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

материалы Международной конференции

**NT+ME `24**

**Крым, Ялта-Гурзуф, с 2 июня по 9 июня 2024 года**

ISBN 978-5-6044060-4-5

Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`24 (Гурзуф, с 2 июня по 9 июня 2024 г.). 2024.302 с.
**ISBN 978-5-6044060-4-5**

**МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОРГКОМИТЕТ**
*Председатель* – Е.Л. Глориозов

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

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

При использовании материалов конференции в научных целях необходимо на них ссылаться. Пример ссылки на материалы конференции:
*Фамилия И.О.* Название статьи // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`24 (Гурзуф, с 2 июня по 9 июня 2024г.). 2024. С. XX–XX.– ISBN 978-5-6044060-4-5

СОДЕРЖАНИЕ

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

**РАЗВИТИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПОТОМСТВА ПОСЛЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МАТЕРИНСКИЙ ОРГАНИЗМ В РАННИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ** 13-18
**Н.В. Яглова, С.С. Обернихин**

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ CD27-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ КЛЕТОК В СЕЛЕЗЕНКЕ КРЫС** 19-21
**Е.П. Тимохина, Н.В. Яглова**

**РЕГЕНЕРАТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ У ОРГАНИЗМОВ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННЫХ ДИСРАПТОРОВ** 22-27
**Д.А. Цомартова, С.В. Назимова, Э.С. Цомартова, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Е.П. Тимохина, Е.В. Черешнева, О.В. Паюшина[2]**

**РОЛЬ ФАКТОРОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В РАЗВИТИИ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ** 27-32
**В.В. Яглов, С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова, М.Ю. Иванова, Т.А. Ломановская[2]**

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПЕПТИДА HLDF-6-H ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА.** 32-41
**Ю.А. Золотарев , О.В. Долотов , Д.Д. Марков , С.И. Шрам , А.К. Дадаян , Н.В Кост, О.Ю. Соколов , С.А. Зозуля , Н.В. Баймеева, Е.Н. Шубина**

**ИЗМЕНЕНИЯ В МОЛОКЕ МЫШЕЙ TPH2 НЕТ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СТРЕССА** 41-46
**А.А. Кибиткина, Е.Р. Василевская, Н.А. Ильин, Г.С. Толмачева**

**ОБРАЩЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИСПЛАТИНУ ПРИ ДЕЙСТВИИ КУРКУМИНА.** 47-50
**А.А.Ш. Хасан, Е.В. Калинина, Ю.Л. Володина, А.С. Петрова, Д.Д. Жданов, А.А. Штиль, В.В. Татарский**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ ДЛЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН** 51-55
**Пушкина Н.В.**

**ПОКАЗАТЕЛИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА КАК БИОМАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ И КОРРЕКЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ** 55-59
**О.П.Чжу, И.И. Маринич, Д.Э. Аравиашвили**

**РЕАЛЬНЫЕ ПУТИ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЧЕЛОВЕКА** 59-67
**А.Д. Черкасов**

**Секция 2. БИОЛОГИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ**

**ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПОСТЕПЕННОМ УВЕЛИЧЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ** 68-72
**Обернихин С.С., Яглова Н.В., Тимохина Е.П.**

СОДЕРЖАНИЕ

**Секция 3. ГЕМОГЛОБИНЫ, КРОВЬ, ЖЕЛЕЗО И СТРЕСС**

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНОВ** 73-77
**Топунов А.Ф., Космачевская О.В., Багрова О.Е.**

**АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРНОЗИНА И ЕГО ЖЕЛЕЗОНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В СИСТЕМАХ ОКИСЛЕНИЯ МИОГЛОБИНА И АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ** 77-81
**Насыбуллина Э.И., Хвесько К.В., КосмачевскаяО.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф.**

**ДЕЙСТВИЕ ЖЕЛЕЗОНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В СИСТЕМАХ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕМОГЛОБИН** 81-87
**Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Пугаченко И.С., ПокидоваО.В., Санина Н.А., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф.**

**СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЭНДОЭДРАЛЬНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ ТЕЛЛУРА** 87-91
**Рябоконь И.С. В.П. Седов, П.Л. Молканов, Д.Н. Орлова, М.В. Суясова, М.Е. Взнуздаев**

**МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАРЯЖЕННЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ С УЧЁТОМ СОПРЯЖЁННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГРАДИЕНТОВ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОЛЕЙ В МИТОХОНДРИЯХ И ЯДРАХ.** 91-98
**Г.И. Морозова, К.З. Аскарова**

**ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ НЕЙРОГЛОБИН** 98-101
**Семенова М.А., Смирнова О.М., Какуев Д.Л., Пахомов А.А., Долгих Д.А., Черткова Р.В.**

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДЕСАТУРАЗ И ЭЛОНГАЗ У МОЛОДИ (0+) АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ SALMO SALAR L., ВЫРАЩИВАЕМОГО В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ ЮЖНОГО РЕГИОНА** 102-106
**Хуртина С.Н., Мурзина С.А., Кузнецова М.В., Немова Н.Н.**

**ИНГИБИРОВАНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ СЕЛЕНООРГАНИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТОМ ДАФС-25** 107-109
**Барцев Д.Д., Бородулин Я.В.**

**ИЗУЧЕНИЕ КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ 1,5-ДИФЕНИЛ-3-СЕЛЕНПЕНТАНДИОНА-1,5 (ДАФС-25)** 110-113
**Гусельников П. И., Донценко Н. А., Бородулин Я. В.**

**Секция 4. МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА: ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ**

**ОБЕСПЕЧЕНИЕ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОМПЛЕКСА ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ НА БАЗЕ СЦ-1000** 114-120
**Ваганян Л.Г , Ф.А. Пак, В.Н. Вербенко, А.А. Васильев, Н.А. Кузора, Д.Л. Карлин, А.И. Халиков**

**КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО СКАНЕРА** 120-124
**Гайворонская Т.В., Арутюнов А.В., Аюпова Ф.С., Волобуев В.В., Васильев Ю.А., Плотникова Е.Ю., Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А.**

**ИЗМЕРЕНИЕ УГЛА ПОВОРОТА ГОЛОВЫ ПРИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВЫХ ПАТОЛОГИЯХ** 124-129
**Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А., Бадеев В.А., Васильев Ю.А., Арутюнов А.В., Аюпова Ф.С.**

СОДЕРЖАНИЕ

**МИКРОЭЛЕКТРОННЫЕ, ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОГО ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ** 129-135
**Гайворонская Т.В., Аюпова Ф.С., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А .,Бадеева Е.А., Плотникова Е.Ю., Зуб.А.В, Арутюнов А.В., Оленская А.В., И.А. Куликова, В.В. Волобуев**

**ИЗМЕРЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ КАЧЕСТВА ЖИДКОСТЕЙ В СИСТЕМАХ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ** 135-139
**Мурашкина Т.И., Бадеев В.А.**

**ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЗУСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА У НОВОРОЖДЁННЫХ ИЗМЕРИТЕЛЬНЫМ ОПТИКО-ВОЛОКОННЫМ УСТРОЙСТВОМ** 139-142
**Плотникова Е.Ю., Волобуев В.В., Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А., Куликова И.А., Васильев Ю.А.**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАЗЕРОИНДУЦИРОВАННОЙ ДЕСТРУКЦИИ БИОМОДЕЛИ НА ОСНОВЕ ТКАНИ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ IN VITRO** 143-149
**Тагабилев Д.Г., Винокуров И.А., Бессмертная В.С., Квирикашвили И.Г., Калайджан А.А., Моисеев Д.А., Дмитриев А.К., Коновалов А.Н., Ульянов В.А.**

**ОСОБЕННОСТИ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ЛАЗЕРНОГО ИСПАРЕНИЯ БИОТКАНЕЙ** 149-154
**Дмитриев А.К., Коновалов А.Н., Кортунов В.Н., Ульянов В.А.**

