн возбуждения флуоресценции $\lambda_{\text{возб}}$ в растворах ДНК подбирались таким образом, чтобы возбуждались пиримидиновые основания ДНК [13]. Известно, что полоса поглощения УФ-излучения молекулами ДНК составляет от 160 до 315 нм и наибольшее разрушающее действие на ДНК оказывает $\lambda_{\text{max}} = 253,7$ нм [13]. Ближний УФ-диапазон, как известно, делится на УФ-А: 400 – 315 нм (3,10 ÷ 3,94 эВ); УФ-В: 315 – 280 нм (3,94 ÷ 4,43 эВ) и УФ-С (поглощается озоновым слоем): 280 – 100 нм (4,43 ÷ 8,05 эВ) [14]. Резонансный пограничный УФ-АВ не разрушает, не ионизирует, а лишь возбуждает молекулу ДНК. Таким образом, оптимальной длиной волны возбуждения была взята $\lambda_{\text{возб}} = 320$ нм.

На спектрах флуоресценции растворов ДНК с концентрациями $2,5 \cdot 10^{-3}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл в диапазоне от 320 до 720 нм отмечали два характерных максимума интенсивности флуоресценции в области длин волн 415 ± 10 нм и 640 ± 5 нм (рис. 1). Наблюдаемый на спектрах флуоресценции растворов ДНК первый максимум связан с наличием в составе молекул ДНК хромофоров, поглощающих УФ-излучение, - сопряженные π -связи азотистых оснований [14]. Полученный пик не совпадает с максимумом интенсивности флуоресценции гуанина, как это указывается авторами [15]. Второй максимум соответствует образованию в водном растворе синглетного кислорода, который может образовывать возбужденные димеры кислорода ($^1\text{O}_2$)₂, переходящие в основное состояние с испусканием света в видимом диапазоне при 635 нм [16].

Наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции области 640 ± 5 нм по сравнению с контролем (раствором ДНК соответствующей концентрации без обработки МП) всех исследуемых растворов ДНК при обработке переменным МП частотами 5, 30 и 50 Гц. Кроме того, по мере уменьшения концентрации ДНК в водном растворе до $1 \cdot 10^{-5}$ мг/мл ($\sim 1 \cdot 10^{-9}$ М) интенсивность флуоресценции увеличивается при обработке растворов переменным МП с частотами от 20 до 35 Гц.

Полученные результаты согласуются с результатами работ Коновалова и сотр. [17], и, возможно, свидетельствуют о том, что в области низких концентраций ДНК в водном растворе при воздействии переменного МП может происходить образование ассоциатов системообразующей матрицы - воды, содержащей пространство как для молекул ДНК, так и для растворенного кислорода. При увеличении концентрации молекул воды увеличивается ассоциированность водосодержащего компонента и биохимическая активность растворенных молекул ДНК из-за передачи потенциальной энергии от ридберовски возбужденного водосодержащего ассоциата на ридберовские уровни ДНК, как предположил Авакян С.В. [18]. Это может способствовать более ускоренному переходу растворенного кислорода из триплетного в синглетное состояние в разбавленных растворах, увеличению времени жизни синглетного кислорода и запуску каскада циклических взаимопревращений АФК,

В наиболее разбавленных растворах ДНК после обработки переменным МП с соответствующими частотами определили количественное содержание перекиси водорода с использованием набора «PerOx. Метод определения перекисей» (Immun Diagnostic AG, Германия). Увеличение содержания H_2O_2 в растворах ДНК наблюдается после обработки МП с частотами 3, 4, 8, 50 Гц (рис.2).

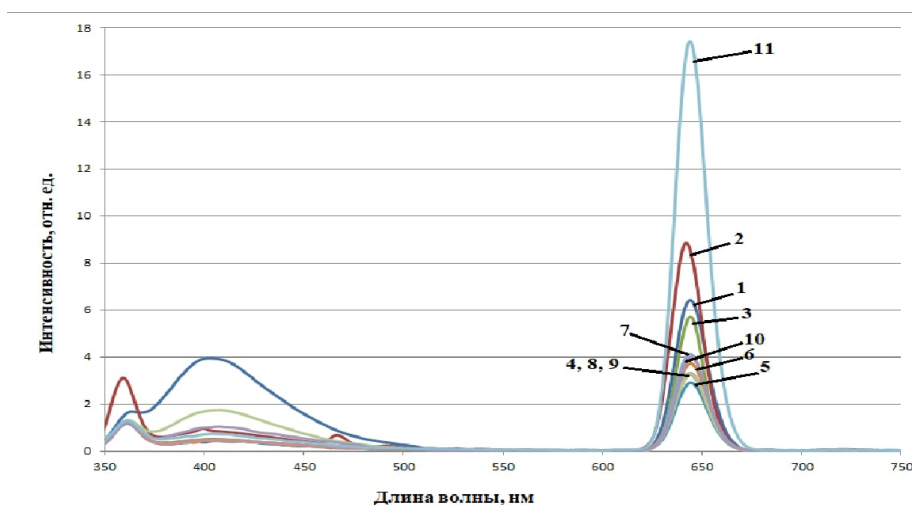


Рис. 1. Обзорные спектры флуоресценции водных растворов ДНК с концентрацией 0,00025 мг/мл после обработки МП, $\lambda_{\text{возб}} = 320$ нм, $t^{\circ} = 23^{\circ}$ С. кривая 1 – контроль; кривая 2 — 5 Гц; кривая 3 — 10 Гц; кривая 4 — 35 Гц; кривая 5 — 20 Гц; кривая 6 — 15 Гц; кривая 7 — 30 Гц; кривая 8 — 40 Гц; кривая 9 — 45 Гц; кривая 10 — 25 Гц; кривая 11 — 50 Гц

Образцы периферической крови доноров обрабатывались МП с частотами 3, 30 и 50 Гц. При этих частотах наблюдалось наибольшее образование АФК в растворах ДНК, согласно данным, приведенным на рис. 1. Уровни концентрации 8-охоГ в ДНК сыворотки крови здоровых лиц (контрольная группа) и больных БЭ до и после обработки ЭПМ частотами 3, 30 и 50 Гц представлены на рисунке 3. В контрольной группе этот параметр варьируется от 4 до 11 нг/мл, в среднем составляя $7,7 \pm 1,41$ нг/мл. В группе больных БЭ уровень содержания 8-охоГ в ДНК изменяется от 10 до 22 нг/мл и в среднем достигает $14,8 \pm 2,12$ нг/мл. Это свидетельствует о том, что степень окислительного повреждения ДНК при БЭ почти в два раза выше по сравнению с контрольной группой. После обработки образцов МП наблюдается достоверное повышение уровней содержания 8-охоГ в ДНК сыворотки крови для обеих групп (рис. 3).

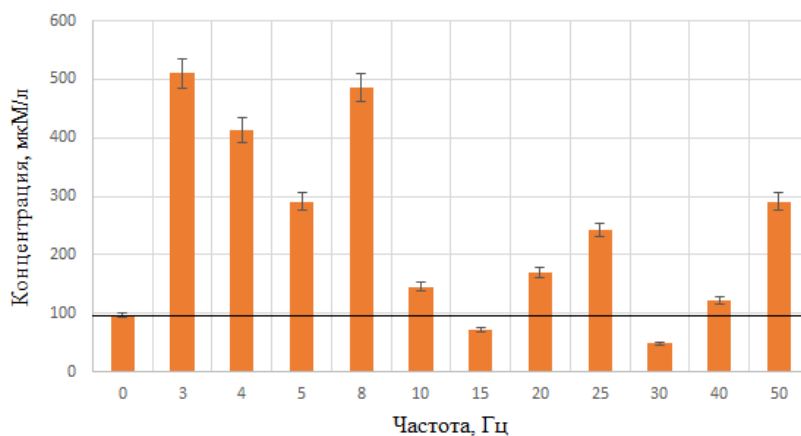


Рис. 2. – Содержание перекиси водорода до (0 Гц) и после воздействия переменным МП с различными частотами в водных растворах ДНК с концентрацией 0,000025 мг/мл, 21° С ($n = 5$, $p = 0,95$, $t_{0,95} = 2,78$)

Обнаруженное двукратное увеличение содержания 8-охоG в ДНК сыворотки крови больных БЭ могло привести к структурным изменениям спирали ДНК, представляющей из себя практически жесткие кольца оснований с несколькими протон-донорными и протон-акцепторными центрами и конформационно лабильный сахаро-фосфатный остов со множеством степеней свободы. При повышении содержания 8-охоG в ДНК возможно изменение конформации ДНК за счет изменения торсионных углов сахаро-фосфатного остова из-за увеличения массы окисленных азотистых оснований или нарушения стэкинга азотистых оснований [8]. Это может оказывать определенное влияние на изменение активности соответствующих генов в промоторных участках ДНК больных БЭ.

Наблюдаемое изменение количества 8-оксогуанина в ДНК не может быть вызвано депуринизацией модифицированного основания, так как данная модификация приводит не к ослаблению, а к повышению устойчивости гликозидной связи. Поскольку 8-оксогуанин имеет более низкий окислительно-восстановительный потенциал, чем природные основания, он в большей степени подвержен дальнейшему окислению [1]. Возможно, что под действием ЭМП с частотой 3 Гц происходит дальнейшее окисление 8-оксогуанина до таких продуктов, как оксазолон, гуанидиногидантоин и спироиминодигидантоин [1]. Таким образом, при воздействии ЭМП с низкими частотами от 3 до 30 Гц скорость доокисления 8-оксогуанина сопоставима со скоростью окисления нативных гуанинов ДНК. Скорость образования продуктов окисления азотистых оснований под действием ЭМП зависит от концентрации кислорода в растворе.

В организме выработана многоуровневая система защиты и репарации повреждений, возникающих при действии АФК на ДНК. Повышенное содержание 8-охоG в ДНК сыворотки крови больных БЭ может служить биологическим маркером физиологического неблагополучия организма. Очевидно, что для восстановления повреждений ДНК, вызванных действием АФК, требуются не только ферменты антиоксидантной защиты, но и ферменты эксцизионной репарации. По-видимому, их функционирование при БЭ резко снижено, что не позволяет обеспечить восстановление структуры ДНК. С другой стороны, накопление 8-охоG в ДНК, возникающее при воздействии НЧ МП, может приводить к появлению новых мутаций, в том числе и таких, которые в целом ослабляют процессы репаративной регенерации. Тем самым воздействие НЧ МП поддерживает и усиливает уже развившийся окислительный стресс у больных БЭ.

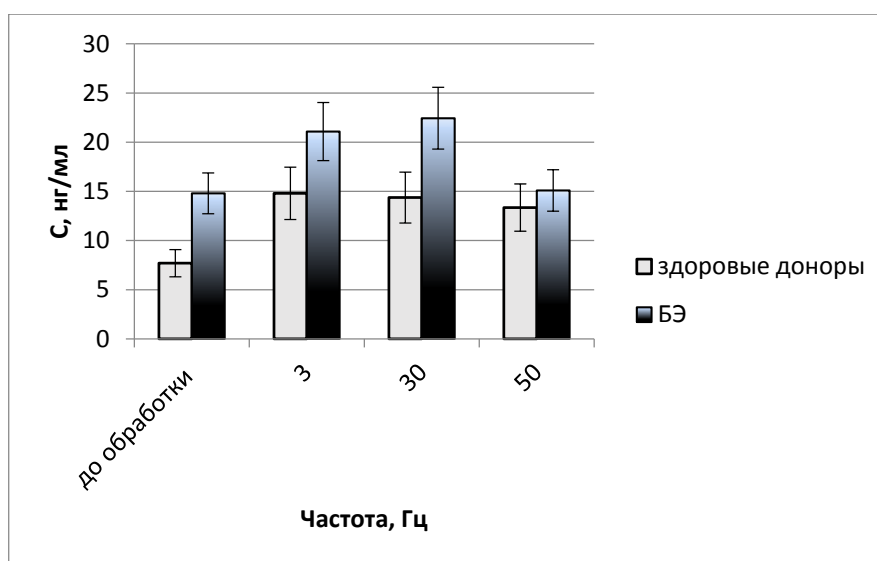


Рис.3. Содержание 8-охоG в сыворотке крови здоровых доноров (контроль) и больных буллезным эпидермолизом (БЭ), после обработки переменным магнитным полем с частотами 3, 30 и 50 Гц ($U_{\text{эмп}} = 1,5$ $U_{\text{кр}} = 3$ при $p < 0,01$; $U_{\text{кр}} = 7$ при $p < 0,05$)

Таким образом, появление и накопление окислительных повреждений 8-OHdG в ДНК после обработки крови здоровых доноров и больных БЭ МП может свидетельствовать с одной стороны о генерации АФК при воздействии НЧ МП, а с другой – об участии АФК в повреждении ДНК.

Заключение

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

Повышение уровня концентрации 8-охоG в ДНК почти в два раза в выборке больных БЭ свидетельствует о нарушении структуры молекулы ДНК и о значительных окислительных повреждениях в ней при данной патологии.

Генерация АФК при воздействии переменным МП на образцы крови *in vitro* приводит к накоплению содержания 8-охоG в ДНК и дальнейшему нарушению процессов репарации ДНК, тем самым оказывая существенное влияние на функциональные метаболические свойства биосистем в целом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научного проекта № 20.1/119

Литература

1. F.I. Wolf, A. Torsello, B. Tedesco, S. Fasanella, A. Boninsegna et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1743, 120 (2005)
2. C.A. Buckner, A.L. Buckner, S.A. Koren, M.A. Persinger et al., *PLOS ONE* | doi:10.1371/journal.pone.0124136 (2015)
3. T. Wang, Y. Nie, S. Zhao, Y. Han et al., *Bioelectromagnetics*, 32 (6), 443 (2011)
4. F. Sanie-Jahromi, M. Saadat, *Mol. Biol. Reports* <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4223-7> (2018)
5. Смирнова, С.В. 8-оксогуанин и продукты его окисления. Образование в ДНК под действием тепла, ионов уранила и гамма-излучения / В.С. Смирнова, С.В. Гудков, В.И. Брусков. - Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2011. – 152 с.
6. X. Ba, L. Aguilera-Aguirre, Q.T. Rashid, A. Bacsı et al., *Int. J. Mol. Sci.* 15, 16975 (2014)
7. Cutlar L., Greiser U., Wang W. Gene therapy: pursuing restoration of dermal adhesion in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Experimental Dermatology*, 2014; 23: 1-6.
8. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Гусарук Л.Р., Ильченко Г.П. Окислительные повреждения ДНК при действии переменного магнитного поля // *Биофизика*, 2020. Т.65, №.4, С.664-669 DOI: 10.31857/S0006302920040055
9. Текуцкая Е.Е., Василяди Р.В. Скрининг однонитевых разрывов ДНК лимфоцитов периферической крови человека при действии внешних факторов // *Экология Человека* 2017 №.12. С. 9-14
10. Текуцкая Е.Е., Чебочинов К.В., Прокофьев А.С. Действие электромагнитного поля низкой частоты на белки плазмы крови // *International Research Journal* №2 (44) Ч.3, 2016 С. 38-40
11. Ильченко Г.П., Барышев М.Г., Текуцкая Е.Е., Шелистов В. С., Никитин А.В. Устройство для поиска оптимальных параметров обработки биологических объектов переменным магнитным полем // *Измерительная техника* 2017 №.6. С. 69-72
12. Герасимов, А. Н. Медицинская статистика / А.Н. Герасимов – М: ООО Медицинское информационное агентство, 2007. – 480 с.
13. Ихлов Б.Л. Спектры ДНК. Обзор // *Вестник новых медицинских технологий*. 2018.Т. 25, №2. С.121 – 134
14. Evdokimov Yu.M., Salyanov V.I., Kats E.I., Skuridin S.G. Structural nanotechnology of nucleic acids: liquid-crystal approach // *Biophysics*. 2013; 58:987–1004

15. Chernitskii E. A., Slabozhanin E. I. Spectral luminescent analysis in medicine - M.: Science and Technology. 1989; 141 p.
16. Мальцев Д. В. Хемилюминесценция синглетного кислорода и его димоля ($^1\text{O}_2$)₂ в реакциях пероксидов. Влияние 1,4-дiazобикло [2,2,2] октана на излучательные свойства ($^1\text{O}_2$)₂. Дисс. канд. химических наук. Уфа. 2007. 142с.
17. Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Коновалов А.И. Действие внешнего электромагнитного поля – условие образования наноассоциатов в высокоразбавленных водных растворах // ДАН. 2011. Т. 440, №6. С. 778-781
18. Авакян С.В., Баранова Л.А. Влияние электромагнитного излучения окружающей среды на ассоциатообразование в водных растворах // Биофизика. 2019. Т. 64, вып. 1. С. 12-20

Сведения об авторах

Елена Евгеньевна Текуцкая

канд. хим. наук, доцент

Эл. почта: tekytska@mail.ru

Кубанский государственный университет

Краснодар, РФ

Ирина Сергеевна Рябова

магистрант

Эл. почта: iren_141713@mail.ru

Кубанский государственный университет

Краснодар, РФ

Любовь Рамазановна Гусарук

канд. биол. наук, доц.,

Эл. почта: gusaruk@yandex.ru

Кубанский государственный медицинский университет

Краснодар

Краснодар, РФ

Information about authors

E.E. Tekutskaya

candidate of chemical Sciences, associate Professor

E-mail: tekytska@mail.ru

Of the Kuban state University

Krasnodar, Russia

I.S. Raybova

Undergraduate

Email: iren_141713@mail.ru

Of the Kuban state University

Krasnodar, Russia

Lyubov Ramazanovna Gusaruk

candidate of Biol. Sciences, associate Professor

Email: gusaruk@yandex.ru

Kuban State Medical University

Krasnodar, Russia

УДК 577.334

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.50

^{1,2}Шумаев К.Б., ¹Космачевская О.В., ³Грачев Д.И.,

¹Топунов А.Ф., ⁴Мартусевич А.К., ^{2,3}Рууге Э.К.

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха,

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»

³МГУ им. М.В.Ломоносова

⁴ФГБУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Показано, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) перехватывают свободные радикалы, образующиеся при взаимодействии гемопротейнов с гидроперексидом трет-бутила, а также в ходе соокисления липидов и глюкозы. Таким образом, ДНКЖ действуют как антиоксиданты в условиях, моделирующих разные варианты окислительного стресса.

Ключевые слова: динитрозильные комплексы железа, оксид азота, свободные радикалы окислительный стресс, гемопротейны

^{1,2}Shumaev K.B., ¹Kosmachevskaya O.V., ²Grachev D.I.,¹Topunov A.F., ⁴Martusevich A.K., ^{2,3}Ruuge E.K.¹Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the RAS²National Medical Research Centre for Cardiology²Lomonosov Moscow State University⁴Privolzhsky Research Medical University

ANTIOXIDANT AND ANTIRADICAL PROPERTIES DINITROSYL IRON COMPLEXES UNDER CONDITIONS SIMULATING OXIDATIVE STRESS

We have demonstrated that dinitrosyl iron complexes (DNICs) eliminate free radicals formed during the interaction of hemoproteins with tert-butyl hydroperoxide, as well as during the co-oxidation of lipids and glucose. Thus, DNICs act as antioxidants under conditions simulating different types of oxidative stress.

Keywords: *dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, free radicals, oxidative stress, hemoproteins*

Введение

Известно, что при окислительном стрессе продуцируются активные формы кислорода и азота, которые участвуют процессах свободнорадикального окисления и в патогенезе ряда заболеваний [1, с.1-200]. Вместе с тем, в биологических системах оксид азота (NO) выступает в качестве как прооксиданта, так и антиоксиданта [2, pp.407-503]. Такое двойственное действие NO определяется его реакциями с редокс-активными соединениями, в том числе с другими свободными радикалами, ионами переходных металлов и тиолами. В результате взаимодействия NO с гемовым и негемовым железом образуются нитрозильные комплексы железа. С этими комплексами связаны сигнальные и регуляторные функции NO [7, pp. 15–29]. Также нами было показано, что динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) обладают антиоксидантной и антирадикальной активностью [3, с.699-705; 4, pp.37-46; 5, pp.445-461; 6, pp.237-244]. В тиолсодержащих моноядерных ДНКЖ ион железа координирован с двумя нитрозильными (NO^+) и двумя тиольными лигандами (RS^-) {общая формула: $(\text{RS}^-)_2\text{Fe}^+(\text{NO}^+)_2$ }. Лигандами этих ДНКЖ могут быть низкомолекулярные тиолы и SH-группы цистеиновых остатков белков. С другой стороны, лигандами ДНКЖ могут быть остатки гистидина и анионы фосфата. Считается что, с антиоксидантными свойствами содержащих глутатион комплексов (GS-ДНКЖ) связано их цитопротекторное действие в ходе индуцированного гипохлоритом гемолиза эритроцитов [8, pp.1-12], а также в условиях окислительного стресса при ишемическом поражении сердечной ткани [9, pp. 583-593].