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ДОЗОВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ДЛЯ ПРОЕКТА ОНКООФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ «ОКО»** 155-164
**Черных А.Н. Г.И. Кленов, К.С. Красильщиков, Д.И. Гранин, Ж.С. Лебедева, В.В. Белкин, С.В. Гришин**

**РЕЗУЛЬТАТЫ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ РОГОВИЦЫ ПОСЛЕ YAG-ЛАЗЕРНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА ТКАНЯХ ПЕРЕДНЕГО СЕГМЕНТА ГЛАЗА** 164-172
**Юсеф Ю. Н., Гамидов А. А., Медведева Е. П., Сурнина З. В., Касьяненко Е. М., Баум О.И.**

**РОЛЬ ГЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** 173-176
**Будько А.И., Завалева Е.В., Прохорычева А.А., Трашков А.П.**

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭНДОВАЗАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ ОБЛИТЕРАЦИИ НА ДЛИНЕ ВОЛНЫ 0.98 МКМ** 177-183
**Коновалов А.Н., Юсупов В.И.**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ** 184-187
**Прохорычева А.А., Завалева Е.В., Будько А.И., Трашков А.П.**

**АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ** 187-192
**Куликова И.А., Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А., Чередник И.Л., Павлюченко И.И., Васильев Ю.А., Истомина Т. В., Плотникова Е.Ю., Васильев Ю.Ю., Теренина М.С.**

**ПУПОВИНА – ОБЪЕКТ ДИАГНОСТИКИ** 192-195
**Куликова И.А., Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А., Чередник И.Л., Павлюченко И.И., Васильев Ю.А., Теренина М.С., Плотникова Е.Ю., Васильев Ю.Ю.**

СОДЕРЖАНИЕ

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ LACTOBACILLUS MULIERIS В ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЕ ЖЕНЩИН** 196-199
**Вершинина Е.А., Маряшкина Т.В., Казаков А.А., Демкин В.В.**

**ГАПЛОГРУППЫ Y-ХРОМОСОМЫ У СТАРШЕГО ПОКОЛЕНИЯ МОСКВЫ И НОВОСИБИРСКА** 199-204
**Удина И.Г., Грачева А.С., Губина М.А., Васильев Ю.А., Курбатова О.Л.**

**Секция 5. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**РОЛЬ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В АНГИОГЕНЕЗЕ** 205-209
**Гринчевская Л.Р. Д.И. Салихова, Т.Х.Фатхудинов, Д.В. Гольдштейн**

**ПРЕИМУЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ИНСТРУМЕНТОВ IN SILICO ПРИ АНАЛИЗЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПРОТЕГРИНА-1** 210-216
**Полищук Е.К.**

**АНАЛИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ОЦЕНКИ РИСКОВ БЕЛКОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ** 216-222
**Багрянцева О.В., Гурэу З.Г.**

**ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ СБОРКА ВЫСОКОГОМОЛОГИЧНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА ADF-4** 222-225
**И. Мохаммад, А. Мохамед, Н. Диб, Г.Д. Отинов, Е.И. Кошель**

**ИНТЕНСИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ САМООЧИСТКИ В УСЛОВИЯХ ЗАЛПОВОГО СБРОСА** 225-229
**Саванина Я.В.**

**Секция 6. ГЕНОМИКА. ГЕНЫ И БОЛЕЗНИ**

**К ОБСУЖДЕНИЮ ГИПОТЕЗ О ПРОИСХОЖДЕНИИ ЖИЗНИ** 230-234
**Шестаков С.В., Карбышева Е.А.**

**ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ IFNL3 И IFNL4 С ТЕЧЕНИЕМ COVID-19** 235-239
**Николаева Л.И., Стучинская М.Д., Шевченко Н.Г., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Трушакова С.В., Бурцева Е.И**

**Секция 7. ОКСИД АЗОТА И ПРОДУКТЫ ЕГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

**МИМЕТИКИ НИТРОЗИЛЬНЫХ ФЕРРЕДОКСИНОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ВАЗОДИЛАТАТОРЫ В РЕАКЦИЯХ С МОДЕЛЬНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ** 240-245
**Н.А. Санина**