Цель работы.

Поскольку механизмы антиоксидантного действия ДНКЖ до конца не выяснены мы провели исследование взаимодействия этих метаболитов NO со свободными радикалами, образующимися в различных системах, моделирующих окислительный стресс.

Материалы и методы.

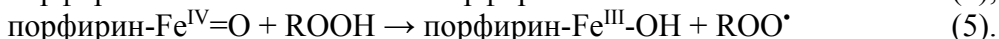
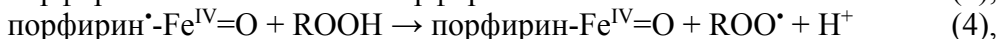
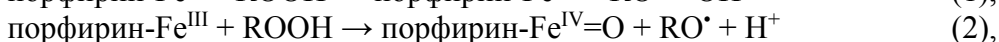
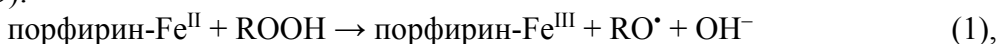
ДНКЖ с фосфатными лигандами получали, пропуская в сосуде Тунберга газообразный оксид азота через раствор FeSO_4 в 100 мМ К,Na-фосфатном буфере (рН 6,8). Для получения ДНКЖ связанных с глутатионом или гемоглобином к фосфатным комплексам добавляли восстановленный глутатион (GSH) и гемопротейн, в результате чего Fe-NO группа переходила на новые лиганды. Концентрацию парамагнитных ДНКЖ и аддуктов спиновой ловушки DEPMPO с свободными радикалами оценивали с помощью ЭПР спектроскопии. Спектры ЭПР записывали при комнатной температуре (25°C) на спектрометре E-109E фирмы Varian (США).

Для получения однослойных липосом использовали микроэкструдер LiposoFast (Avestin, Ottawa, Canada). Липосомы имели диаметр 80 ± 25 nm и содержали эквимольные концентрации лецитина эквимольной (яичного фосфатилхолина) и липофильного азоинициатора - AIBN (азобисизобутиронитрил). Перекисное окисление инициировали свободные радикалы, образующиеся при термической декомпозиции AIBN. Люминол-зависимую хемиллюминесценцию регистрировали на люминометре Lum-5773 при температуре 50°C и постоянном перемешивании реакционной смеси. Кроме липосом, реакционная смесь содержала 0,2 мМ люминола, 12,5 мМ глюкозы, а также 0,1 М K_2Na -фосфатный буфер (pH 7,8).

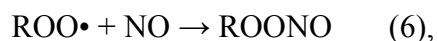
В работе использовали бычий гемоглобин, цитохром *c*, гидропероксид трет-бутила, AIBN, люминол, лецитин, восстановленный глутатион и другие реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Спиновая ловушка DEPMPO (5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин N-оксида) и донор оксида азота PAPA/NONO (3-(2-гидрокси-2-нитрозо-1-пропилгидразино)-1-пропанамин) были получены от фирмы Sauman Chemical Europa (Эстония).

Полученные результаты.

Усиление свободнорадикального окисления биомолекул может быть обусловлено взаимодействием гемопротеинов с различными гидропероксидами, в том числе липидными гидроперекисями. В этих реакциях образуются свободные радикалы и другие сильные окислители такие как гемопротеины, содержащие оксоферрильную группу ($-\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$):



В условиях окислительного стресса реакции 1-5 приводят к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков и других биополимеров. Ранее нами было показано, что GS-ДНКЖ эффективно восстанавливают оксоферрильную форму миоглобина [3, с.699-705]. Вместе с тем, лигандами ДНКЖ могут быть остатки Cys93 β -субъединицы гемоглобина [5, pp.445-461]. В данном исследовании с использованием спиновой ловушки DEPMPO показано, что GS-ДНКЖ, как и ДНКЖ, связанные с гемоглобином, снижают уровень органических радикалов, образующихся при взаимодействии этого гемопротеина с гидропероксидом трет-бутила. Тем не менее GS-ДНКЖ были несколько эффективнее, что согласуется с предположением о кооперативном действии лигандов этих комплексов [3, с.699-705]. Можно предположить, что этот эффект обусловлен реакцией NO-лигандов ДНКЖ с алкилперекисными (ROO^\bullet) и алкоксильными (RO^\bullet) радикалами. Известно, что в таких реакциях участвует свободный оксид азота:



Считается, что взаимодействие NO и свободных радикалов липидов приводит к терминации цепных реакций ПОЛ. В условиях наших экспериментов оксид азота может высвобождаться при распаде ДНКЖ. Следует отметить, что GS-ДНКЖ также уменьшают уровень свободных радикалов в системе содержащей гидропероксид, трет-бутила и цитохром *c*. Антирадикальный эффект GS-ДНКЖ может играть важную роль в защите митохондрий от процессов перекисного окисления, которые в этих органеллах проходят с участием цитохрома *c* [10, pp. 1439–1453]. Существенно, что в реакциях 6-8 образуются нитролипиды, которые влияют на активность дыхательной цепи митохондрий [11, pp.1-

10]. Ранее мы установили, что ДНКЖ образуются в митохондриях в присутствии S-нитрозотиолов, являющихся физиологическими донорами NO [6, pp.237-244]. В клетках *E. coli* при инкубации с S-нитрозоглутатионом также обнаружены нитрозильные комплексы железа, причем их формирование коррелирует с устойчивостью бактерий к окислительному стрессу индуцированному гидропероксидом трет-бутила [12, pp.18-24].

Кроме того, антиоксидантное действие ДНКЖ было исследовано в системе, моделирующей окислительный стресс при диабетической гипергликемии [13, pp.247-248]. Для этого использовали модель соокисления липосом из лецитина и глюкозы. Перекисное окисление в данной модели инициировали свободные радикалы, которые продуцируются при распаде азоинициатора (AIBN). С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции показано, что GS-ДНКЖ снижают количество свободнорадикальных интермедиатов, образующихся при соокислении глюкозы с полиненасыщенными липидами. Также эти ДНКЖ дозозависимо увеличивают продолжительность периода индукции свободнорадикального окисления (табл. 1). С другой стороны, ДНКЖ с фосфатными лигандами не влияют на продолжительность периода индукции окисления (табл. 1), хотя и уменьшают содержание свободных радикалов.

Таблица 1. Влияние ДНКЖ на период индукции свободнорадикального окисления в системе содержащей лецитиновые липосомы и глюкозу

Вариант ДНКЖ	Концентрация ДНКЖ (мкМ)	Период индукции свободнорадикального окисления (сек.)
-	0	67 ± 31
GS-ДНКЖ	40	269 ± 45
GS-ДНКЖ	75	433 ± 63,5
GS-ДНКЖ	140	777 ± 108
фосфатные ДНКЖ	75	73 ± 27

В используемой нами модельной системе супероксиддисмутаза почти полностью ингибирует люминол-зависимую хемилюминесценцию, что указывает на образование супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$). Действительно, наряду с органическими свободными радикалами в условиях, моделирующих диабетическую гипергликемию, продуцируется $O_2^{\cdot-}$ [13, pp.247-248; 14, pp.33-45]. По всей видимости, в наших экспериментах ДНКЖ также перехватывают $O_2^{\cdot-}$, что хорошо согласуется с полученными ранее данными [4, pp.37-46; 5, pp.445-461; 6, pp.237-244]. Вместе с тем нельзя исключить, что ДНКЖ влияют и на процессы свободнорадикального окисления глюкозы, которые приводят к образованию $O_2^{\cdot-}$. В отличие от динитрозильных комплексов железа, свободный NO, образующийся при распаде синтетического донора (PAPA/NONO), заметно стимулировал хемилюминесценцию. Такое прооксидантное действие NO, в условиях соокисления глюкозы и липосом, может быть следствием формирования пероксинитрита ($ONOO^-$) в реакции оксида азота с супероксидом.

Выводы

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что именно ДНКЖ во многом определяют антиоксидантное и цитопротекторное действие оксида азота при различных вариантах окислительного стресса.

Заключение

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

1) ДНКЖ эффективно перехватывают свободные радикалы, образующиеся в различных системах, моделирующих окислительный стресс при некоторых важных патологиях;

2) ДНКЖ являются одним из универсальных регуляторов свободнорадикальных процессов в живых системах и в этом качестве обладают значительным терапевтическим потенциалом.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-015-00444_а).

Литература.

1. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А.* Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
2. *Pryor W.A., Houk K.N., Foote C.S., Fukuto J.M., Ignarro L.J., Squadrito G.L., Davies K.J.A.* Free radical biology and medicine: it's a gas, man! // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. Vol. 291. No 3. R491–R511.
3. *Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К.* Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа // *Биохимия.* 2004. Т. 69. № 5. С. 699-705.
4. *Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F.* Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin- and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes // *Nitric Oxide.* 2008. Vol. 18. No 1. P. 37-46.
5. *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. Vol. 436. P. 445-461.
6. *Shumaev K.B., Dudylyina 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.
7. *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.
8. *Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigorieva D.V., Panasenko O.M., Vanin A.F., Topunov A.F., Terekhova M.S., Sokolov A.V., 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. Vol. 2019. P. 1-12.
9. *Pisarenko O., Studneva I., Timoshin A., Veselova O.* Protective efficacy of dinitrosyl iron complexes with reduced glutathione in cardioplegia and reperfusion // *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* 2019. Vol. 471. No 4. P. 583-593.
10. *Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A., Kapralov O., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Stoyanovsky D.A., Wipf P., Kochanek P.M., Greenberger J.S., Pitt B., Shvedova A., Borisenko G.* Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. Vol. 46. No 11. P. 1439–1453.
11. *Koenitzer J.R., Bonacci G., Woodcock S.R.* Fatty acid nitroalkenes induce resistance to ischemic cardiac injury by modulating mitochondrial respiration at complex II // *Redox Biol.* 2016. Vol. 8. P. 1-10.
12. *Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Arredondo-Peter R., Topunov A.F.* Influence of tert-butyl hydroperoxide and nitrosoglutathione on *Escherichia coli* cells expressing leghemoglobin // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry.* 2007. Vol. 3. P. 18-24.
13. *Lankin V., Konovalova G., Tikhaze A., Shumaev K., Kumskova E., Viigimaa M.* The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes // *Mol. Cell Biochem.* 2014. Vol. 395. No 1-2. P. 241-252.

14. *Lankin V.Z., Shadyro O.I., Shumaev K.B., Tikhaze A.K., Sladkova A.A.* Non-Enzymatic Methylglyoxal Formation From glucose Metabolites and Generation of Superoxide Anion Radical During Methylglyoxal-Dependent Cross-Links Reaction // Journal of Antioxidant Activity. 2019. Vol. 1. No 4. P. 33-45.

Сведения об авторах

Константин Борисович Шумаев

д-р биол. Наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: tomorov@mail.ru

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии

Ольга Владимировна Космачевская

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: rizobium@yandex.ru

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Москва, Россия

Дмитрий Иванович Грачев

аспирант

E-mail: dimitri1995@yandex.ru

МГУ им. М.В.Ломоносова

Москва, Россия

Алексей Федорович Топунов

д-р биол. наук, проф., зав. лаб.

Эл. почта: aftopunov@yandex.ru

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Москва, Россия

Андрей Кимович Мартусевич

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией⁴

Эл. почта: cryst-mart@yandex.ru

Privolzhsky Research Medical University

Нижний Новгород

Энно Куставич Рууге

д-р физ.-мат. наук, проф., зав. лаб.

Эл. почта: ruuge@mail.ru

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»

МГУ им. М.В.Ломоносова

Москва, Россия

Information about authors

Konstantin Borisovich Shumaev

DSc, Senior research scientist

E-mail: tomorov@mail.ru

Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the RAS, National Medical Research Centre for Cardiology
Moscow, Russia

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya

PhD, Senior research scientist

E-mail: rizobium@yandex.ru

Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the RAS
Moscow, Russia

Дмитрий Иванович Грачев

graduate student

E-mail: dimitri1995@yandex.ru

Lomonosov Moscow State University

Moscow, Russia

Alexey Fedorovich Topunov

DSc, Head of laboratory

E-mail: aftopunov@yandex.ru

Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the RAS
Moscow, Russia

Andrew Kimovich Martusevich

DSc, Professor, Head of laboratory

E-mail: cryst-mart@yandex.ru

Privolzhsky Research Medical University

Nizhny Novgorod

Enno Kustavich Ruuge

DSc, Professor, Head of laboratory

E-mail: ruuge@mail.ru

National Medical Research Centre for Cardiology
Lomonosov Moscow State University
Moscow, Russia

УДК 577.11
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.51

Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В.,
Шумаев К.Б., Топунов А.Ф.
Институт биохимии им. А.Н. Баха,
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

СВЯЗАННЫЕ С ГЕМОГЛОБИНОМ ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА ЗАЩИЩАЮТ ЕГО ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ

Под действием пероксинитрита ДНКЖ, связанные с гемоглобином, дозозависимо разрушаются, при этом ингибируя окисление триптофановых и тирозиновых остатков, образование карбонильных производных, препятствуют формированию ковалентных сшивок между субъединицами и предотвращают деградацию гемовой группы.

Ключевые слова: гемоглобин, окислительная модификация, динитрозильные комплексы железа, пероксинитрит, карбонильные производные

Nasybullina E.I., Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F.
Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the RAS

HEMOGLOBIN-BOUND DYNITROSIL IRON COMPLEXES PROTECT IT FROM OXIDATIVE MODIFICATION

Under the action of peroxynitrite, DNICs associated with hemoglobin are dose-dependently destroyed, while inhibiting the oxidation of tryptophan and tyrosine residues, the formation of carbonyl derivatives, preventing the formation of covalent cross-links between subunits, and preventing the degradation of the heme group.

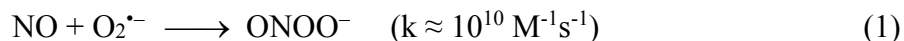
Keywords: hemoglobin, oxidative modification, dinitrosyl iron complexes, peroxynitrite, carbonyl derivatives

Введение

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются одной из физиологических форм оксида азота (NO) в организме [1, 2] и функционируют в качестве доноров NO. Также ДНКЖ могут быть донорами группы Fe-(NO)₂ и участвовать в нитрозилировании SH-групп тиолов [3]. Низкомолекулярные ДНКЖ с тиольными лигандами имеют общую формулу [(RS⁻)₂-Fe⁺-(NO⁺)₂] и в организме всегда существуют в равновесии с белок-связанными ДНКЖ, которые формируются при участии тиоловых и некоторых других групп белков [2, 3].

В различных экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo* было доказано, что NO может действовать как антиоксидант, вступая в реакцию с радикалами (O₂^{•-}, [•]OH, Tg[•], RS[•], [•]NO₂, ROO[•]). Метаболиты NO – ДНКЖ также проявляют антиоксидантные свойства. Ранее было показано, что низкомолекулярные и связанные с белками ДНКЖ перехватывают супероксидный анион-радикал [4-6]. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (GS-ДНКЖ) восстанавливают оксоферрильную форму миоглобина (Mb-Fe^{IV}=O) до нетоксичной метформы [7], а ДНКЖ, связанные с гемоглобином, защищают входящие в их состав тиоловые группы от окисления [4, 5]. Кроме того, глутатионовые ДНКЖ защищают эритроциты от HOCI-индуцированного гемолиза [8].

Однако NO может действовать и как прооксидант, являясь источником активных форм азота. Наиболее цитотоксичным производным NO является пероксинитрит (ONOO⁻), который образуется в диффузно-контролируемой реакции NO с супероксидом [9]:



NO путем свободной диффузии проникает в эритроциты, где взаимодействует с Hb. Это взаимодействие конкурирует с реакцией NO и O₂^{•-} [10]. Однако супероксид может образовываться и в самих эритроцитах в условиях гипоксии, когда при низком pO₂

Hb активно отдает кислород [11]. Поскольку в эритроцитах основной мишенью действия пероксинитрита является Hb [12], целью нашей работы было изучение влияния ДНКЖ на его окислительную модификацию пероксинитритом.

1. Деструкция гемоглобиновых ДНКЖ под действием пероксинитрита

Мы исследовали деструкцию связанных с гемоглобином ДНКЖ (Hb-ДНКЖ) под действием различных концентраций ONOO^- с помощью ЭПР-спектроскопии. Hb-ДНКЖ количественно разрушаются пероксинитритом при физиологических значениях pH. Кинетика деструкции носит двухфазный характер. Первая фаза – быстрое разрушение Hb-ДНКЖ длится 4-5 минут и, вероятно, связана с взаимодействием комплексов с пероксинитритом и его реакционно-активными производными. При этом, при молярном соотношении Hb к ONOO^- 1:12 концентрация ДНКЖ снижается на ~75%, а при соотношении 1:14,5 парамагнитные ДНКЖ почти полностью разрушаются. В течение второй более медленной фазы скорость распада Hb-ДНКЖ в контроле и в присутствии пероксинитрита практически не отличалась. По-видимому, в этом случае деструкция ДНКЖ обусловлена окислением молекулярным кислородом, как это было показано в работе [13]. Вместе с тем, при разрушении Hb-ДНКЖ пероксинитритом не образуется сигнал ЭПР, характерный для нитрозильных комплексов гемового железа, в отличие от деструкции Hb-ДНКЖ, вызванной супероксидом [5].

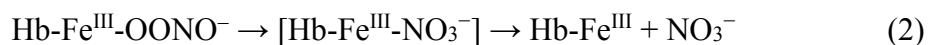
2. Образование карбонильных производных гемоглобина

ДНКЖ оказывали выраженное ингибирующее действие на образование карбониллов гемоглобина в присутствии пероксинитрита. Они защищали белок в широком диапазоне концентраций ONOO^- от 0,38 до 4,20 мМ. При соотношении Hb к ONOO^- 1:6,5 карбонильных производных Hb-ДНКЖ было на 60% меньше, чем в контроле, не содержащем ДНКЖ. Кривые, отражающие зависимость количества карбонильных производных от концентрации окислителя, в присутствии ДНКЖ имели двухфазный характер. При концентрациях $\text{ONOO}^- < 1,6$ мМ количество карбониллов было незначительным, тогда как при концентрациях $> 1,6$ мМ окислительная модификация белка происходила более интенсивно. Вероятно, этот эффект связан с высвобождением железа из распавшихся ДНКЖ, которое далее участвует в генерации свободных радикалов в реакциях Фентоновского типа. Это подтверждают данные по влиянию пероксинитрита на деструкцию ДНКЖ (пункт 1), показывающие, что при этом соотношении белка и окислителя большая доля комплексов разрушается.

3. Дегградация гемовой группы гемоглобина

Связанные с белком ДНКЖ тормозили разрушение гемовой группы. В контрольных образцах Hb доля разрушенного гема находилась в прямой зависимости от концентрации окислителя. При концентрации ONOO^- 4,2 мМ в Hb разрушалось 50% гемов, в то время как в Hb-ДНКЖ – только 25%. Это можно объяснить тем, что под действием пероксинитрита в первую очередь разрушаются гемы β -субъединиц Hb [14].

В реакции окисленного Hb с пероксинитритом образуется ферри-пероксинитритный комплекс ($\text{Hb-Fe}^{\text{III}}\text{ONOO}^-$) [12, 15]. Судьба этого комплекса может быть различной. Если возникает транс-конформация комплекса, то этот интермедиат в ходе последующей перегруппировки превращается в ферри-нитратный комплекс, распадающийся далее до нитрата и ферри-формы Hb [16]:



В соответствии с другим сценарием, гомолиз O-O связи пероксинитрита приводит к распаду ферри-пероксинитритного комплекса с образованием оксоферрилHb и диоксида азота [17]:



Можно предложить несколько механизмов защитного действия ДНКЖ. Во-первых, ДНКЖ выступают донорами NO, который может восстанавливать Hb-Fe^{IV}=O. При этом образуется комплекс Hb-Fe^{III}-ONO (ферри-нитритный комплекс) [8]. ДНКЖ может защищать гемовую группу за счет переноса NO на железо гема, что препятствует образованию оксоферрильной формы Hb [19-21]. И, наконец, антиоксидантное действие ДНКЖ может быть связано с восстановлением радикалов порфирина оксоферрильной формы [8, 19, 20]. Способность ДНКЖ взаимодействовать с органическими свободными радикалами показана в работах [8, 22].

5. Окисление тирозиновых и триптофановых остатков гемоглобина

В Hb окислению подвергаются остатки тирозинов Tyr42 и Tyr24. Было проведено спектрофлуориметрическое исследование тирозиновых остатков Hb в условиях действия пероксинитрита. В Hb и в Hb-ДНКЖ интенсивность флуоресценции возрастала с увеличением концентрации ONOO⁻. Это объясняется образованием 3,3'-дитирозина, с максимумом испускания флуоресценции при 400 нм [23]. Однако, начиная с соотношения Hb и окислителя 1:10,6, флуоресценция Hb-ДНКЖ снижалась, скорее всего из-за образования 3-нитротирозина. Это эффект можно объяснить тем, что при этой концентрации пероксинитрита происходит распад большей части ДНКЖ и высвобождение железа, катализирующего нитрование тирозина [24].

Еще одной аминокислотой, являющейся мишенью пероксинитрита, является триптофан [25]. В молекуле Hb есть шесть остатков триптофана, из которых доступен для растворителя только Trp37β. Однако в первую очередь окисляется остаток Trp15β, а Trp37β окисляется лишь в том случае, если нарушена нативная структура белка.

Была изучена зависимость интенсивности испускания флуоресценции триптофана при 327 нм от концентрации ONOO⁻. В Hb интенсивность флуоресценции дозозависимо уменьшалась, что свидетельствует об окислении триптофановых остатков. В Hb-ДНКЖ при низких концентрациях окислителя флуоресценция незначительно возрастала и только начиная с соотношения 1:17 снижалась относительно исходного уровня, что может быть обусловлено распадом ДНКЖ.

Нельзя также исключить образование нитротриптофана в катализируемой металлами реакции пероксинитрита с остатком триптофана. В этой реакции участвует пероксиазотистая кислота или активированный интермедиат ONOON*, образующийся из транс-пероксиазотистой кислоты [26].

7. Окисление тиоловых групп гемоглобина

В наших экспериментах при взаимодействии ONOO⁻ с Hb происходило незначительное окисление SH-групп (реакционноспособные цистеины Cys93β). Уменьшение (~10 %) интенсивности флуоресценции тиольного аддукта с ThioGlo1 наблюдалось при молярном соотношении Hb : ONOO⁻ 1:4. Дальнейшее увеличение концентрации пероксинитрита не приводило к усилению окисления SH-групп Hb.

Результаты наших экспериментов согласуются с имеющимися в литературе данными о том, что основной мишенью пероксинитрита в Hb является гем, а не остатки Cys93β [18, 26]. Константа скорости реакции Cys93β с пероксинитритом составляет $1.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [18]. В то же время, аналогичная константа с гемовой группой метгемоглобина $\sim 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [27, 28]. Известно также, что при взаимодействии Hb с пероксинитритом окисление тирозиновых остатков, опосредованное гемовой группой, играет ключевую роль в образовании тиольных радикалов остатков цистеина [28]. При этом феноксильные радикалы тирозина восстанавливаются цистеинами за счёт внутримолекулярного переноса электронов. В этих процессах остатки цистеина, играющие роль антирадикальных агентов, ингибируют образование нитротирозинов [29]. Нельзя исключить, и что при высоких концентрациях ONOO⁻ существует обратный эффект, т.е. нитрование остатков тирозина предотвращает окисление

Cys93β. Вместе с тем, включение Cys93β в ДНКЖ может быть дополнительным механизмом защиты этих остатков от окислительной модификации [5].

8. Образование межбелковых сшивок

Образование межсубъединичных сшивок и агрегатов белка под действием ONOO⁻ регистрировали с помощью денатурирующего SDS-электрофореза в 12% ПААГ в невосстановительных и восстановительных (с дитиотреитолом) условиях. В контрольном варианте при всех концентрациях ONOO⁻ происходило дозозависимое образование димеров субъединиц Hb и высокомолекулярных агрегатов. При концентрациях ONOO⁻ 2,6 и 4,2 мМ агрегация была настолько сильной, что белок даже не проникал в концентрирующий гель. Если SH-группы Hb были включены как лиганды в ДНКЖ, белок агрегировал только при концентрации ONOO⁻ 2,6 и 4,2 мМ и в меньшей степени, чем в контроле.

Степень сшивания молекул Hb не зависела от наличия дитиотреитола, что исключает вклад дисульфидных связей в агрегацию белка. Это согласуется с результатами о влиянии пероксинитрита на тиоловые группы (пункт 7). Полученные данные показывают, что связанные с белком ДНКЖ препятствуют образованию межбелковых связей. Это подтверждает выявленную нами ранее [5] способность ДНКЖ предотвращать агрегацию субъединиц Hb под действием окислителя.

Обсуждение

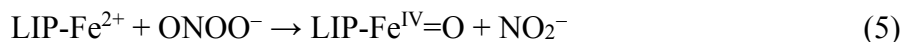
Взаимодействие тиолсодержащих и белковых ДНКЖ с пероксинитритом было исследовано в работах [5, 30]. При физиологических значениях pH пероксинитрит окисляет γ-глутатионовые и альбуминовые ДНКЖ по двухэлектронному механизму:



В ходе этой реакции образуются нестабильные интермедиаты – комплексы, содержащие связанный нитрозилпероксинитрит (реакция 4) [30]. Нельзя также исключить формирование комплексов, содержащих координированный пероксинитрит [5, 31]. Эти нестабильные комплексы распадаются с высвобождением нитрита/нитрата или участвуют в окислении и нитровании биомолекул, чаще всего остатков тирозина.

В клетках имеется пул железа, слабо связанного с белками и низкомолекулярными веществами – пул лабильного железа (labile iron pool – LIP) [32]. Обычно в LIP входит двухвалентное железо, обладающее прооксидантными свойствами. Вместе с тем показано, что в макрофагах LIP при взаимодействии с NO превращаются в ДНКЖ [33]. Вероятно, и в эритроцитах ДНКЖ образуются с участием LIP. Источником NO для этого может быть NO-синтаза эритроцитов (eNOS isoform) [34] и восстановление нитритов, в том числе с участием Hb.

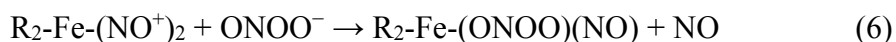
В работе [35] было высказано предположение, что LIP перехватывает ONOO⁻ и свободные радикалы, являющиеся его производными, в том числе •NO₂ и •CO₃. Антиоксидантное действие двухвалентного железа по отношению к пероксинитриту объясняется способностью восстанавливать ONOO⁻ до нитрита по двухэлектронному механизму с константой скорости, на два порядка превышающей константу скорости реакции ONOO⁻ с CO₂ [36, 37]. Считается, что в этой реакции LIP превращается в оксоферрильный интермедиат [37]:



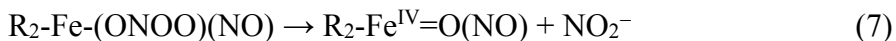
Оксоферрильный интермедиат LIP менее реакционноспособен, чем пероксинитрит и может быть восстановлен глутатионом и аскорбатом. С другой стороны, оксоферрильные комплексы могут восстанавливаться и оксидом азота [7].

Таким образом, можно предложить ещё один механизм взаимодействия ДНКЖ с пероксинитритом, основанный на антиоксидантных свойствах как NO, так и входящих в

комплекс ионов железа. На первом этапе образуется комплекс, содержащий связанный пероксинитрит:



Этот комплекс превращается в оксоферрильный интермедиат, который далее восстанавливается NO с образованием нитрита:



В свою очередь, ионы трехвалентного железа способствуют гомолитическому расщеплению пероксинитрита и усилению окисления и нитрования белков [38, 39].

Заключение

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

1) Методом ЭПР спектроскопии установлено, что под действием пероксинитрита Hb-связанные ДНКЖ дозозависимо разрушаются. При этом ДНКЖ ингибируют окисление триптофановых и тирозиновых остатков Hb, образование карбонильных производных, а также препятствуют формированию ковалентных сшивок между субъединицами и предотвращают деградацию гемовой группы.

2) Протекторное действие ДНКЖ может быть связано с восстановлением оксоферрильной формы гема и со способностью комплексов непосредственно перехватывать $ONOO^-$ и свободные радикалы, возникающие при его гомолизе.

3) Наличие у ДНКЖ антиоксидантных и антирадикальных свойств делает эти вещества перспективными протекторами миокарда, повышающими устойчивость к ишемии в условиях искусственного кровообращения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература

1. Hsiao H.Y., Chung C.W., Santos J.H., Villaflores O.B., Lu T.T. Fe in biosynthesis, translocation, and signal transduction of NO: toward bioinorganic engineering of dinitrosyl iron complexes into NO-delivery scaffolds for tissue engineering. // Dalton Trans. – 2019. – 48. – 26. – 9431-9453.
2. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a «working form» of endogenous nitric oxide. // Nitric Oxide. – 2016. – 54. – 15-29.
3. Vanin A.F. What is the mechanism of nitric oxide conversion into nitrosonium ions ensuring S-nitrosating processes in living organisms. // Cell Biochem. Biophys. – 2019. – 77. – 4. – 279-292.
4. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhnikov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin – and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes. // Nitric Oxide. – 2008. – 18. – 37-46.
5. 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. – 436. – 445-461.
6. Shumaev K.B., Dudylyna A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria // Biofactors. – 2018. – 44. – 3. – 237-244.
7. Shumaev K.B., Petrova N.E., Zabbarova I.V., Vanin A.F., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. Interaction of oxoferrylmyoglobin and dinitrosyl iron complexes. // Biochemistry (Moscow). – 2004. – 69. – 569-574.
8. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigorjeva D.V., Panasenko O.M., Vanin A.F., Topunov A.F., Terekhova M.S., Sokolov A.V., 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. – 2019. – e2798154.
9. Beckman J.S., Koppenol W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly. // *Am J Physiol.* – 1996. – 271. – 1424–1437.
10. Prolo C., Alvarez M.N., Ríos N., Peluffo G., Radi R., Romero N. Nitric oxide diffusion to red blood cells limits extracellular, but not intraphagosomal, peroxynitrite formation by macrophages. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – 87. – 346–355.
11. Balagopalakrishna C., Manoharan P.T., Abugo O.O., Rifkind J.M. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. // *Biochemistry.* – 1996. – 35. – 6393–6398.
12. Pietraforte D., Salzano A.M., Marino G., Minetti M. Peroxynitrite-dependent modifications of tyrosine residues in hemoglobin. Formation of tyrosyl radical(s) and 3-nitrotyrosine. // *Amino Acids.* – 2003. – 25. – 3–4. – 341–350.
13. Ren B., Zhang N., Yang J., Ding H. Nitric oxide-induced bacteriostasis and modification of iron-sulphur proteins in *Escherichia coli*. // *Molecular Microbiology.* – 2008. – 70. – 4. – 953–964.
14. Alayash A.I., Brockner Ryan B.A., Cashion R.E. Peroxynitrite mediated heme oxidation and protein modification of native and chemically modified hemoglobins. // *Arch Biochem Biophys.* – 1998. – 349. – 65–73.
15. De Marinis, Casella L., Ciaccio C., Coletta M., Visca P., Ascenzi P. Hypothesis catalytic peroxidation of nitrogen monoxide and peroxynitrite by globins E. // *IUBMB Life.* – 2009. – 61. – 1. – 62–73.
16. Herold S., Rehmann F.-J.K. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. // *Free Rad. Biol. Med.* – 2002. – 34. – 531–545.
17. Romero N., Radi R., Linares E., Augusto O., Detweiler C.D., Mason R.P., Denicola A. Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – 278. – 45. – 44049–44057.
18. Gorbunov N.V., Osipov A.N., Day B.W., Zayas-Rivera B., Kagan V.E., Elsayed N.M. Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylhemoglobin by nitric oxide: a protective mechanism against ferryl hemoprotein-induced oxidations. // *Biochemistry.* – 1995. – 34. – 6689–6699.
19. Kagan V.E., Kozlov A.V., Tyurina Y.Y., Shvedova A.A., Yalowich J.C. Antioxidant mechanisms of nitric oxide against iron-catalyzed oxidative stress in cells. // *Antioxid Redox Signal.* – 2001. – 3. – 2. – 189–202.
20. Shvedova A.A., Tyurina Y.Y., Gorbunov N.V., Tyurin V.A., Castranova V., Kommineni C., Ojimba J., Gandley R., McLaughlin M.K., Kagan V.E. Tert-butyl hydroperoxide/hemoglobin-induced oxidative stress and damage to vascular smooth muscle cells: different effects of nitric oxide and nitrosothiols. // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – 57. – 9. – 989–1001.
21. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Gubkina S.A., Gudkov L.L., Lakomkin V.L., Topunov A.F., Vanin A.F., Ruuge E.K. Interaction between albumin-bound dinitrosyl iron complexes and reactive oxygen species. // *Biofizika.* – 2007. – 52. – 3. – 534–538.
22. Davies K.J., Delsignore M.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. // *J. Biol. Chem.* 1987. – 262. – 20. – 9908–9913.
23. Campolo N., Bartesaghi S., Radi R. Metal-catalyzed protein tyrosine nitration in biological systems. // *Redox Rep.* – 2014. – 19. – 6. – 221–231.
24. Pietraforte D., Minetti M. One-electron oxidation pathway of peroxynitrite decomposition in human blood plasma: evidence for the formation of protein tryptophan-centred radicals. // *Biochem J.* – 1997. – 321. – 734–750.
25. Alvarez B., Rubbo H., Kirk M., Barnes S., Freeman B.A., Radi R. Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. // *Chem. Res. Toxicol.* – 1996. – 9. – 2. – 390–396.
26. Vitturi D.A., Sun C.-W., Harper V.M., Thrash-Williams B., Cantu-Medellin N., Chacko B.K., Peng N., Dai Y., Wyss J.M., Townes T., Patel R.P. Antioxidant functions for the hemoglobin β 93 cysteine residue in erythrocytes and in the vascular compartment in vivo // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. – 55. – 119–129.
27. Herold S., Shivashankar K. Metmyoglobin and methemoglobin catalyze the isomerization of peroxynitrite to nitrate. // *Biochemistry.* – 2003. – 42. – 47. – 14036–14046.
28. Bhattacharjee S., Deterding L.J., Jiang J., Bonini M.G., Tomer K.B., Ramirez D.C., Mason R.P. Electron transfer between a tyrosyl radical and a cysteine residue in hemoproteins: spin trapping analysis. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – 129. – 44. – 13493–13501.

29. Zhang H., Xu Y., Joseph J., Kalyanaraman B. Intramolecular electron transfer between tyrosyl radical and cysteine residue inhibits tyrosine nitration and induces thiyl radical formation in model peptides treated with myeloperoxidase, H₂O₂, and NO₂⁻: EPR spin-trapping studies. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – 280. – 40684-40698.
30. Lobysheva I.I., Serezhenkov V.A., Vanin A.F. Interaction of peroxyxynitrite and hydrogen peroxide with dinitrosyl iron complexes containing thiol ligands in vitro. // *Biochemistry (Moscow)*. – 1999. – 64. – 2. – 153-158.
31. Tran N.G., Kalyvas H., Skodje K.M., Hayashi T., Moënné-Loccoz P., Callan P.E., Shearer J., Kirschenbaum L.J., Kim E. Phenol nitration induced by an {Fe(NO)₂}¹⁰ dinitrosyl iron complex. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – 133. – 5. – 1184–1187.
32. Lv H., Shang P. The significance, trafficking and determination of labile iron in cytosol, mitochondria and lysosomes. // *Metallomics*. – 2018. – 10. – 7. – 899–916.
33. Toledo J.C., Bosworth C.A., Hennon S.W., Mahtani H. Nitric oxide-induced conversion of cellular chelatable iron into macromolecule-bound paramagnetic dinitrosyliron complexes. // *J. Biol. Chem.* – 283. – 43. – 28926-28933.
34. Cortese-Krott M.M., Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? // *Redox Biology*. – 2014. – 2. – 251–258.
35. Damasceno F.C., Toledo J.C., Condeles A.L., Lopes A.K.B., Facci R.R., Linares E., Truzzi D.R., Augusto O. Can cellular labile iron pool be considered solely a pro-oxidant species in cells? // *FASEB J.* – 2019. – 33. – S1. – 351.4-351.4.
36. Carballal S., Bartesaghi S., Radi R. Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxyxynitrite. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – 1840. – 768–780.
37. Damasceno F.C., Condeles A.L., Lopes A.K.B., Facci R.R., Linares E., Truzzi D.R., Augusto O., Toledo J.C.Jr. The labile iron pool attenuates peroxyxynitrite-dependent damage and can no longer be considered solely a pro-oxidative cellular iron source. // *J. Biol. Chem.* – 2018. – 293. – 22. – 8530-8542.
38. Radi R. Peroxyxynitrite, a stealthy biological oxidant. // *J. Biol. Chem.* – 2013. – 288. – 26464–26472.
39. Bartesaghi S., Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxyxynitrite and protein tyrosine nitration. // *Redox Biol.* – 2018. – 14. – 618-625.

Сведения об авторах

Эльвира Ильгизовна Насыбуллина

мл. науч. сотр.

Эл. почта: lvirus198709@rambler.ru

Ольга Владимировна Космачевская

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: rizobium@yandex.ru

Константин Борисович Шумаев

д-р биол. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: tomorov@mail.ru

Алексей Федорович Топунов

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией

Эл. почта: aftopunov@yandex.ru

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

Россия, Москва

Information about authors

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya

PhD, Senior research scientist

E-mail: rizobium@yandex.ru

Elvira Ilgizovna Nasybullina

PhD, Junior research scientist

E-mail: lvirus198709@rambler.ru

Konstantin Borisovich Shumaev

DSc

Senior research scientist

E-mail: tomorov@mail.ru

Alexey Fedorovich Topunov

DSc, Head of laboratory

E-mail: aftopunov@yandex.ru

Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation, Moscow

УДК 546.72+544.4+577.3
DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.52

¹Покидова О.В., ^{1,2}Емельянова Н.С., ^{1,2}Куликов А.В.,

^{1,2}Котельников А.И., ^{1,2,3}Санина Н.А.

¹Институт проблем химической физики РАН

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия»
Московского государственного областного университета

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С N-ЭТИЛТИОМОЧЕВИННЫМИ ЛИГАНДАМИ В МОДЕЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Изучен процесс трансформации моноядерного катионного комплекса с N-этилтиомочевинными лигандами в Трис-НСl буфере, а также в смеси с восстановленными глутатионом и бычьим сывороточным альбумином. Установлено, что в присутствии глутатиона комплекс димеризуется, при этом его лиганды замещаются на глутатионовые. В присутствии альбумина продукт распада комплекса координируется с аминокислотными остатками (Cys34 и His39) с образованием белок-связанного комплекса.

Ключевые слова: нитрозильные комплексы железа, доноры NO, альбумин, глутатион

¹Pokidova O.V., ^{1,2}Emel'yanova N.S., ^{1,2}Kulikov A.V.,

^{1,2}Kotelnikov A.I., ^{1,2,3}Sanina N.A.