**НОВОЕ СЕМЕЙСТВО ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА (NO) С ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ** 245-250
**Санина Н.А.**

**ДИОКСИД АЗОТА (•NO2), ОБРАЗУЮЩИЙСЯ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ, УЧАСТВУЕТ В СОКРАЩЕНИИ СРЕДНЕЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ НАСЕЛЕНИЯ** 251-261
**Реутов В.П. Н.В. Пасикова, Е.Г. Сорокина Л.А. Давыдова, В.П. Дерягина, З.В. Куроптева**

СОДЕРЖАНИЕ

**ВЛИЯНИЕ NO И НИТРИТОВ НА УРОВЕНЬ АТФ В ЛИМФОЦИТАХ И СВЯЗЬ С УРОВНЕМ АУТОАНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРАМ ГЛУТАМАТА У ДЕТЕЙ, ПЕРЕНЕСШИХ ЧЕРЕПНО- МОЗГОВУЮ ТРАВМУ** 261-268
**Е.Г. Сорокина, В.П. Реутов, Ж.Б. Семенова, О.В. Карасева, В.Г. Пинелис, И.Е. Смирнов**

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ НЕЙРОНАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ (nNOS) НА РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ** 268-276
**Дерягина В.П. Н.И. Рыжова, Л.А. Савлучинская, Л.В. Кривошеева, В.Н. Тазаев**

**ФУНКЦИИ МАГНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ NO- НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА** 277-280
**Васильева С.В.**

**ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ОТВЕТА ТЕПЛОВОГО ШОКА И ОКСИДА АЗОТА НА РАЗВИТИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ E.COLI К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ** 281-284
**Васильева С.В., Санина Н.А.**

**ПОКАЗАТЕЛИ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНЬЮ** 285-289
**Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д.**

**ОКСИД АЗОТА И АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА В МАКРОФАГАХ** 290-295
**Куроптева З.В.**

**Секция 8. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ: НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ, НЕВРОЛОГИЯ, НЕЙРОХИРУРГИЯ, НЕЙРОХИМИЯ И НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ**

**ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИСХОДОВ ОПЕРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ДИЭНЦЕФАЛЬНОЙ И СУПРАСЕЛЛЯРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ** 296-302
**И.А.Воронина, Е.М.Трошина, О.Б.Сазонова, П.Л.Калинин, А.Н.Шкарубо, М.А.Кутин, Д.В.Фомичев, О.И.Шарипов, Д.Н. Андреев, И.В.Чернов, А.Д.Донской, Л.И.Астафьева, Ю.Г.Сиднева, В.В.Иванов**

CONTENT

**Section 1. EXPERIMENTAL BIOLOGY AND CLINICAL MEDICINE IN THE THIRD MILLENNIUM**

**DEVELOPMENT OF IMMUNE SYSTEM IN OFFSPRING AFTER STIMULATION OF MATERNAL IMMUNITY AT EARLY PREGNANCY** 13-18
**N.V.Yaglova, S.S. Obernikhin**

**TISSUE DISTRIBUTION OF CD27-EXPRESSING CELLS IN THE RAT SPLEEN** 19-21
**E.P. Timokhina, N.V. Yaglova**

**REGENERATION CAPACITY OF ADRENAL MEDULLA IN DEVELOPMENTALLY EXPOSED TO ENDOCRINE DISRUPTORS ORGANISMS** 22-27
**D.A. Tsomartova, S.V. Nazimova, N.V. E.S. Tsomartova, Yaglova, S.S. Obernikhin, E.P. Timokhina, E.V. Chereshneva, O.V. Payushina**

**ROLE OF PLURIPOTENCY FACTORS IN DEVELOPMENT OF ADRENAL CHROMAFFIN CELLS DURING ONTOGENY** 27-32
**V.V. Yaglov, S.S. Obernikhin, N.V. Yaglova, S.V Nazimova, M.Y. Ivanova, T.A. Lomanovskaya**