¹Institute of Problems of Chemical Physics of RASciences

²Lomonosov Moscow State University

³Scientific and Educational Center "Medical Chemistry" of Moscow State Regional University

STUDY OF THE TRANSFORMATION OF NITROSYL IRON COMPLEX WITH N-ETHYLTHIOUREA LIGANDS IN MODEL BIOLOGICAL SYSTEMS

The process of transformation of a mononuclear cationic complex with N-ethylthiourea ligands in Tris-HCl buffer, as well as in a reaction mixture with reduced glutathione and bovine serum albumin, has been studied. It was found that in the presence of glutathione, the complex dimerizes, while its initial ligands are replaced by glutathione. In the presence of albumin, the decay product of the complex is coordinated with amino acid residues (Cys34 and His39) to form a protein-bound complex.

Keywords: nitrosyl iron complexes, NO donors, albumin, glutathione

Нитрозильные комплексы железа (НКЖ) с функциональными серосодержащими лигандами представляют большой интерес в качестве лекарственных препаратов нового поколения для лечения социально-значимых заболеваний. Одним из наиболее перспективных представителей данного класса является НКЖ с N-этилтиомочевинными лигандами (комплекс **1**) $[\text{Fe}(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_8\text{S})\text{Cl}(\text{NO})_2]^{0+}[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{C}_3\text{N}_2\text{H}_8\text{S})_2]^{+}\text{Cl}^{-}$ [1], показавший высокую цитотоксическую активность по отношению к клеткам глиобластомы [2] и обладающий терапевтическим потенциалом для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [3].

Предполагается, что мишенями действия НКЖ *in vivo* могут являться Fe- и тиол-содержащие белки, а также низкомолекулярные тиолы [4]. С этой точки зрения целью настоящей работы явилось изучение трансформации комплекса **1** в присутствии бычьего сывороточного альбумина (BSA) и восстановленного глутатиона (GSH).

Механизм трансформации комплекса **1** в водном растворе Трис-НСl буфера, pH 7.0 анализировали методами УФ-Вид спектроскопии, флуоресценции, ЭПР спектроскопии, с помощью сенсорного электрода и методом квантово-химического моделирования. Было установлено (рис.1), что исходный спектр комплекса имеет один максимум на 236 нм, интенсивность которого уменьшается со временем и за 15 ч выходит на

плато ($k_{эфф}=7.7 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$). В ЭПР-спектрах наблюдается характерный для моноядерных НКЖ сигнал с $g=2.03$. Через 3.3 ч от начала растворения в анаэробных условиях ЭПР-сигнала не наблюдается. Согласно квантово-химическим расчетам в водном растворе происходит достаточно быстрая диссоциация комплекса **1** на нейтральную и катионную части с последующим их разложением, основным направлением которого является отрыв N-этилтиомочевинных лигандов.

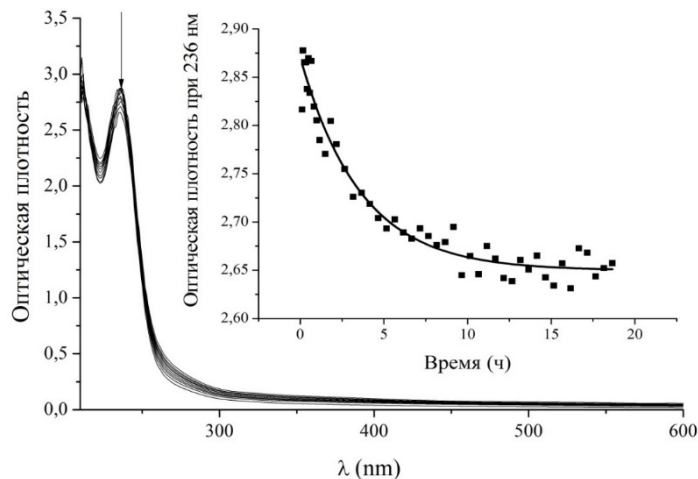


Рис. 1. Изменение спектров поглощения $1 \cdot 10^{-4}$ М комплекса **1 во времени: спектры регистрировали в течение 18 ч.**

На вставке приведена кинетика данного процесса. Условия: 0.05 М Трис-НСl буфер, pH 7.0, 23 °С.

После добавления к комплексу **1** избытка GSH спектр поглощения раствора моментально изменяется – появляются две интенсивные полосы на 310 и 360 нм (рис. 2). Полученная форма спектра аналогична спектру биядерного НКЖ с двумя GS-лигандами, максимумы поглощения совпадают с литературными данными [4]. Следует отметить, что после добавления GSH, ЭПР-сигнала с $g=2.03$ обнаружено не было, что также свидетельствует об образовании диамагнитного биядерного НКЖ. С помощью квантово-химического моделирования предложена схема реакции, согласно которой последовательно происходит замещение либо тиомочевинного лиганда, либо хлора на GS- и далее - димеризация образующихся комплексов с отрывом второго исходного лиганда от каждого из комплексов.

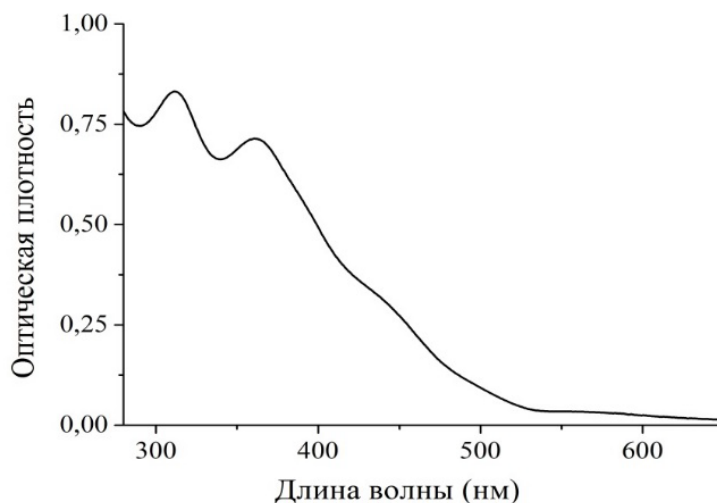


Рис. 2. Спектр поглощения реакционной смеси, содержащей $1.1 \cdot 10^{-4}$ М комплекса **1 и $1 \cdot 10^{-3}$ М GSH.** Условия реакции: 0.05 М Трис-НСl буфер, pH 7.0, T=23 °С.

На следующем этапе изучен процесс распада комплекса **1** в присутствии BSA. НКЖ, согласно литературным данным [5], связываются с цистеиновым (Cys 34) или гистидиновым остатками в гидрофобном кармане молекулы BSA с образованием белок-связанных комплексов. Для детального анализа процесса такого взаимодействия были записаны спектры поглощения смеси комплекса **1** с белком (рис. 3). При регистрации первого спектра наблюдаем появление широкого плеча на 370–410 нм, что свидетельствует о координационном взаимодействии продукта распада комплекса **1** с аминокислотными остатками белка. Далее образующийся продукт постепенно распадается, интенсивность данных полос уменьшается ($k_{эфф}=2.6 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$). С помощью реакции Грисса в аэробных условиях было показано, что скорость выделения NO после связывания комплекса с белком уменьшается в три раза. Таким образом, в его присутствии комплекс стабилизируется и, следовательно, становится более пролонгированным донором NO.

В BSA имеются два триптофановых остатка (Trp 134 и Trp 213), обуславливающих собственную флуоресценцию при возбуждении ее на длине волны 290 нм. Это явление удобно использовать для контроля связывания с белком различных соединений, в том числе нитрозильных комплексов. Было установлено, что при постепенном увеличении концентрации комплекса **1** флуоресценция белка эффективно тушится. Используя модифицированное уравнение Штерна-Фольмера была определена константа связывания комплекса **1** с BSA: $K=4.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Для анализа влияния связывания комплекса с белком на эффективность тушения каждого остатка триптофана был рассчитан радиус Ферстера: $R_0 = 21.7 \text{ \AA}$. Согласно методу молекулярного докинга в работе [6], расстояние от S (Cys 34) до Trp 134 составляет 21.7 \AA , а до Trp 213 – 33.2 \AA . Следовательно, в этом случае будет наблюдаться более эффективное тушение Trp 134. Кроме того, для комплекса **1** необходимо учитывать электростатические взаимодействия с поверхностью белка, которые также могут способствовать тушению флуоресценции. Однако из-за низкого поглощения исходного комплекса **1** в области 300–400 нм (рис. 1) его спектр слабо перекрывается со спектром флуоресценции BSA. В результате была получена небольшая величина радиуса Ферстера: $R_0 = 3 \text{ \AA}$. Из этого можно сделать вывод, что электростатическое связывание комплекса **1** с поверхностью белка не должно вносить значительный вклад в тушение флуоресценции.

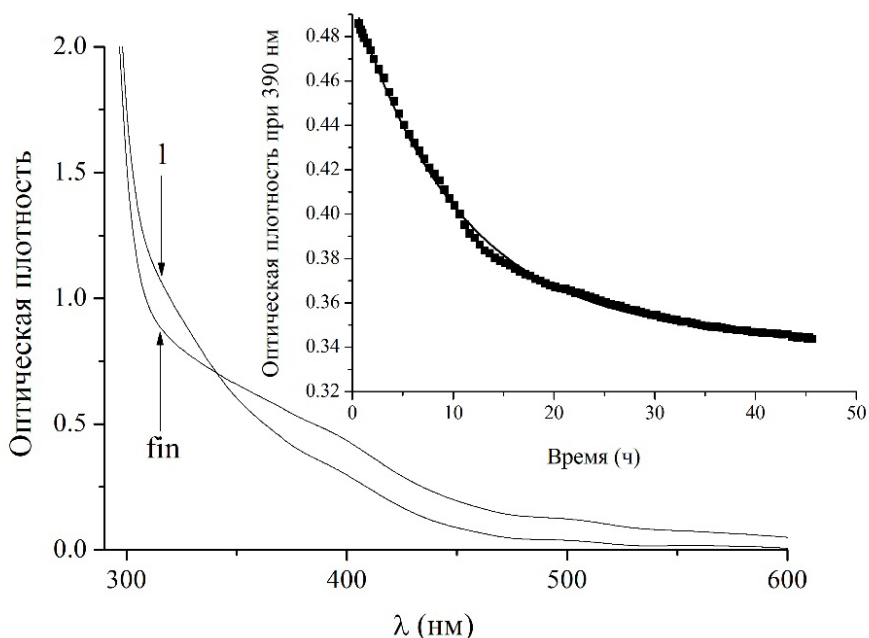


Рис. 3. Спектры поглощения реакционной смеси, содержащей $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ комплекса **1** и $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ BSA. Спектры регистрировали в течение 46 часов. На вставке приведена кинетика данного процесса. Условия реакции: 0.05 M Трис-НСl буфер, pH 7.0, $T=23 \text{ }^\circ\text{C}$.

Таким образом, GSH и BSA могут активно взаимодействовать с комплексом **1** и тем самым модулировать его свойства как потенциального лекарственного препарата в процессе его биотрансформации.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-73-00316).

Литература

1. A new member of the cationic dinitrosyl iron complexes family incorporating N-ethylthiourea is effective against human HeLa and MCF-7 tumor cell lines / N. A. Sanina, N. Y. Shmatko, D. V. Korchagin, G. V. Shilov, A. A. Terent'ev, T. S. Stupina, A. A. Balakina, N. V. Komleva, N. S. Ovanesyan, A. V. Kulikov, S. M. Aldoshin // *Journal of Coordination Chemistry*. 2016. V. 69. P. 812–25.
2. NO-Donor Iron Nitrosyl Complex with N-Ethylthiourea Ligand Exhibits Selective Toxicity to Glioma A172 Cells / N. A. Sanina, N. Y. Shmatko, T. S. Stupina, A. A. Balakina, A. A. Terent'ev // *Molecules*. 2017. V. 22. P. 14.
3. Cytoprotective Effects of Dinitrosyl Iron Complexes on Viability of Human Fibroblasts and Cardiomyocytes / N. P. Akentieva, N. A. Sanina, A. R. Gizatullin, N. I. Shkondina, T. R. Prihodchenko, S. I. Shram, N. Zhelev, S. M. Aldoshin // *Frontiers in Pharmacology*. 2019. V. 10. 1277.
4. Ванин А. Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физикохимия, биология, медицина. МоскваИжевск: Институт компьютерных исследований, 2015. 220 с.
5. S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex / M. Boese, P. I. Mordvintsev, A. F. Vanin, R. Busse, A. Mülsch // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. V. 270. P. 29244–29249.
6. Effect of albumin on the transformation of dinitrosyl iron complexes with thiourea ligands / O. V. Pokidova, V. B. Luzhkov, N. S. Emel'yanova, V. B. Krapivin, A. I. Kotelnikov, N. A. Sanina, S. M. Aldoshin // *Dalton Transactions*. 2020. 49. P. 12674–12685.

Сведения об авторах

Олеся Викторовна Покидова

с.н.с., к.х.н.

Эл. почта: pov@icp.ac.ru

Институт проблем химической физики РАН
Московская обл., Черноголовка, Россия

Нина Сергеевна Емельянова

с.н.с., к.х.н.

Эл. почта: n_emel@mail.ru

Институт проблем химической физики РАН
Московская обл., Черноголовка, Россия
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова
Москва, Россия

Александр Васильевич Куликов

г.н.с., проф., д.ф.-м.н.

Эл. почта: kulav@icp.ac.ru

Институт проблем химической физики РАН
Московская обл., г. Черноголовка,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова
Москва, Россия

Александр Иванович Котельников

г.н.с., проф., д.ф.-м.н.

Эл. почта: kotel@icp.ac.ru

Институт проблем химической физики РАН
Московская обл., Черноголовка, Россия

Information about authors

Olesya Viktorovna Pokidova

Senior researcher, Ph.D

E-mail: pov@icp.ac.ru

Institute of Problems of Chemical Physics of Russian
Academy of Sciences,

Московская обл., Chernogolovka, Russia

Nina Sergeevna Emel'yanova

Senior researcher, Ph.D

E-mail: n_emel@mail.ru

Institute of Problems of Chemical Physics of Rus-
sian Academy of Sciences,

Московская обл., Chernogolovka, Russia

Lomonosov Moscow State University,

Moscow, Russia

Alexander Vasilievich Kulikov

Chief Researcher, Doctor of Science

E-mail: kulav@icp.ac.ru

Institute of Problems of Chemical Physics of Rus-
sian Academy of Sciences,

Московская обл., Chernogolovka, Russia

Lomonosov Moscow State University,

Moscow, Russia

Alexander Ivanovich Kotelnikov

Chief Researcher, Doctor of Science

E-mail: kotel@icp.ac.ru

Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова
Москва, Россия

Наталья Алексеевна Санина

зав. отд., д-р хим. наук

Эл. почта: sanina@icp.ac.ru

Институт проблем химической физики РАН
Московская обл., Черноголовка, Россия

Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова
Москва, Россия

Научно-образовательный центр «Медицинская
химия» Московского государственного област-
ного университета

Московская обл., Мытищи, Россия

Institute of Problems of Chemical Physics of Rus-
sian Academy of Sciences,

Московская обл., Chernogolovka, Russia

Lomonosov Moscow State University,

Moscow, Russia

Natalia Alekseevna Sanina

Head of Department, Doctor of Science

E-mail: sanina@icp.ac.ru

Institute of Problems of Chemical Physics of Rus-
sian Academy of Sciences,

Московская обл., Chernogolovka, Russia Lomono-
sov Moscow State University,

Moscow, Russia

Scientific and Educational Center "Medical Chem-
istry" of Moscow State Regional University,

Moscow Region, Mytishchi, Russia

УДК 57.043

ГРНТИ 34.17.09

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.53

Тифлова О.А., Дмитриев А.К.

ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

НЕСИМБИОТИЧЕСКИЙ ГЕМОГЛОБИРН – ТРИГГЕР ФОТОБИОМОДУЛЯЦИИ СЕ- МЯН

*Показана возможность фотобиомодуляции семян тритикале под действием лазер-
ного излучения с параметрами соответствующими спектральным и кинетическим ха-
рактеристикам несимбиотического гемоглобина – потенциального O₂-провайдера для
2-оксоглутарат/Fe(II)-зависимых диоксигеназ в условиях гипоксии.*

Ключевые слова: семена, лазер, несимбиотический гемоглобин, 2-оксоглутарат/Fe(II)-
зависимые диоксигеназы.

Tiflova O.A., Dmitriev A.K.

FRC "Crystallography and Photonics" RAS

NONSYMBIOTIC HEMOGLOBIN TRIGGERS PHOTOBIMODULATION OF SEEDS

*The possibility of photobiomodulation of triticale seeds under the action of laser radiation with
the parameters appropriate to spectral and kinetic characteristics of non symbiotic hemoglobin
– potential O₂-provider for 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases under hypoxia, has
been revealed.*

Keywords: Seeds, laser, non symbiotic hemoglobin, 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygen-
ases.

Введение

Несимбиотический гемоглобин играет важную роль в цепях передачи сигнала аук-
сина, этилена, цитокинина и других растительных гормонов [1]. Растительные гемогло-
бины, как и другие глобины, поглощают свет видимой и ближней ИК области спектра
[2]. Можно предположить, что лазерное излучение, поглощаемое глобинами, способно
индуцировать сигнальные сети, корректирующие метаболизм растений. Ранее нами
были построены такие сопряженные с глобиновым EsDOS белком и флавогемоглобином
сети, обеспечивающие фотобиомодуляцию клеток бактерий [3]. Диагностика таких се-
тей показала, что в условиях физиологической – хондрциты [4], или патологической -
ишемизированный миокард [5], гипоксии восприятие и процессинг лазерного сигнала в
видимом и ближнем ИК диапазонах могут осуществляться с участием цитоглобина и

глобиновой растворимой гуанилатциклазы млекопитающих. Задачей настоящего исследования является изучение возможности долгосрочной индукции метаболической сети, корректирующей прорастание семян, после короткого лазерного сигнала с параметрами, соответствующими спектральным и кинетическим характеристикам несимбиотического гемоглобина,

Цель работы

Целью данной работы является диагностика лазерноиндуцируемой сигнальной сети, корректирующей прорастание семян, сопряженной с растительным глобином – потенциальным рецептором лазерного излучения.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований применялись семена ярового тритикале сорта “Кармен” (место возделывания: ФГБНУ ВНИИСХ, урожай 2013 года). Определение влажности проводилось согласно ГОСТ 12041-82; массы 1000 семян по ГОСТ 10842-89, всхожести и энергии прорастания по ГОСТ 12038-84. Для проведения анализов было задействовано следующее оборудование: анализатор цельного зерна и семян Infratec – 1241, счетчик семян Contador в комплекте с блоком отбора проб Contafill, сушильный шкаф UFB 400, весы аналитические LA 230S, весы лабораторные серии GF -3000, прободелитель Probenteiler Typ 1000.

В эксперименте задействовано 30 партий по 100 семян в каждой и одна партия по 100 семян в качестве контрольной (не облучалась)

До облучения семена имели следующие характеристики:

- Влажность семян – 12,15%;
- Масса 1000 семян – 47,72 г ;
- Содержание протеина – 14,2 %;
- Содержание крахмала – 63,5%;
- Содержание клейковины – 35,1%.

Лазерную обработку проводили в период марта – апреля 2014г. Монослой семян (около 100штук) облучали в чашке Петри диаметром 5 см при комнатной температуре и рассеянном естественном освещении. Была исследована реакция семян на непрерывное красное (длина волны 670нм, мощность 10мВт, время облучения 10 - 120сек) или импульсное ближнее инфракрасное (длина волны 890нм, длительность импульса 70нсек, частота повторения импульсов 280 – 3000Гц, мощность 90 - 100 Вт, время облучения 10 – 120 сек) излучение полупроводниковых лазеров. После облучения опытные и контрольные (необлученные), образцы инкубировали при комнатной температуре, влажности и естественном рассеянном освещении. Процесс проращивания индуцировался через неделю после облучения. Проращивание семян проводилось при постоянной температуре равной 20°C в темноте. В качестве ложа использовалась фильтровальная бумага. Энергия прорастания определялась через 3 суток. Всхожесть семян определялась на 8 сутки. Критерии эффективности прорастания семян и статистическая обработка результатов описана нами ранее [6].