**NEUROPROTECTIVE EFFECT OF HLDF-6-H PEPTIDE IN PARKINSON'S DISEASE.** 32-41
**Y.A. Zolotarev , O.V. Dolotov , D.D. Markov , S.I. Shram , A.K. Dadayan , N.V. Kost , O.Y. Sokolov , S.A. Zozulya , N.V. Baymeeva , E.M. Shubina**

**CHANGES IN MILK OF TPH2 HET MICE UNDER EXPOSURE TO STRESS** 41-46
**A.A. Kibitkina, E. R. Vasilevskaya, N.A. Ilin, G.S. Tolmacheva**

**REVERSAL OF CANCER CELL RESISTANCE TOWARDS CISPLATIN BY CURCUMIN.** 47-50
**A.A. Hasan E.V. Kalinina, V, Yu.L. Volodina, A.S. Petrova, D.D. Zhdanov, A.A. Shtil, V.V. Tatarskiy**

**USAGE OF COMPLEX INTENSE ELECTROMAGNETIC FIELD FOR PRE-SOWING SEEDS TREATMENT** 51-55
**N.V. Pushkina**

**OXIDATIVE STRESS INDICATORS AS BIOMARKERS OF DEVELOPMENT AND CORRECTION OF PATHOLOGIC STATE** 55-59
**O.P. Chzhu, I.I. Marinich, D.E. Aravishvili**

**REAL WAYS TO INCREASE HUMAN LIFE EXPECTANCY** 59-67
**A.D. Cherkasov**

**Section 2. BIOLOGY OF STABLE ISOTOPES**

**CHANGES IN FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE THYROID GLAND ASSOCIATED WITH GRADUAL INCREASE IN DEUTERIUM BODY CONTENT** 68-72
**N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin**

**Section 3. HEMOGLOBINS, BLOOD, IRON AND STRESS**

**ENZYMATIC SYSTEMS FOR REDUCTION OF HEMOGLOBINS** 73-77
**A.F. Topunov, O.V. Kosmachevskaya, O.E. Bagrova**

CONTENT

**ANTIOXIDANT EFFECT OF CARNOSINE AND ITS NITROSYL IRON COMPLEXES IN MYOGLOBIN AND ARACHIDONIC ACID OXIDATION SYSTEMS** 77-81
**E.I. Nasybullina, K.V. Khvesko, O.V. Kosmachevskaya, K.B. Shumaev, A.F. Topunov**

**EFFECT OF NITROSYL IRON COMPLEXES IN HEMOGLOBIN-CONTAINING SYSTEMS** 81-87
**O.V. Kosmachevskaya, E.I. Nasybullina, I.S. Pugachenko, O.V. Pokidova, N.A. Sanina, K.B. Chumaev, A.F. Topunov**

**STUDY OF THE POSSIBILITY OF SYNTHESIS OF ENDOHEDRAL TELLURIUM FULLERENES** 87-91
**I.S. Ryabokon, V.P. Sedov, P.L. Molkanov, D.N. Orlova, M.V. Suyasova, M. E. Vznuzdaev**

**MODELING THE DISTRIBUTION KINETICS OF CHARGED PHOTOSENSITIZERS IN LIMPHOID CELLS WITH ASSOCIATED CHANGES IN ELECTRIC FILD GRADIENTS ON THE NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL MEMBRANES.** 91-98
**G.I. Morozova, K.Z. Askarova**

**EVELOPMENT OF MODEL CELL LINE EXPRESSING NEUROGLOBIN** 98-101
**M.A. Semenova, O.M. Smirnova, D.L. Kakuev, A.A. Pakhomov, D.A. Dolgikh, R.V. Chertkova**

**ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN ATLANTIC SALMON FINGERLINGS (0+) SALMO SALAR L. REARED IN THE AQUACULTURE IN THE SOUTHEN REGION** 102-106
**S.N. Khurtina, S.A. Murzina, M.V. Kuznetsova, N.N. Nemova**

**INHIBITION OF FREE RADICAL PROCESSES BY ORGANOSELENIUM PREPARATION DAFS-25** 107-109
**D. D. Bartsev. Y. V. Borodulin**