Результаты

Известно, что лазерное излучение с длинами волн, лежащими в полосах поглощения глобинов, используется для оптимизации агротехнологий [7]. В наших экспериментах проведено сравнение эффективности фотобиомодуляции процесса прорастания семян при воздействии лазерного сигнала, воспринимаемого окисленными глобинами в низкоспиновой (670nm) или высокоспиновой (890nm) формах [2].

Как следует из данных, представленных на рисунке, в контрольных образцах доля не проросших к третьему дню семян составляет 25% и уменьшается к восьмому дню до 17%

(Рис., кривая 1). Облучение семян красным (670нм) светом приводит к снижению доли непроросших семян до 17% в ранние сроки с последующим дальнейшим снижением до 11% (Рис., кривая 2). В случае импульсного ближнего ИК излучения (890нм) к третьему дню наблюдается резкое в 1,8 раза по сравнению с соответствующим контролем снижение доли непроросших семян (Рис., кривая 3). В поздние сроки снижение этого показателя для низкой частоты повторения импульсов приближается к уровню эффекта красного света (Рис., кривая 3). Минимальный для наших условий уровень – 8%, что более чем в 2 раза ниже контрольного, наблюдается при облучении семян ближним ИК излучением с максимальной в наших экспериментах частотой повторения импульсов (Рис., кривая 4).

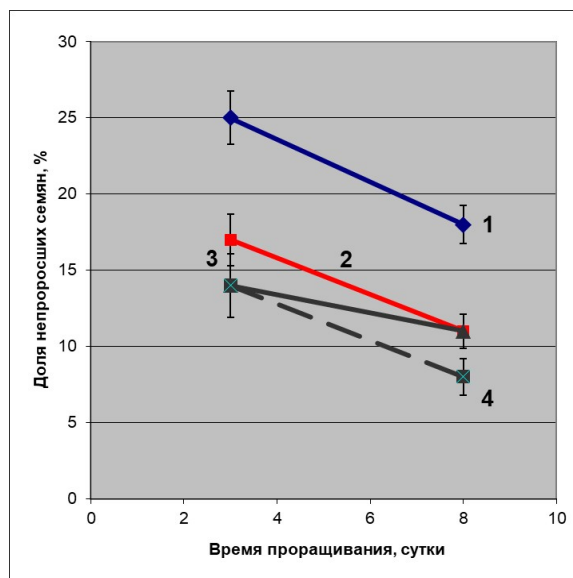


Рис. Зависимость доли непроросших семян тритикале от времени проращивания контрольных (необлученных) (1), и облученных излучением полупроводниковых лазеров с длиной волны 670нм, 10сек (2), или 890нм с частотой повторения 280Гц, 10сек (3) или 3000Гц, 120сек (4).

Обсуждение

Результаты наших экспериментов по исследованию зависимости фотобиомодуляции процесса прорастания семян от длины волны и частоты повторения импульсов показали, что в окисленной форме несимбиотический гемоглобин может воспринимать лазерный сигнал, способствующий восстановлению хромофора, превращающего его в лейкоформу. Выявлены особенности воздействия на скорость прорастания импульсного ближнего ИК излучения. Оптимальная частота повторения импульсов – 3000Гц удовлетворительно согласуется со скоростью связывания лиганд – 1911 сек^{-1} , характерной для присутствующего в семенах злаков несимбиотического гемоглобина [8]. Гемоглобин в семенах экспрессируется в условиях гипоксии [9], что сближает его с цитоглобином млекопитающих, который в восстановленном состоянии служит O_2 – провайдером 2-оксоглутарат/Fe(II)-зависимой диоксигеназы - пролилгидроксилазы коллагена [10]. При исследовании фотобиомодуляции хондроцитов в условиях физиологической гипоксии нами было показано, что восприятие лазерного сигнала цитоглобином, модулируя активность пролилгидроксилазы коллагена, действительно способно усиливать в хондроцитах синтез коллагена [4]. Поскольку в клетках растений пролилгидроксилазы играют важную роль, в том числе и в формировании клеточных стенок [11], можно предположить, что растительный глобин также передает лазерный сигнал на эти ферменты, относящиеся к классу 2-оксоглутарат/Fe(II)-зависимых диоксигеназ [12]. Как и цитоглобин в клетках млекопитающих [13], несимбиотический гемоглобин [14] локализуется не только в цитоплазме, но и в ядре клеток, что позволяет предположить его взаимодействие с 2-

оксоглутарат/Fe(II)-зависимыми диоксигеназами – деметилазами гистонов [12], открывающим перспективу включения в лазерноиндуцируемую сеть эпигенетическую регуляцию широкого круга геномметаболических процессов. Кроме общих с млекопитающими видов 2-оксоглутарат/Fe(II)-зависимых диоксигеназ растения содержат и специфические 2-оксоглутарат/Fe(II)-зависимые диоксигеназы, определяющих синтез и метаболизм гиббереллина, биосинтез этилена, катаболизм салициловой кислоты и ауксина [12], способные обеспечить конечный эффект долгосрочной лазерной коррекции метаболических сетей после короткого светового сигнала.

Выводы

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

Впервые проведена диагностика лазерноиндуцируемой сигнальной сети корректирующей прорастание семян на основе сопоставления экспериментальных данных по определению оптимальных параметров фотобиомоделирующего лазерного излучения и метаболической роли фоторецептора с соответствующими спектральными и кинетическими параметрами – несимбиотического гемоглобина, в качестве O₂-провайдера для 2-оксоглутарат/Fe(II)-зависимых диоксигеназ.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

Литература

- Hill R.D. Non- symbiotic haemoglobins. What's happening beyond nitric acid scavenging?. *AoB Plants*. 2012. 2012: pls004. doi: 10.1093/aobpla/pls004
- Nozawa, T. Yamamoto, W. Hatano. Infrared magnetic circular dichroism of myoglobin derivatives // *Biochim. et Biophys. Acta*. 1976. V. 427. P. 28-37.
- Тифлова О.А. Светочувствительная метаболическая сеть в клетках *Escherichia coli*: спектральная селективность и репаративные функции глобиновых фоторецепторов. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2013, Т. 53, С. 71-77.
- 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
- Тифлова О.А., Дмитриев А.К. Эндогенные глобины и трансмиокардиальная лазерная ревазуляризация. Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии, материалы Международной конференции IT + M&Ec`2018 (Гурзуф, с 01 по 11 июня 2018 г.). С.186 -190.
- Гришин А.П., Гришин А.А., Гришин В.А., Левина Н.С., Кондратова Т.А., Бидей И.А., Ульянов В.А., Тифлова О.А. Лазерное облучение семенного материала тритикале сорта «Кармен». // *Инновации в сельском хозяйстве*. 2016. № 3(18), С. 118-125.
- Будаговский А.В. Теория и практика лазерной обработки растений. Мичуринск-наукоград РФ, 2008, 548 с.
- Hargrove MS. A Flash photolysis method to characterize hexacoordinate hemoglobin kinetics. // *Biophys J* 2000; V. 79. P.2733-2738.
- Taylor ER, Nie XZ, MacGregor AW, Hill RD. A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. // *Plant Mol Biol* 1994; V. 24. P. 853-862.
- Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, Roesner A, Schmidt M, Weich B, Wystub S, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Bolognesi M, de Sanctis D, Marden MC, Kiger L, Moens L, Dewilde S, Nevo E, Avivi A, Weber RE, Fago A, Burmester T. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family// *J. Inorg. Biochem*. 2005. V. 99. № 1. P. 110-119.

11. [Duruflé H.](#), [Hervé V.](#), [Balliau T.](#), [Zivy M.](#), [Dunand C.](#), [Jamet E.](#) Proline Hydroxylation in Cell Wall Proteins: Is It Yet Possible to Define Rules? // *Front Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 180 -187.
12. Farrow S. C., Facchini P. J. Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism // *Front Plant Sci.* 2014. V. 5. P. 524 - 537.
13. Singh S., Canseco D.C., Manda S.M., Shelton J. M., Chirumamilla R. R., Goetsch S. C., Ye Q., Gerard R. D., Schneider J. W., Richardson J. A., Rothermel B. A., Mammen P.A. Cytoglobin modulates myogenic progenitor cell viability and muscle regeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 V. 111(1). P. E129–E138.
14. Seregelyes C, Mustardy L, Ayaydin F, Sass L, Kovacs L, Endre G, Lukacs N, Kovacs I, Vass I, Kiss GB, Horvath GV, Dudits D. Nuclear localization of a hypoxia-inducible novel nonsymbiotic hemoglobin in cultured cells. // *FEBS Lett* 2000; 482:125-130.

Сведения об авторах

Ольга Антоновна Тифлова

кбн, с.н.с.

Эл. почта: olantp@gmail.com

Александр Константинович Дмитриев

н.с.

Эл. почта: dmitriev_a62@mail.ru

ИФТ ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН

Москва, Россия

Information about authors

O. A. Tiflova

senior researcher, candidate of sciences

E-mail: olantp@gmail.com

Alexandr Konstantinovich Dmitriev

Researcher

E-mail: dmitriev_a62@mail.ru

FRC "Crystallography and Photonics" RAS

Moscow, Russia

УДК 53.01

ГРНТИ 34.17.09

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.54

^{1,2}Елкина А.А., ^{1,2}Козин С.В., ^{1,2}Кравцов А.А.

¹Кубанский государственный университет

²ЮНЦ РАН

ВЛИЯНИЕ ОБЕДНЕННОГО ДЕЙТЕРИЕМ ПИТЬЕВОГО РАЦИОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦНС ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ НОРМЫ И НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ С ГИПЕРКАПНИЕЙ

Изучено влияние длительного (42 дня) введения в рацион крыс обеднённой по дейтерию воды (ОДВ) на функциональное состояние ЦНС в условиях нормы и нормобарической гипоксии с гиперкапнией. Установлено также, что применение ОДВ как в условиях нормы, так и после стрессового воздействия способствует значительному снижению эмоциональной тревожности животных. Длительное применение ОДВ до гипоксического воздействия (воздействие амнезирующего фактора) способствует сохранению обучаемости и памяти на уровне контроля, т.е. оказывает выраженный протективный антиамнестический эффект.

Ключевые слова: *изотоп, гипоксия, дейтерий, анксиолитический эффект, антиамнестический эффект.*

Elkina A.A., Kozin S.V., Kravtsov A.A.

Kuban State University, SSC RAS

INFLUENCE OF DEUTERIUM-DEPLETED DRINKING DIET ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF ANIMALS UNDER RATE AND NORMOBARIC HYPOXIA WITH HYPERCAPNIA

The effect of long-term (42 days) introduction of deuterium-depleted water into the diet of rats on the functional state of the central nervous system under normal conditions and normobaric hypoxia with hypercapnia was studied. It was also established that the use of deuterium-depleted water both under normal conditions and after stressful exposure contributes to a significant decrease in the emotional anxiety of animals. Long-term use of deuterium-depleted water before hypoxic exposure (exposure to the amnesic factor) contributes to the preservation of learning and memory at the control level, i.e. has a pronounced protective anti-amnesic effect.

Keywords: *isotope, hypoxia, deuterium, anxiolytic effect, anti-amnesic effect.*

Введение

Как известно, одним из ведущих факторов гибели нервных клеток при тяжелом гипоксическом воздействии является развитие окислительного стресса, который характеризуется повышенным образованием свободных радикалов и снижением активности антиоксидантной системы [1,2]. В настоящее время установлено, что окислительный стресс играет важнейшую роль в нейродегенеративных процессах, наблюдающихся при инсультах и инфарктах мозга, черепно-мозговых травмах, а также ряде нейродегенеративных заболеваний [3,4]. То есть, вызывая каскад необратимых метаболических изменений в мозговых структурах, гипоксия нарушает целый ряд процессов, что проявляется в том числе, в нарушении функционального состояния ЦНС [5].

В качестве одного из возможных механизмов коррекции метаболических и функциональных нарушений ЦНС рассматривается применение воды модифицированного изотопного состава - обеднённой дейтерием воды [6].

К настоящему времени установлено, что введение в рацион животных ОДВ приводит к снижению концентрации дейтерия в плазме крови и тканях различных органов в том числе головного мозга. При этом изменение баланса дейтерия из-за замещения дейтерия на протий может оказывать влияние на многие биологические процессы [7-12]. В этой связи представлялось целесообразным изучить в эксперименте влияние ОДВ на окислительные процессы в головном мозге и функциональное состояние ЦНС в условиях гипоксии.

Цель работы

Исследование влияния применения ОДВ на уровень тревожности и обучение крыс в условиях нормоксии и острой гиперкапнической гипоксии.

Эксперимент выполнен по методике, описанной в статье [13]. Результаты изучения влияния воды с модифицированным (D/H) изотопным составом (50 ppm) на тревожность крыс в нормальных условиях и после воздействия гипоксии с гиперкапнией в тесте ПКЛ (приподнятый крестообразный лабиринт) показали, что через сутки после гипоксии у крыс, принимавших воду с природным содержанием дейтерия (группа 3), наблюдался более высокий в сравнении с животными в группе 1 (контроль) уровень тревоги, что проявлялось в снижении числа заходов в ЗР (закрытые рукава) на 37,5 %, снижении числа стоек на 46,7%, отсутствии свешиваний с ОР (открытые рукава) лабиринта. Животные группы 3 меньше времени (на 66,7%) находились в центре и более длительный период времени в ЗР. В ОР не заходили, контрольные животные (группа 1) провели в них менее 2% времени (4 сек). У крыс 4 группы (50 ppm, гипоксия) отмечалась значительно менее выраженная тревожность в сравнении с 3 группой (150 ppm, гипоксия). Так, крысы, получавшие ОДВ и подвергшиеся гипоксии, больше времени находились в центре и меньше в ЗР ($p < 0,05$). У этих животных отмечалась более высокая исследовательская активность (число стоек было выше на 41,2%), более низкая частота груминга (на 73,3%), наблюдались свешивания. У животных 2 группы (50 ppm) практически по всем показателям уровень тревоги был достоверно ниже, чем у контрольных животных. Таким образом, анализ поведенческих реакций через сутки после воздействия гипоксии с

гиперкапнией в тесте ПКЛ показывает, что у крыс, принимавших воду с природным содержанием дейтерия и подвергшихся гипоксическому воздействию, отмечается высокий уровень тревожности. Длительное (в течение 42 дней) применение ОДВ как в условиях нормы, так до гипоксии способствует значительному снижению эмоциональной тревожности животных.

Исследование влияния воды с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm) на выработку условного рефлекса с положительным подкреплением у крыс в условиях нормы и гипоксии с гиперкапнией в Т-образном лабиринте (рис. 1) показало, что ОДВ в норме не оказывает влияния на обучаемость животных. Число правильных побегов в группе 2 (50 ppm) во все дни обучения практически не отличалось от таковых в контроле. Достоверно ниже (на 23 %), чем в контроле в первый день обучения было число правильных побегов у животных группы 3 (150 ppm, гипоксия). На второй день процент правильных побегов в этой группе хотя и повысился до 57 %, однако был ниже, чем в контроле (68 %). На четвертый день процент правильных побегов практически не отличался от контроля. В то время как в группе 4 (50 ppm, гипоксия) число правильных побегов во все дни исследования находилось на уровне контроля (группа 1) при этом в первый день оно достоверно превышало таковое в группе 3.

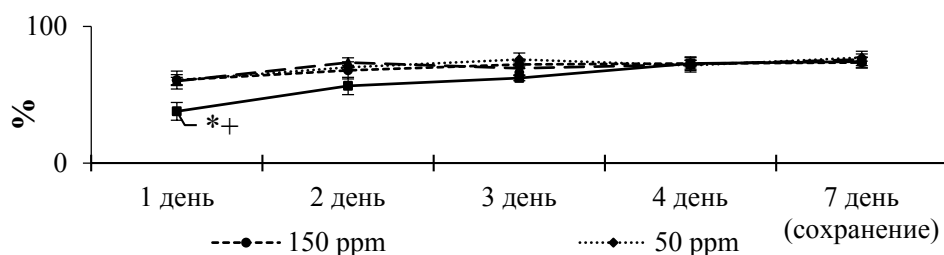


Рисунок 1. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm) в норме и при воздействии гипоксии на % правильных побегов в тесте Т-образный лабиринт.

В группе 3 (150 ppm, гипоксия) (рис. 2) наблюдались выраженные отличия и во времени выполнения условно-рефлекторной реакции (УРР). Так, несмотря на то, что в первый день обучения у всех животных время выполнения условно-рефлекторной реакции было самым длительным, в группе 3, 150 ppm, гипоксия, оно достоверно превышало (на 66,7%) таковое в контрольной группе и на 52,7% в группе крыс, получавших воду с содержанием дейтерия 50 ppm и подвергнутых гипоксии (группа 4). И, хотя время выполнения условно-рефлекторной реакции с каждым днём постепенно сокращалось во всех группах, тем не менее в группе 3 с 1 по 3 день обучения оно было более длительным чем контроле и достоверно более продолжительным, чем в группе 4. И только на четвертый день обучения время выполнения УРР во всех группах практически не отличалось от контроля (группа 1).

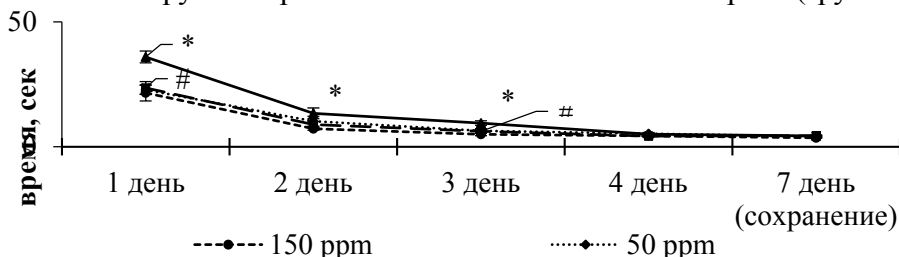


Рисунок 2. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm) на время выполнения условно-рефлекторной реакции в тесте Т-образный лабиринт.

Через 2 суток после окончания обучения у всех животных сохранились навыки условно-рефлекторной реакции двустороннего чередования право- и левосторонних побегов, при этом существенных отличий между группами не было. Не было отличий и во времени выполнения условно-рефлекторной реакции.

Таким образом, установлено, что длительное применение ОДВ в норме не оказывает влияния на обучаемость животных, в то время как применение её до гипоксического воздействия (воздействие амнезирующего фактора) способствует сохранению обучаемости и памяти на уровне контроля, т.е. оказывает выраженный протективный антиамнестический эффект.

Полагаем, что влияние потребления ОДВ на метаболические процессы, может быть обусловлено изотопным замещением (D/H) в активных и аллостерических центрах ферментов, а также замещением молекул HDO на H₂O в гидратной оболочке белков и нуклеиновых кислот. Избирательные изменения в активных и аллостерических центрах ферментов, связанные с обменом изотопов водорода в составе легкодиссоциирующих групп (гидроксильных (–OH), тиоловых (–SH), первичных и вторичных аминогрупп (–NH₂, =NH)), увеличивающие содержание протия, могут изменять скорость каталитических процессов за счет снижения энергии активации переходных состояний молекулы в ходе осуществления реакций биокатализа.

Кроме того, изменение изотопного D/H состава тканей и биологических жидкостей может способствовать изменению функционального состояния организма, связанного с развитием общих неспецифических адаптационных реакций, которые развиваются в ответ на действие любого эндогенного или экзогенного фактора. Этот эффект также может быть одним из механизмов, обеспечивающих анксиолитическое и антиамнестическое действие ОДВ при длительном её потреблении.

Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности применения ОДВ в качестве антиамнестического и анксиолитического фармакологического средства и необходимости проведения дальнейших исследований механизмов её действия [14].

Источник финансирования

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-44-233005, №20-34-90014) и государственного задания ЮНЦ РАН (№АААА-А19-119040390083-6).

Цитируемая литература

1. Bondy S.C., LeBel C.P. The Relationship Between Excitotoxicity and Oxidative Stress in the Central Nervous System // *Free Radical Biology & Medicine*. 1993. 14: 633–642.
2. Попова М.С., Степаничев М.Ю. Индукция клеточного цикла, амилоид-бетта и свободные радикалы в механизме развития дегенеративных процессов в мозге // *Нейрохимия*. 2008. 25(3): 170–178.
3. Netto C.A., Sanches E., Odorcyk F.K., Duran-Carabali L.E., Weis S.N. Sex-Dependent Consequences of Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia in the Rat // *J. Neurosci. Res*. 2017. 95(1–2): 409–421.
4. Исаев Н.К., Стельмашук Е.В., Плотников Е.Ю., Хряпенкова Т.Г., Лозиер Е.Р., Долудин Ю.В., Силачев Д.Н., Зоров Д.Б. Роль ацидоза, NMDA-подтипа глутаматных рецепторов и кислоточувствительных ионных каналов (ASIC1a) в развитии нейрональной гибели при ишемии // *Биохимия*. 2008. 73(11): 1461–1466.
5. Martin H.L., Teismann P. Glutathione - a review on its role and significance in Parkinson's disease // *FASEB J*. 2009. 23(10): 3263–3272.
6. Козин С.В., Кравцов А.А., Елкина А.А., Злищева Э.И., Барышева Е.В., Шурыгина Л.В., Моисеев А.В., Барышев М.Г. Изотопное замещение дейтерия на протий в тканях головного мозга крыс изменяет его резистентность к гипоксии // *Биофизика*. 2019. 64(2): 362–370.
7. Елкина А.А., Тумаев Е.Н., Басов А.А., и др. Механизмы взаимодействия стабильных изотопов с биологическими объектами с учетом нескомпенсированного нейтрона в химических связях // *Биофизика*. 2020. Т. 65. № 5. С. 1034–1040. doi: 10.31857/S0006302920050221
8. 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. Vol. 24 (22). P.4101. doi:10.3390/molecules24224101

9. Syroeshkin A.V., Antipova N.V., Zlatska A.V., Zlatskiy I.A., Skylska M.D., Grebennikova T.V., Goncharuk V.V. The effect of the deuterium depleted water on the biological activity of the eukaryotic cells // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2018. 50: 629–633.

10. Chernukha I.M., Fedulova L.V., Kotenkova E.A., Vasilevskaya E.R., Lisitsyn A.B. The effect of water with modified isotope (D/H) composition on the reproductive function and postnatal development in rats // Voprosy Pitaniia 2016. 85(5): 36–43.

11. Basov A., Fedulova L., Baryshev M., Dzhimak S. Deuterium-depleted water influence on the isotope $2\text{H}/1\text{H}$ regulation in body and individual adaptation // Nutrients. 2019. 11(8), P. 1903; doi:10.3390/nu11081903.

12. Basov A., Drobotenko M., Svidlov A., et al. Inequality in the frequency of the open states occurrence depends on single $2\text{H}/1\text{H}$ replacement in DNA // Molecules. 2020. V. 25. Is. 16. P. 3753. doi: 10.3390/molecules25163753

13. Козин С.В., Кравцов А.А., Злищева Э.И., Шурыгина Л.В., Малышко В.В., Моисеев А.В., Елкина А.А., Барышев М.Г. Влияние обедненного дейтерием питьевого рациона на функциональное состояние центральной нервной системы животных в условиях гипоксии // Биофизика. – 2020. – Т. 65, № 6. – С. 1196–1202.

14. Джимаков С.С., Копытов Г.Ф., Елкина А.А., и др. Влияние на энергию ковалентной связи изотопного состава формирующих ее ядер // Известия вузов. Физика. 2020. № 11.

Сведения об авторах

Елкина Анна Анатольевна

м.н.с.

Эл. почта: 013194@mail.ru

Козин Станислав Владимирович

м.н.с.

Эл. почта: stas.fizika@list.ru

Кравцов Александр Анатольевич

к.б.н., н.с.

Эл. почта: aakravtsov@mail.ru

Кубанский государственный университет

Краснодар, Российская Федерация

ЮНЦ РАН

Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Information about authors

Anna A. Elkina

Junior Research Fellow

Эл. почта: 013194@mail.ru

Stanislav V. Kozin

Junior Research Fellow

Эл. почта: stas.fizika@list.ru

Alexandr A. Kravtsov

PhD

Эл. почта: aakravtsov@mail.ru

Kuban State University

Krasnodar, Russia

SSC RAS

Rostov-on-Don, Russia

ВОЗМОЖНОСТИ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИИ В ОЦЕНКЕ КОЛЛАТЕРАЛЬНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Задачей настоящего исследования являлось показать роль и возможности ЭЭГ в оценке ККМ. Представлены результаты ретроспективного анализа ЭЭГ 210 больных с крупными и гигантскими аневризмами мозга различной локализации, которым в плане нейрохирургического лечения предстояло выключение сосуда, несущего аневризму. В работе использована проба с пережатием сонной артерии на шее, ведущая к ограничению кровотока по магистральным сосудам головы. Для анализа ЭЭГ использовали визуальный и математический методы с вычислением спектров мощности и спектров когерентности ЭЭГ, а также параметра «dist», характеризующего отклонения параметров от данных усредненной нормы и при разных формах компенсации ККМ. Применение методов математического анализа значительно расширяет диагностические возможности ЭЭГ в оценке ККМ, позволяя выявить изменения БЭАМ, скрытые при рутинном визуальном анализе и выразить их в более информативной, количественной, форме.

На основании полученных данных при визуальном анализе ЭЭГ нами были выделены три формы ККМ: компенсированная, субкомпенсированная и декомпенсированная. В работе показано, что существует тесная корреляционная связь между параметрами средних уровней частотных, амплитудных и когерентных показателей ЭЭГ при различных формах компенсации коллатерального кровообращения мозга. Из использованных параметров математического анализа ЭЭГ наиболее информативным, на наш взгляд, является критерий отклонений «dist», т.к. он не зависит от исходного уровня параметров ЭЭГ в норме, при наличии патологического процесса и при сдавлении СА на шее.

Полученные данные применяются для предупреждения ишемических осложнений в наблюдениях с предполагаемым в процессе операции выключением сосудов.

Ключевые слова: ЭЭГ, коллатеральное кровообращение мозга, математический анализ ЭЭГ

Sazonova O.B., Ogurtsova A.A., Troshina E.M., Masherov E.L.

Burdenko National Research Center of Neurosurgery, Ministry of Healthcare of the Russian

THE POSSIBILITIES OF ELECTROENCEPHALOGRAPHY IN ASSESSING THE COLLATERAL BLOOD CIRCULATION OF THE HUMAN BRAIN

The purpose of this study was to show the role and capabilities of EEG in the assessment of collateral brain circulation (CBM). The paper presents the results of a retrospective EEG analysis of 210 patients with large and giant cerebral aneurysms of various localization, who, in the order of neurosurgical treatment, had to turn off the vessel carrying the aneurysm. We used a test with compression of the carotid artery in the neck, leading to restriction of blood flow through the main vessels of the head. For EEG analysis, visual and mathematical methods were used with the calculation of power spectra and EEG coherence spectra, as well as the “dist” parameter characterizing deviations of parameters from the averaged norm data and with different forms of CBM compensation. The use of methods of mathematical analysis significantly expands the diagnostic capabilities of EEG in assessing CBM, allowing you to identify changes in bioelectrical brain activity, hidden during routine visual analysis and express them in a more informative, quantitative form.

Based on the data obtained, during visual analysis of the EEG, we identified three forms of CBM: compensated, subcompensated, and decompensated.

The work shows that there is a close correlation between the parameters of the average levels of frequency, amplitude and coherent EEG indicators in various forms of compensation for collateral circulation of the brain, The most informative from the used parameters of the EEG mathematical analysis, in our opinion, is the criterion of deviations "dist". It does not depend on the initial level of EEG parameters and may be used in normal conditions, in the presence of a pathological process and in the presence of compression of the SA on the neck.

This method is used to prevent ischemic complications during the operation with the planned shutdown of the vessels.

Keywords: EEG, collateral blood circulation of the brain, mathematical analysis of EEG

Настоящая работа является результатом ретроспективного анализа ЭЭГ пациентов, которым в плане нейрохирургического лечения предстояло временное либо стационарное выключение сосуда, несущего аневризму или кровоснабжающего опухоль, а также во время эндартерэктомии. Для выбора тактики оперативного вмешательства и прогнозирования возможных ишемических осложнений необходимо знать состояние коллатерального кровоснабжения мозга (ККМ). Для решения этой задачи используются различные инвазивные и не инвазивные методы: каротидная ангиография (КАГ), магнито-резонансная томография (МРТ), ультразвуковая транскраниальная доплерография (УЗДГ). [1,3,4,10,12,15] Они позволяют получить информацию об анатомическом строении артериального круга большого мозга и характере кровотока в определенных мозговых структурах. При этом остается открытым вопрос о функциональных возможностях ККМ. Одним из не инвазивных методов оценки ККМ служит ЭЭГ [7, 8, 14, 17]

Целью настоящего исследования являлось показать роль и возможности ЭЭГ в оценке ККМ. Для этого регистрируют ЭЭГ с применением специальных функциональных проб (повороты головы, сгибание-разгибание шеи, пальцевое сдавление сонной артерии на шее), ведущих к ограничению либо прекращению кровотока по магистральным сосудам головы. [Чаще используется проба с пережатием сонной артерии на шее, т.к. при этом можно избежать артефактов, связанных с движениями головы, на которой наложены электроды. Проба эта была предложена в 1957г. Матасом, применялась для выявления стеноза или окклюзии сонной артерии и получила название « тест Матаса». В последующем для проведения пробы были введены ограничения, т.к. у больных в тяжелом состоянии, с выраженным атеросклеротическим поражением сосудов мозга возможно развитие осложнений. В зависимости от характера и степени выраженности изменений биоэлектрической активности мозга (БЭАМ) в ходе подобной процедуры можно оценить степень адекватности работы мозговых коллатералей. [7,11, 13, 16,17]

Для характеристики БЭАМ использовали визуальный - качественный анализ ЭЭГ, а также математический - количественный анализ.

Материал и методы исследования. Представлены результаты ретроспективного анализа ЭЭГ 210 больных с крупными и гигантскими аневризмами мозга (1,5- 2,5 см) различной локализации. Диагноз аневризмы во всех случаях был верифицирован АГ, МРТ, а в 197 наблюдениях (94%) был подтвержден во время хирургического вмешательства. По локализации аневризмы распределились следующим образом: основную группу больных составили пациенты с расположением аневризмы на внутренней сонной артерии (91 больной); у 6 пациентов были выявлены аневризмы передней мозговой и передней соединительной артерии; в 17 наблюдениях аневризмы локализовались на средней мозговой артерии. Из общего количества обследованных больных 75 (36,4%) перенесли верифицированное люмбальной пункцией внутричерепное кровоизлияние. Исследование БЭАМ осуществлялось преимущественно в отдаленном периоде кровоизлияния (больше 1 месяца) - 98% наблюдений.

Клиническая картина больных в «холодном» периоде кровоизлияния характеризовалась наличием симптомов, свидетельствующих о раздражении базально - диэнцефальных структур: головной боли, больше на стороне локализации аневризмы, болей в зонах лица и шеи, глазодвигательных нарушений, снижения остроты зрения, изменения полей зрения по типу битемпоральной гемианопсии, а также вегетативных нарушений. Выраженность и характер этих симптомов зависели от размера и локализации аневризмы. При аневризмах средней мозговой артерии отмечались также локальные проявления в виде двигательных, чувствительных и речевых нарушений. При аневризмах передней мозговой- передней соединительной артерий отмечались нарушения памяти и психики.

Регистрацию ЭЭГ проводили на 18-канальном электроэнцефалографе фирмы «Nihon Kohden» (Япония) с одновременной регистрацией на ЭВМ по программе "Нейрокартограф" (МБН). Схема наложения электродов Международная- «10-20%» (1957г). Референтные электроды- на мочках ушей. Установка фильтров стандартная (0,3/ 35). Регистрировали фоновую ЭЭГ, во время теста Матаса (в течение 5 -10 минут) и после пробы. Записанная на ЭВМ ЭЭГ (монополярные отведения) редактировалась. Каждый временной отрезок (эпоха) ЭЭГ подвергался математической обработке с вычислением спектров мощности и спектров когерентности. Для сокращения объема анализируемой информации вычисляли обобщенные характеристики спектров: среднюю частоту спектра (f_{cp} ; Mean) и эффективную частотную полосу спектра ($\square f_{эфф.}$; Eff). Для оценки степени отклонения вычисляемых параметров в динамике теста Матаса от данных фоновой ЭЭГ использовали параметр, предложенный Е.Л. Машеровым, обозначенный как «dist.», количественно характеризующий эти отклонения в разных областях мозга и в среднем по каждому из полушарий. Полученные результаты обработаны статистически (по программе « Статистика»).[9, 16]

Полученные результаты. При регистрации ЭЭГ во время проведения теста Матаса обращали внимание на изменения БЭАМ, возникающие при пальцевом сдавлении сонной артерии шее на стороне аневризмы. На основании полученных данных при визуальном анализе ЭЭГ нами были выделены три формы ККМ: компенсированная, субкомпенсированная и декомпенсированная.[5,6,7,8,9]

У 75 больных в ходе сдавления СА на шее в ЭЭГ не было отмечено существенной динамики по сравнению с исходной фоновой картиной биопотенциалов мозга, что свидетельствовало о наличии адекватного – компенсированного, ККМ. Клинически больные переносили пробу хорошо; артериальный круг большого мозга у этих пациентов был сформирован правильно. При вычислении математических параметров, характеризующих ЭЭГ, было получено, что средняя частота спектра и эффективная частота ЭЭГ не претерпевали существенной динамики по сравнению с фоном. Наблюдались отклонения этих показателей как в сторону их повышения, так и понижения, но выражены они были не резко. Коэффициент отклонения этих параметров от фоновых- Dist fon, не превышал к пятой минуте пережатия 1,0 . В 9 наблюдениях через несколько секунд после пережатия СА на ЭЭГ отмечалось появление медленных волн очагового характера, как на стороне компрессии, так и билатерального характера. Указанные изменения происходили на фоне значительных общемозговых нарушений БЭАМ в виде выраженной дезорганизации корковой ритмики, нарастания признаков раздражения срединных структур мозга. Клинически отмечались признаки недостаточности мозгового кровообращения в виде слабости в контралатеральных конечностях, головной боли, головокружения, в 2-х случаях - кратковременного нарушения сознания, что свидетельствовало о неадекватности - декомпенсации ККМ. В таких случаях проведение пробы прекращали во избежание клинических осложнений. У этих больных виллизиев круг был разобран в передних либо в задних его отделах.

Наибольший интерес представляет группа больных (126 наблюдений), с субкомпенсированной формой ККМ. У всех больных этой группы артериальный круг большого

мозга был сформирован правильно, в 42% случаев отмечались признаки гипоплазии сосудов, либо их сужения в результате сдавления аневризмой. У этой категории больных отмечалась не анатомическая, а функциональная, недостаточность ККМ. При проведении исследования у этих пациентов не отмечалось клинических признаков недостаточности кровоснабжения мозга. Однако на ЭЭГ при пережатии сонной артерии на шее выявлялись изменения различной степени выраженности, начиная с нарастания тех изменений, которые наблюдались при фоновой регистрации, увеличения частых форм активности, острых потенциалов и негрубой медленной активности, а также признаков раздражения срединных структур.

В зависимости от характера изменений БЭАМ больные с субкомпенсированной формой ККМ были разделены на три подгруппы.

К первой подгруппе были отнесены больные, у которых при проведении теста сдавления сонной артерии на ЭЭГ отмечалось диффузное увеличение имевшихся в фоне частых форм активности без четких локальных проявлений. Математический анализ ЭЭГ показал нарастание мощности в диапазоне бета- ритма и повышения уровня внутрислоушарной когерентности по частым ритмам преимущественно на стороне патологии. Межполушарная когерентность уменьшалась по всем диапазонам ритмов. Наблюдалось снижение среднего уровня когерентности, преимущественно в лобно-центральных отделах. Увеличивалась средняя и эффективная частота спектра, больше на стороне пережатия. Критерий отклонения достигал уровня 4,15 Гц. Отмеченные изменения имели тенденцию к регрессу.

Ко второй подгруппе были отнесены больные, у которых по данным визуального анализа ЭЭГ при проведении теста Матаса, отмечалось нарастание частых форм активности, а также эпилептоидных компонентов в виде острых импульсов альфа- и тета- диапазонов, не выходящих по амплитуде за уровень фона, локализованных преимущественно в височных и теменных областях на стороне аневризмы. Эти изменения возникали с первой минуты пережатия, нарастали на протяжении пробы и к последним минутам исследования начинали регрессировать. По результатам математической обработки ЭЭГ выявлялось нарастание мощности частых форм активности, а также других диапазонов частот. Увеличивалась межполушарная когерентность по тета- и альфа- диапазонам, а также внутрислоушарная когерентность преимущественно в лобно-центральных отделах. Частотные параметры спектра возрастали, преимущественно в височных отделах и достигали максимальных значений ко 2-3 минуте, после чего постепенно снижались. Критерий Dist достигал максимума на 3 минуте (6,283 Гц) с последующим его снижением.

При исследовании пациентов, отнесенных нами к третьей подгруппе субкомпенсированного ККМ, на ЭЭГ при проведении «каротидной пробы», наряду с увеличением частых форм активности и эпилептоидных знаков, отмечалось появление или нарастание имевшихся в фоне медленных колебаний дельта- тета- диапазонов на стороне патологии. Указанные изменения были максимально выражены на первой минуте пережатия, уменьшались к концу исследования и не выявлялись после окончания пробы. При математической обработке данных выявлялось повышение параметров мощности и внутрислоушарной когерентности в диапазонах медленных колебаний на стороне аневризмы, которое сохранялось почти на всем протяжении исследования. Средний уровень межполушарной когерентности резко падал на первой минуте пробы Матаса, а затем медленно восстанавливался до фонового уровня. Средний уровень внутрислоушарной когерентности резко снижался в лобно-центральных отделах с последующей тенденцией к восстановлению. Эти данные указывают на изменение общего состояния коры с элементами рассогласования системы межцентральных связей. При анализе частотных параметров наблюдалось снижение f_{cp} и $f_{эф}$ на первых минутах исследования, когда они были вы-

ражены максимально, а затем приобретали тенденцию к постепенному регрессу. Параметр Dist резко увеличивался на первой минуте пробы (4,873 Гц) с последующим постепенным уменьшением.

Заключение. Результаты, полученные при регистрации ЭЭГ у больных с артериальными аневризмами мозга в фоне и во время пальцевого сдавления СА на шее, показали возможности ЭЭГ в оценке ККМ, с выделением групп, характеризующих разные степени его компенсации: компенсацию, декомпенсацию и субкомпенсацию.

Применение методов математического анализа значительно расширяет диагностические возможности ЭЭГ в оценке ККМ, позволяя выявить изменения БЭАМ, скрытые при рутинном визуальном анализе и выразить их в более информативной, количественной, форме. В работе показано, что существует тесная корреляционная связь между параметрами средних уровней частотных, амплитудных и когерентных показателей ЭЭГ при различных формах компенсации коллатерального кровообращения мозга. Из использованных параметров математического анализа ЭЭГ наиболее информативным, на наш взгляд, является критерий отклонений «dist», т.к. он не зависит от исходного уровня параметров ЭЭГ в норме, при наличии патологического процесса (в нашем случае аневризмы), и различных функциональных пробах (в данном случае при сдавлении СА на шее).

Полученные данные применяются для предупреждения ишемических осложнений в наблюдениях с предполагаемым в процессе операции выключением сосудов. При адекватном ККМ артерия может быть выключена из кровотока; при декомпенсированном - выключение СА противопоказано, либо может быть выполнено после превентивного создания ЭИКМА. Если в результате исследования ККМ с помощью ЭЭГ выявлена субкомпенсированная форма, свидетельствующая о функциональной его недостаточности, выключение сосуда возможно, у пациентов первой и второй подгруппы, но они требуют наблюдения, а у больных третьей подгруппы можно рекомендовать окклюзию артерии после предварительного наложения ЭИКМА.

Литература

1. Брагина Л.К. // Особенности экстра- и интракраниального кровообращения при окклюдующем поражении артерий, питающих мозг // Автореф. дис. докт. М.: 1974.
2. Гинзбург С.Е. // Электрическая активность и гемодинамика головного мозга при окклюзии мозговых артерий // Минск. 1974.
3. Молотилов А.М. // Диагностическое значение УЗДГ при хирургическом лечении ишемических поражений головного мозга. Автореф. канд., 1990г.
4. Никитин Ю.М. // Метод ультразвуковой доплерографии в исследовании соединительных артерий виллизиевого круга // Журнал невропатологии и психиатрии им. Корсакова. 1982г. т.82. в.1. С.36-39.
5. Русинов В.С. // Биопотенциалы мозга человека // М.: Медицина. 1987.
6. Сазонова О.Б., Лазарев В.А. // Биоэлектрическая активность мозга в условиях острой окклюзии внутренней сонной артерии // «Физиология, патофизиология и фармакология мозгового кровообращения», тезисы I Всесоюзн. конфер. Ереван. 1984.
7. Сазонова О.Б., Сербиненко Ф.А., Смирнов Н.А., Лазарев В.А. // Электроэнцефалография при аневризмах внутренней сонной артерии во время эндоваскулярных операций // Журнал «Вопросы нейрохирургии». 1987. №5. С.30-38.
8. Сазонова О.Б., Сербиненко Ф.А., Лазарев В.А. // Возможности ЭЭГ в эндоваскулярной хирургии // Мат. докл. на симпозиуме по эндоваск. хирургии. Л.: 1990.
9. Сазонова О.Б., Машеров Е.Л. // Картирование ЭЭГ в оценке коллатерального кровообращения мозга // Труды конференции «Современное состояние методов неинвазивной диагностики в медицине». Украина. Ялта - Гурзуф. 1996. С.15.
10. Сербиненко Ф.А., Шахнович А.Р., Фанарджян Р.В. // Количественная характеристика компенсаторных возможностей коллатерального кровообращения в головном

мозге // Сб.: «Физиология, патофизиология и фармакология мозгового кровообращения». Тбилиси. 1988. С.167-168.

11. Спектор С.М. // Динамика ЭЭГ при компрессионной пробе Матаса как критерий эффективности реконструктивных операций на сосудах коронарного бассейна // Журнал «Вопросы нейрохирургии». 1992. №4-5. С.5-8.

12. Фанарджян Р.В. // Клинико-физиологическое исследование коллатерального кровообращения в артериальном круге большого мозга // Автореф. дис. канд. 1989.

13. Чухрова В.А. // Функциональная электроэнцефалография при поражениях магистральных сосудов головы // М.: Медицина. 1973.

14. Kearse L., Lopes-Bresnahan M., McPeck K., Zaslavsky A. // Preoperative Cerebrovascular Symptoms and Electroencephalographic Abnormalities Do not Predict Cerebral Ischemia During Carotid Endarterectomy // Stroke. July 1995. Vol. 26. № 7. 1210-1214.

15. Lukshin V.A., Usachev D.Yu., Shmigelsky A.V., Shulgina A.A., Ogurtsova A.A. Preoperative and Intraoperative Markers of Cerebral Ischemia.// Stroke Biomarkers, New York: Humana Press, 2020. Pp. 349- 369

16. Masherov E.L. Electrochemical Feedback as a Possible Mechanism for Generating the Low-Frequency Component of Bioelectrical Activity of the Brain.// Biophysics, 2019, volume 64, pp. 448–453

17. Schneweis S., Urbach H., Solymosi L., Ries F. // Preoperative risk assessment for carotid occlusion by transcranial Doppler ultrasound // Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry. 1997. №62. 485-489.

18. Smielewski P., Czonika M. and others. // Assessment of Cerebral Autoregulation Using Carotid Artery Compression // Stroke. December 1996. Vol. 27. № 12. 2197-2203.

19. Taylor C., Selman W., Kiefer S., Ratcheson R. // Temporary Vessel Occlusion during Intracranial Aneurysm Repair // Neurosurgery. November. 1996. Vol.39. № 5. 893-906.

Сведения об авторах

Ольга Борисовна Сазонова

к.м.н., вед. науч. сотр.

Эл. почта: OSazonova@nsi.ru

Анна Анатольевна Огурцова

к.м.н., ст. науч. сотр.

Эл. почта: AOgurtsova@nsi.ru

Елена Михайловна Трошина

канд. биол. наук, зав. лаб.

Эл. почта: ETroshina@nsi.ru

Евгений Леонидович Машеров

канд. тех. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: EMasherov@nsi.ru

ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии

им. ак. Н.Н.Бурденко»

Москва, Россия

Information about authors

Olga B. Sazonova

Ph.D., Leading research scientist

E-mail: OSazonova@nsi.ru

Anna A. Ogurtsova

Ph.D., Senior research scientist

E-mail: AOgurtsova@nsi.ru

Elena Troshina

kand. Biol. Sciences', head of the laborator

E-mail: ETroshina@nsi.ru

Eugene Masherov

Engineer

E-mail: EMasherov@nsi.ru

Burdenko National Research Center of Neurosur-

gery

Moscow, Russia

КОРКОВО-КОРКОВЫЕ ВЫЗВАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ В НЕЙРОХИРУРГИИ

В статье обсуждается проблема оценки состояния функциональных взаимосвязей между корковыми речевыми зонами головного мозга. Описан метод регистрации корково-корковых вызванных потенциалов (КК-ВП), проблемы регистрации и трактовки полученных результатов. Представлен уникальный в России материал: 27 пациентов с опухолями головного мозга с интраоперационным картированием речевых зон коры методом КК-ВП. Обсуждаются полученные результаты и варианты их интерпретации, а также перспективы дальнейшего развития метода. Представлены личные выводы авторов по поводу информативности метода и точности его результатов, а также взаимосвязь показателей КК-ВП с послеоперационным клиническим состоянием речевых функций у пациентов после удаления новообразований головного мозга.

Ключевые слова: корково-корковые вызванные потенциалы, нейроонкология, глиальные опухоли, интраоперационный нейрофизиологический мониторинг, функция речи, зоны Брока и Вернике.

Ogurtsova A.A., Bykanov A.E., Maryashev S.A.,
Buklina S.B., Zhukov V.Yu., Pitskhelauri D.I.
N.N.Burdenko NMRCN

CORTICAL-CORTEX EVOKED POTENTIALS IN NEUROSURGERY

The article discusses the problem of assessing the state of functional relationships between speech cortical brain areas. The registration of cortical-cortical evoked potentials (CC-EP), problems of registration and interpretation of the results obtained are described. A unique material in Russia is presented: 27 patients with brain tumors under intraoperative mapping of the cortical speech areas using the CC-EP. The results obtained and options for their interpretation are discussed, as well as the prospects for further development of the method. The authors present their personal conclusions about the significance of the method and the accuracy of its results, as well as the relationship between the CC-EP parameters and the postoperative clinical state of speech functions in patients after removal of brain tumors.

Keywords: cortical-cortical evoked potentials, neurooncology, glial tumors, intraoperative neurophysiological monitoring, speech function, Broca's and Wernicke's area.

Введение.

Сохранение речевой функции – особая задача в нейрохирургии опухолей головного мозга. При локализации патологических образований в области речевых зон коры – Брока или Вернике – перед хирургом стоит непростая задача – сохранить речь и максимально радикально удалить опухоль. Наше понимание языковых сетей между корковыми областями постепенно расширяется, причем в основе этих знаний остается информация о функционировании и локализации дугообразного пучка (*fasciculus arcuatus*), а также других длинных ассоциативных путей белого вещества, связывающих височную, теменную и лобную доли и играющих особую роль в обеспечении функционирования речи. Золотым стандартом в хирургии опухолей в области речевых зон коры является использование интраоперационного пробуждения пациента, во время которого в ходе прямой электростимуляции коры и нейропсихологического речевого тестирования определяется точная индивидуальная анатомическая локализация зон Брока и Вернике. Операция без стимуляции и тестирования может привести в таких случаях к повреждению корковых зон и проводников, что вызовет после операции дефицит речи в виде различ-

ного вида афатических расстройств. Однако не всем пациентам можно проводить оперативное вмешательство с пробуждением. У людей с уже исходно имеющимися речевыми нарушениями невозможно проводить речевое картирование. Также у пациентов с повышенным возбуждением или у детей пробуждение в ходе операции не представляется возможным. В таких случаях необходимы альтернативные подходы к оценке речевых функций, одним из которых, вероятно, является метод регистрации корково-корковых вызванных потенциалов (КК-ВП). Метод был предложен Matsumoto с соавторами в 2004 году, которые проводили стимуляцию лобных областей коры (Брока) с регистрацией усредненных корковых потенциалов с теменно-височных областей (Вернике). В своей работе авторы подтвердили электрофизиологически существование корково-корковой связи между этими двумя областями, соответствующей, вероятно, дугообразному пучку. Метод КК-ВП в настоящее время не применяется рутинно вследствие большого количества сложностей в методологии и трактовке полученных результатов.

Цель работы

Оценить возможность применения и информативность метода регистрации КК-ВП у пациентов с глиальными опухолями, расположенными вблизи речевых корковых зон в ходе их хирургического лечения в условиях интраоперационного пробуждения путем сравнения данных метода с информацией, полученной при классическом картировании речевых зон (по методу Пенфилда, 1937).

Материалы и методы

Материалом для данного исследования послужили результаты обследования 27 пациентов (12 мужчин и 15 женщин) в возрасте от 28 до 62 лет с глиальными опухолями головного мозга, расположенными вблизи речевых корковых зон, получившие хирургическое лечение в НМИЦ Нейрохирургии им. ак. Н.Н.Бурденко за период с 2019 по 2021 год.

У всех пациентов было выявлено наличие глиальных опухолей, расположенных в лобных, височных или в теменных долях головного мозга рядом с речевыми корковыми зонами или воздействующими на проводящие пути. Всем пациентам до операции было проведено функциональное МРТ исследование с определением локализации речевых зон коры – Брока и Вернике, а также МР-трактография с построением основных проводящих путей белого вещества, заинтересованных в обеспечении речевой функции.

Все пациенты были прооперированы в условиях применения методики интраоперационного пробуждения по схеме asleep - awake – asleep. После вскрытия ТМО и пробуждения пациента проводилось картирование речевых зон коры по классической методике Пенфилда: биполярная стимуляция коры прямоугольными единичными монофазными импульсами длительностью 1 мс, подаваемыми с частотой 50 Гц с интенсивностью стимула 3-4 мА. В ходе проведения нейропсихологического тестирования при стимуляции коры в области операционного поля отмечались речевые нарушения, что указывало на наличие в данной области речевых функциональных зон.

После этого на кору в области полученных зон накладывались 8-ми (или 16) контактные корковые субдуральные электроды (гриды) – один на область предполагаемой зоны Брока, а другой на область Вернике. Проводилась стимуляция попарно со всех контактов 1-го электрода и регистрация КК-ВП со второго. Затем проводилась попарная стимуляция со всех контактов второго электрода с регистрацией с контактов первого грида. Полученные ответы усреднялись до 20-50, частотная полоса устанавливалась в диапазоне от 1 до 1000 Гц. Анализировались полученные данные – компоненты КК-ВП N1 и N2, их латентность и амплитуда: определялось, с каких контактов получены более четкие ответы и где они имели максимальную амплитуду, при каких комбинациях пар стимуляции получались наиболее четкие ответы. Регистрация КК-ВП и стимуляция проводилась с помощью мультимодальной системы для интраоперационного мониторинга Нейро-ИОМ (Нейрософт, Иваново).

Полученные результаты

По данным гистологического исследования было выявлено 9 человек с глиомами Gr II и 18 человек с Gr III. По локализации у 15 пациентов опухоль располагалась в задних отделах лобных долей, у 8 – в височной области, у 2 в теменных отделах и у 2 в лобно-височных с распространением в область островка.

При картировании по Пенфилду у 21 пациентов была верифицирована зона Брока и у 6 - зона Вернике. В 12 наблюдениях в ходе удаления опухоли были отмечены речевые нарушения, что свидетельствовало о дисфункции проводников белого вещества.

При исследовании проведения по дугообразному тракту у 20 пациентов проводилась стимуляция коры в лобных отделах (Брока) с регистрацией в области височной коры (Вернике), а также у 18 пациентов в обратном направлении.

По данным КК-ВП в 7 наблюдениях была выявлена зона Брока, в 9 – зона Вернике, в 9 – получены данные по обеим речевым зонам. В 5 наблюдениях четкие компоненты КК-ВП не были получены.

У 20 пациентов выявлено четкое совпадение локализации речевых зон как по данным прямой стимуляции по Пенфилду, так и по данным КК-ВП. У 2 пациентов было частичное совпадение (только одной из зон), и у 5 пациентов (18 % от всей группы) данные не совпали.

Из них: в 1 наблюдении КК-ВП, вероятно, не получились вследствие неправильной постановки височного регистрирующего электрода. Во 2-м – речевые зоны локализовались вне зоны трепанационного окна и электроды на них не стояли. В двух наблюдениях прямое картирование оказалось невозможным вследствие развития судорожного приступа и введения пациента в медикаментозный сон. Однако, были зарегистрированы КК-ВП и определены зоны максимальной амплитуды компонентов, что дало хирургу ориентиры расположения речевых центров и позволило провести удаление опухоли без развития речевых дефицитов после операции. И в 1-м наблюдении компоненты КК-ВП соответствовали анатомическим ориентирам для локализации речевых зон, однако при прямой стимуляции по Пенфилду нарушения речи не были получены. В 17 наблюдениях регистрация КК-ВП проводилась также после удаления опухоли на этапе гемостаза и сравнивались показатели пиков КК-ВП с состоянием до удаления опухоли. Отмечалось как снижение (у 3), так и повышение (у 4) амплитуды компонентов КК-ВП после удаления опухоли.

У 6 пациентов в ходе прямой стимуляции коры по Пенфилду отмечалось развитие эпилептических приступов, что затрудняло и делало невозможным процесс картирования. В раннем послеоперационном периоде у 17 пациентов наблюдалось развитие или нарастание речевых нарушений различной степени выраженности, и в 10 случаях после удаления опухоли речь не изменялась.

Выводы

Проведенное исследование показало, что существует высокий процент совпадения данных коркового речевого картирования (82%) по Пенфилду и КК-ВП. Метод КК-ВП при четком его методологическом исполнении является достаточно точным и позволяет получить данные о локализации речевых зон коры. Также мы показали, что возможна оценка проведения по дугообразному тракту в обе стороны: как при стимуляции зоны Брока с регистрацией на Вернике, так и наоборот, что подтверждает теорию о взаимобратном расположении волокон тракта белого вещества. В одном из наших наблюдений зона Брока имела очень малую область и нехарактерную анатомическую локализацию (вероятно, вследствие смещения зоны опухолью), что привело к ошибкам при классическом картировании речи. И только после регистрации КК-ВП и нахождения максимальной амплитуды компонентов при повторной стимуляции коры в данной области мы получили остановку речи. Эти факты говорят нам о высокой чувствительности

метода. В двух наблюдениях при прямой стимуляции коры было отмечено развитие судорожных приступов, что сделало невозможным прямой картирование. И только методом КК-ВП была установлена локализация функционально значимых областей.

Таким образом, описанный нами метод КК-ВП является перспективным для использования при поиске речевых корковых центров в ходе удаления опухолей головного мозга. Метод высоко информативен, может применяться у разных групп пациентов, а также в случаях невозможности проведения прямого речевого тестирования в условиях пробуждения.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Впервые в нашей стране получены электрографические данные, подтверждающие наличие функциональных корково-корковых связей между речевыми зонами моторной и сенсорной коры головного мозга человека *in vivo*. Статистически доказано совпадение результатов коркового картирования зон речи при использовании классического метода Пенфилда и метода КК-ВП, что делает возможным использование последнего в клинической практике. Это особенно актуально для тех групп пациентов, у которых существуют ограничения применения хирургии с пробуждением (пациенты с изменениями психики, пациенты детского возраста, пациенты с уже имеющимися выраженными речевыми нарушениями).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 19-2901231 мк и РФФИ Т18-29-01032.

Литература:

1. Чищина Н.В., Рзаев Д.А., Мойсак Г.И. Нейрохирургия, 2016, №2, 73-78.
2. Быканов А.Е., Пицхелаури Д.И., Тутов О.Ю., Минг-Чин Лин, Гулаев Е.В., Огурцова А.А., Маряшев С.А., Жуков В.Ю., Буклина С.Б., Лубнин А.Ю., Бешплав Ш.Т., Конакова Т.А., Пронин И.Н. Интраоперационное картирование речевой зоны Брока методом регистрации кортико-кортикальных вызванных потенциалов. Вопросы нейрохирургии им.Н.Н.Бурденко, 2020, №6. 49-58.
3. Giampiccolo D., Parmigiani S., Basaldella F., Russo S., Pigorini A., Rosanova M., Cattaneo L., Sala F. Recording cortico-cortical evoked potentials of the human arcuate fasciculus under general anesthesia. *Clinical Neurophysiology*. 2021.
4. Enatsu R., Gonzales-Martinez J., Bulacio J., Mosher J., Burgess R., Najm I., Nair D. Connectivity of the frontal and anterior insular network: a cortico-cortical evoked potential study. *J Neurosurg*, 2016, 125: 90-101.
5. Keller C., Honey Ch., Megevand P., Entz L., Ulbert I., Mehta A. Mapping human brain networks with cortico-cortical evoked potentials. *Rstb.royalsocietypublishing.org, Phil.Trans.R.Soc.* 2014. В 369:20130528.
6. Matsumoto R., Nair D., LaPresto E., Bingaman W., Shibasaki H., Luders H. Functional connectivity in human cortical motor system: a cortico-cortical evoked potential study. *Brain*, 2007, 130, 181-197.
7. Saito T., Muragaki Y., Kubota Y., Chernov M., Sugiyama K., Sakai K., Iseki H. Intraoperative cortico-cortical evoked potentials for the evaluation of language function during brain tumor resection: initial experience with 13 cases. *J Neurosurg* 2014, 121: 827-838.

Сведения об авторах

Анна Анатольевна Огурцова
к.м.н., ст. науч. сотр.
Эл. почта: AOgurtsova@nsi.ru
Андрей Егорович Быканов
к.м.н., врач
Эл. почта: ABykanov@nsi.ru
Сергей Алексеевич Маряшев

Information about authors

Anna A. Ogurtsova
Ph.D., Senior research scientist
E-mail: AOgurtsova@nsi.ru
Andrey Egorovich Bykanov
Ph.D., M
E-mail: ABykanov@nsi.ru
Sergey Alekseevich Maryashev

д.м.н., врач, ст. науч. сотр.

Эл. почта: Mars@nsi.ru

Светлана Борисовна Буклина

д.м.н., старший научный сотрудник

Эл. почта: SBuklina@nsi.ru

Вадим Юрьевич Жуков

к.м.н., врач

Эл. почта: VJukov@nsi.ru

Давид Ильич Пицхелаури

д.м.н., проф., зав. отделением

Эл. почта: Dav@nsi.ru

ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии

им. ак. Н.Н.Бурденко»

Москва, Россия

Ph.D., MD

E-mail: Mars@nsi.ru

Svetlana Borisovna Buklina

Ph.D., MD

E-mail: SBuklina@nsi.ru

Zhukov Vadim Yurievich

Ph.D., MD

E-mail: VJukov@nsi.ru

Pitskhelauri David Ilyich

Ph.D., MD, professor

E-mail: Dav@nsi.ru

Burdenko National Research Center of Neurosurgery

Moscow, Russia

УДК 573.2: 577.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-1-4.57

Горина С.С., Топоркова Я.Ю.

Казанский институт биохимии и биофизики

– обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕМОПРОТЕИНОВ (P450 И КАТАЛАЗ), УЧАСТВУЮЩИХ В БИОСИНТЕЗЕ ОКСИЛИПИНОВ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

В статье обсуждается сравнительная характеристика гемопротеинов, участвующих в метаболизме гидроперекисей жирных кислот растений и кораллов.

Ключевые слова: гемопротеины, цитохромы P450, каталазы, оксипины

Gorina S.S., Toporkova Ya.Yu.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS

COMPARATIVE ANALYSIS OF HEMOPROTEINS (CYTOCHROME P450 AND CATALASE) PARTICIPATING IN THE BIOSYNTHESIS OF OXYLIPINS IN PLANTS AND ANIMALS

The article discusses the comparative characteristics of hemoproteins involved in the metabolism of fatty acid hydroperoxides in plants and corals.

Keywords: hemoproteins, cytochromes P450, catalases, oxylipins

Введение

Оксипины – окисленные производные полиеновых жирных кислот – представляют собой обширный класс биологически значимых метаболитов, образующихся как при участии ферментов, так и неферментативным путем. Эти соединения широко представлены в аэробных организмах (животных, растениях, бактериях, водорослях и др.) [1; 2]. В растительных организмах они участвуют в регуляции роста, клеточной дифференцировке, морфогенезе, органогенезе, формировании устойчивости растений к различным биотическим и абиотическим стрессорам [3], а также обуславливают ценные органолептические и лекарственные свойства [4; 5]. Оксипины животных обладают сходными функциями, отвечая за поддержание гомеостаза и генерацию иммунного ответа [6].

Ферментативное преобразование полиеновых жирных кислот происходит при участии диоксигеназ, включающих липоксигеназы, циклооксигеназы [3], альфа-диоксигеназы, которые продуцируют гидроперекиси жирных кислот и эндоперекиси [7]. Последующее превращение может происходить при участии цитохромов суперсемейства P450. В растениях одним из ключевых путей биосинтеза оксипинов является липоксигеназный

каскад. Его первая стадия инициируется липоксигеназами, катализирующими превращение линолевой и альфа-линоленовой кислот в соответствующие гидроперекиси, которые в дальнейшем преобразуются при участии цитохромов P450 семейства CYP74: алленоксидсинтаз (АОС), гидропероксидлиаз (ГПЛ), дивинилэфирсинтаз (ДЭС) и эпоксиалкогольсинтаз (ЭАС). В то время как большинство цитохромов P450 являются монооксигеназами и требуют последовательной поставки двух электронов через различные типы окислительно-восстановительных партнеров, ферменты CYP74 катализируют превращение субстрата с помощью независимой внутримолекулярной системы переноса (Рис. 1). Вследствие этого, у них отсутствует необходимость в молекулярном кислороде и восстановительных партнерах для протекания реакции [8; 9]. У животных, в том числе у человека, второй этап превращения гидроперекисей и эндоперекисей осуществляется при участии тромбоксансинтаз и простагландинсинтаз, приводящих к биосинтезу эйкозаноидов – обширной группы оксипинов, образуемых из полиеновых жирных кислот, содержащих 20 углеродных атомов, таких как арахидоновая кислота [6].

У беспозвоночных животных, таких как коралловые полипы, было показано, что за биосинтез ряда оксипинов отвечают не цитохромы P450, а каталазы. Хотя в большинстве своем каталазы это группа гемопротеинов, известная своей ролью в метаболизме перекиси водорода, ферменты, описанные у кораллов, участвуют в метаболизме гидроперекисей жирных кислот с образованием соединений, подобных продуктам АОС реакции, поэтому данные ферменты были обозначены как каталазо-подобные алленоксидсинтазы [10; 11].

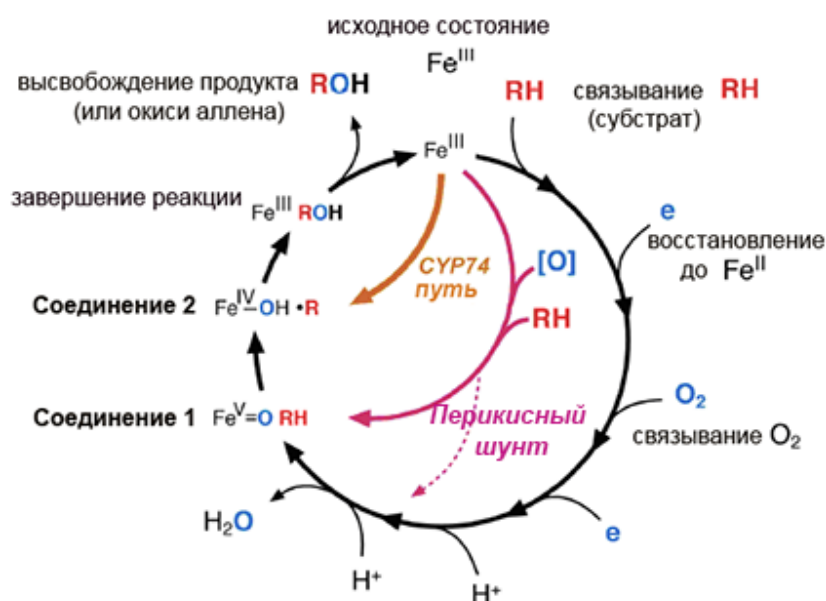


Рисунок 1. Каталитический цикл цитохромов P450.

Классический монооксигеназный путь показан черными стрелками (полный круг). Каталитический цикл, осуществляемый ферментами CYP74, тромбоксансинтазами и простагландинсинтазами показан оранжевой стрелкой [8].

Цель данного исследования заключалась в сравнительной характеристике гемопротеинов, участвующих в метаболизме гидроперекисей жирных кислот растений и кораллов.

Материалы и методы

Выбор ферментов биосинтеза оксипинов у представителей растений и кораллов проводили путем биоинформационного скрининга геномных и транскриптомных баз данных (NCBI, Phytozome, Ensembl Metazoa, PlantGDB) с помощью программ BLASTX и BLASTP относительно референсной последовательности АОС *Arabidopsis thaliana*

(AtAOS, NP_199079.1). Парное и множественное выравнивание аминокислотных последовательностей относительно охарактеризованного ферментаAtAOS1 проводили на основе пакета программ Vector NTI Advance и Mega7. Конструирование праймеров для молекулярного клонирования целевых генов осуществляли с использованием программы Vector NTI Advance. Амплификацию открытых рамок считывания целевых генов проводили с применением высокоточной полимеразы KOD Hot Start DNA Polymerase (Merck KGaA, Германия) в термоциклере C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Открытые рамки считывания (ОРС) целевых генов клонировали с использованием векторной системы pGemT и pGemT-Easy (Promega, США) по прилагаемому протоколу производителя. Для получения рекомбинантных белков ОРС целевых генов клонировали в экспрессирующие векторы системы pET (Novagen, США). В качестве продуцентов использовали штаммы *E. coli* BL21(DE3)pLysS и Tuner(DE3)pLysS (Novagen, США).

Результаты и обсуждение

В качестве объектов исследований выступали представители семейства CYP74 растений *Solanum tuberosum*, *Linum usitatissimum*, *Asparagus officinalis*, *Daucus carota*, а также предполагаемые каталазо-подобные ферменты кораллов *Dendronephthya gigantea* и *Acropora millepora*.

Множественное выравнивание целевых последовательностей относительно референсной последовательности охарактеризованного ферментаAtAOS *Arabidopsis thaliana* (NP_199079.1) показало, что в структуре целевых последовательностей растений присутствуют характерные для всех цитохромов P450 домены и аминокислотные мотивы, такие как ERR-триада (формируемая мотивами ETLR и P(E/D)RF) и аминокислотный остаток цистеина (пятый лиганд гемового железа) в гем-связывающем домене, а также отличительные особенности, присущие ферментам CYP74 и определяющие их катализ, а именно «F/L toggle» и гидропероксид-связывающий домен (ГСД). В то же время, анализ первичных последовательностей кораллов показал, что они состоят из трех доменов: домена, относящегося к белкам семейства каталаз, PLAT-домена и липоксигеназного домена, что соответствует архитектуре охарактеризованной каталазо-подобной АОС *Plexaura homomalla* (Ph-cAOS-LOX, O16025.1). Таким образом, анализируемые последовательности растений принадлежат к одной группе гемопротеинов - цитохромам P450, тогда как ферменты кораллов к другой – каталазам.

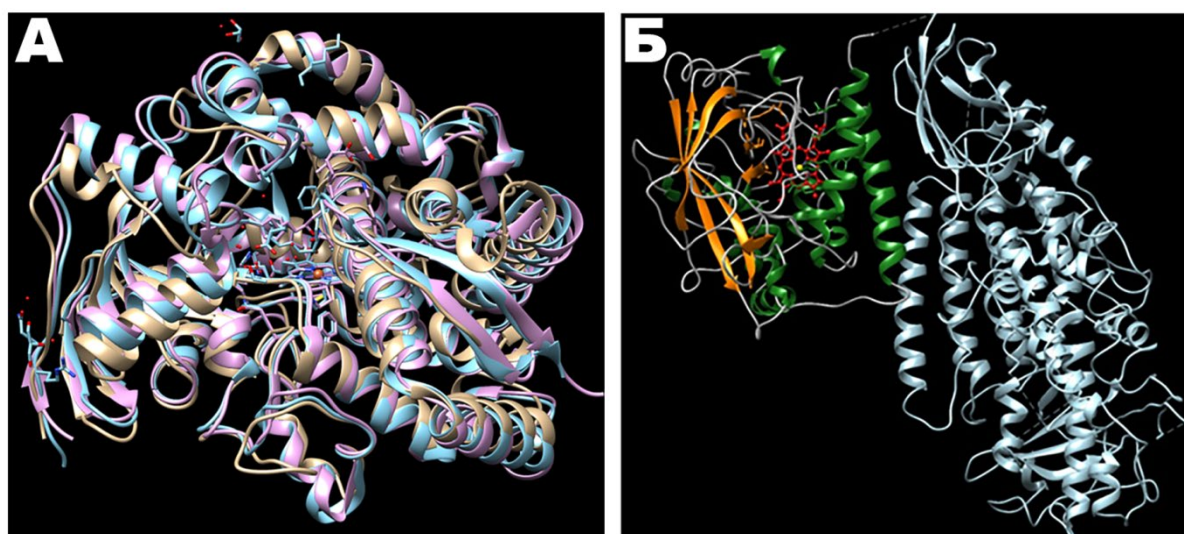


Рисунок 2.

- А) Результат наложения нескольких третичных структур ферментов CYP74 растений, включая охарактеризованнуюAtAOS;
 Б) модель трехмерной структуры белка Ph-cAOS-LOX.

Интересно, что обладая различающейся структурой белковых молекул (Рис. 2), эти ферменты катализируют образование одинаковых по своим структурным особенностям оксипинов, например, в случае АОС растений и охарактеризованного фермента *P. homomalla* (Ph-cAOS-LOX, O16025.1) короткоживущих окисей аллена.

В растениях окиси аллена образуются из С18 гидроперекисей жирных кислот и подвергаются либо спонтанному гидролизу (с образованием кетолов), либо спонтанной или ферментативной циклизации с образованием циклопентенонов, например, 12-ОФДК. Образование окиси аллена при участии фермента Ph-cAOS-LOX происходит из (8*R*)-гидроперекиси эйкозатетраеновой кислоты и претерпевает сходные преобразования (Рис. 3). Вышеописанные реакции являются ярким примером конвергентной эволюции метаболических путей, когда основным является конечный продукт; при этом ферменты, катализирующие его образование у разных организмов, могут быть разными.

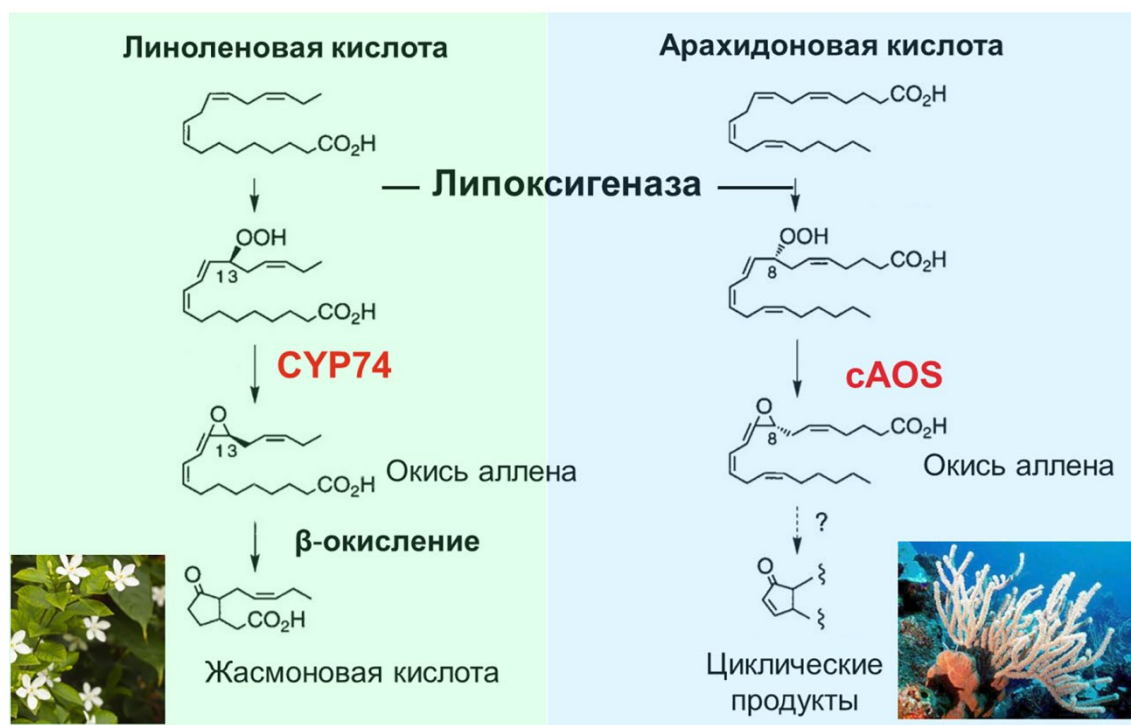


Рисунок 3. Сопоставление путей биосинтеза окисей аллена в растениях и кораллах [12].

Поскольку состав оксипинов и ферментов их биосинтеза отличается не только у разных видов растений, но также зависит от состояния растительного организма, для установления наличия определенных классов оксипинов и их биологического значения было проведено профилирование оксипинов интактных растений и растений, подвергнутых стрессу, методом газовой хромато-масс-спектрометрии. В качестве модельного объекта выступали растения *S. tuberosum*, подвергнутые окислительному и солевому стрессу. Хотя одним из основных сигнальных медиаторов среди оксипинов являются производные жасмоновой кислоты – продукта АОС пути – увеличение продуктов этой ветви метаболизма по сравнению с контрольными растениями не происходило. В профиле преобладали 9-гидроперекиси жирных кислот (линолевой и альфа-линоленовой), а также различные изомеры эпокси спиртов – продуктов ЭАС пути. В геноме *S. tuberosum* присутствует 6 генов CYP74, два из которых были нами охарактеризованы. Один из них кодирует фермент CYP74B3, обладающий наряду с ГПЛ активностью дополнительной минорной ЭАС активностью [13]. Другой ген кодирует дуалистичный фермент CYP74C4, обладающий двойной ГПЛ/ЭАС активностью [14]. Интересно, что в

ходе наших исследований каталазо-подобных ферментов кораллов было также обнаружено, что они наряду с основной могут обладать дополнительной активностью. При этом среди каталазо-подобных ферментов кораллов, также как среди ферментов CYP74 растений, присутствуют АОС, ЭАС и ГПЛ. До настоящего времени не описаны только каталазо-подобные ферменты, обладающие ДЭС активностью. Таким образом, метаболические пути биосинтеза оксилипинов растений и кораллов практически полностью идентичны по функционалу присутствующих ферментов и свидетельствуют о важности синтезируемых продуктов.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Впервые клонированы каталазо-подобные ферменты кораллов *D. gigantea* и *A. millepora*; показано, что растительные ферменты CYP74 могут обладать несколькими каталитическими активностями; биосинтез оксилипинов растений и кораллов является ярким примером конвергентной эволюции метаболических путей, когда основным является конечный продукт.

Работы изучению ферментов CYP74 *S. tuberosum* и их метаболитов выполнены при финансовой поддержке гранта МК-903.2020.4. Работы по изучению каталазо-подобных ферментов кораллов проводились при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-04-01069-а. Культивирование растений *S. tuberosum* проводились при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра "Казанский научный центр Российской академии наук".

Литература

- [1] William H. Gerwick, Philip J. Proteau, Dale G. Nagle, Mitchell L. Wise, Zhi D. Jiang, Matthew W. Bernart, Mats Hamber. Biologically active oxylipins from seaweeds. *Hydrobiologia*, 1993. V. 260. P. 653–665
- [2] Göbel C., Feussner I. Methods for the analysis of oxylipins in plants. *Phytochemistry*. 2009. V. 70. P. 1485-1503.
- [3] Wasternack C, Feussner I. The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annu Rev Plant Biol*, 2018. V. 69. P. 363-386.
- [4] Kiritsakis A.K. Flavor components of olive oil. Review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998. V. 75. P. 673–681
- [5] Chi-Tang Ho, Xin Zheng, Shiming Li. Tea aroma formation. *Food Science and Human Wellness*, 2015. V. 4. P. 9-27
- [6] Funk C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Review. *Science*, 2001. V. 294. P. 5548):1871-1875.
- [7] Hamberg M, Ponce de Leon I, Rodriguez M.J., Castresana C. Alpha-dioxygenases. Review. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. V. 338. P. 169-74.
- [8] Brash A.R. Mechanistic aspects of CYP74 allene oxide synthases and related cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry*, 2009. V. 70. P. 1522-1531.
- [9] Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Mukhitova .FK., Hamberg M., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N. Identification of CYP443D1 (CYP74 clan) of *Nematostella vectensis* as a first cnidarian epoxyalcohol synthase and insights into its catalytic mechanism *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017. V. 1862. P. 1099-1109.
- [10] Koljak R., Boutaud O., Shieh B.H., Samel N., Brash A.R. Identification of a naturally occurring peroxidase-lipoxygenase fusion protein. *Science*, 1997. V. 277 P. 1994–1996.
- [11] Boeglin W.E., Brash A.R. Cytochrome P450-type Hydroxylation and Epoxidation in a Tyrosine-liganded Hemoprotein, Catalase-related Allene Oxide Synthase *J Biol Chem*, 2012. V. 287. P. 24139-24147.
- [12] Tijet N., Brash A. Allene oxide synthases and allene oxides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002. V. 68-69. P. 423-431.

[13] *Toporkova Y.Y., Askarova E.K., Gorina S.S., Ogorodnikova A.V., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N.* Epoxyalcohol synthase activity of the CYP74B enzymes of higher plants. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020. V. 1865. P. 158743.

[14] *Toporkova Y.Y., Gorina S.S., Bessolitsyna E.K., Smirnova E.O., Fatykhova V.S., Brühlmann F., Ilyina T.M., Mukhtarova L.S., Grechkin A.N.* Double function hydroperoxide lyases/epoxyalcohol synthases (CYP74C) of higher plants: identification and conversion into allene oxide synthases by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018. V. 1863. P. 369-378.

Сведения об авторах

Анна Анатольевна Огурцова

к.м.н., ст. науч. сотр.

Эл. почта: AOgurtsova@nsi.ru

Андрей Егорович Быканов

к.м.н., врач

Эл. почта: ABykanov@nsi.ru

Горина Светлана Сергеевна

к.б.н., с.н.с.

Эл. почта: gsvetlana87@gmail.com

Топоркова Яна Юрьевна

к.б.н., в.н.с.

Эл. почта: yanchens@yandex.ru

*Казанский институт биохимии и биофизики –
обособленное структурное подразделение ФИЦ
КазНЦ РАН, Казань, Россия*

Information about authors

Anna A. Ogurtsova

Ph.D., Senior research scientist

E-mail: AOgurtsova@nsi.ru

Andrey Egorovich Bykanov

Ph.D., M

E-mail: ABykanov@nsi.ru

Gorina Svetlana Sergeevna

PhD, Senior Researcher

E-mail: gsvetlana87@gmail.com

Toporkova Yana Yurievna

PhD, Leading researcher

E-mail: yanchens@yandex.ru

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
FRC Kazan Scientific Center of RAS, 420111 Ka-
zan, Russia*