**STUDY OF THE CALCIUM-BINDING EFFECT OF THE 1,5-DIPHENYL-3-SELENPENTANDION-1,5 (DAPS-25)** 110-113
**P. I. Guselnikov, N. A. Dontsenko, Y. V. Borodulin**

**SECTION 4. MEDICAL PHYSICS: DIAGNOSIS AND TREATMENT**

**ENSURING OF PHYSICAL AND TECHNICAL PARAMETERS OF a PROTON THERAPY COMPLEX BASED ON SC-1000** 114-120
**L.G. Vaganyan, F.A. Pak, V.N. Verbenko, A.A. Васильев, N.A. Kuzora, D.L. Karlin, A.I. Khalikov**

**CLINICAL USE OF A FIBER OPTIC SCANNER** 120-124
**T.V. Gaivoronskaya, A.V. Arutyunov, F.S. Ayupova, V.V. Volobuev, Yu.A. Vasiliev, E.Y. Plotnikova, T.I. Murashkina, E.A. Badeeva**

**MEASURING THE ANGLE OF ROTATION OF THE HEAD IN MAXILLOFACIAL PATHOLOGIES** 124-129
**T.I. Murashkina, E.A. Badeeva, V.A. Badeev, Yu.A.Vasiliev, A.V.Arutyunov, F.S.Ayupova**

**MICROELECTRONIC, FIBER-OPTIC TECHNOLOGIES AS A PROMISING DIAGNOSTIC METHOD DENTAL HEALTH OF CHILDREN AND ADULTS** 129-135
**T.V. Gaivoronskaya[1], F.S. Ayupova, T.I. Murashkina, Yu.A.Vasiliev, E.A. Badeeva, E.Yu. Plotnikova, A.V.Zub., A.V. Arutyunov, A.V. Olenskaya, I.A. Kulikova, B.V. Volobuev**

CONTENT


**MEASUREMENT OF LIQUID QUALITY PARAMETERS IN LIFE SUPPORT SYSTEMS** 135-139
**T.I. Murashkina, V.A. Badeev**

**DETECTION OF THE UNCONDITIONED REFLEX IN NEWBORNS WITH A MEASURING FIBER-OPTIC DEVICE** 139-142
**E.Yu. Plotnikova, V.V. Volobuev, T.I. Murashkina, E.A. Badeeva, I.A. Kulikova, Yu.A. Vasiliev**

**STUDY OF LASER-INDUCED DESTRUCTION OF BIOMODELS BASED ON PIG LIVER TISSUE in vitro** 143-149
**D.G. Tagabilev, I.A. Vinokurov, V.S. Bessmertnaya, I.G. Kvirikashvili, A.A. Kalaydjan, D.A. Moiseev, A.K. Dmitriev, A.N. Konovalov, V.A. Ulyanov**

**PECULIARITIES OF BIOTISSUE EVAPORATION BY LASER SCANNING METHOD** 149-154
**A.K. Dmitriev, A.N. Konovalov, V.N. Kortunov, V.A. Ulyanov**

**DEVELOPMENT OF A BEAM DELIVERY SYSTEM FOR THE PROTON RADIATION THERAPY ONCO-OPHTHALMOLOGICAL COMPLEX PROJECT «OKO»** 155-164
**A.N. Chernykh, G.I. Klenov, K.S. Krasilshchikov , D.I. Granin, Z.S. Lebedeva, V.V. Belkin, S.V. Grishin**

**RESULTS OF CONFOCAL MICROSCOPY OF THE CORNEA AFTER YAG LASER TREATMENT ON THE TISSUE OF THE EYE ANTERIOR SEGMENT** 164-172
**Yusef Yu.N., Gamidov A.A. , Medvedeva E.P., Surnina Z.V. , Kasianenko E.M. , Baum O.I.**

**THE ROLE OF THE GLYMPHATIC SYSTEM IN BRAIN TUMORS. REVIEW OF LITERATURE DATA** 173-176
**Budko Alexander I., Zavaleva Elena V., Prokhorycheva Anna A., Trashkov Alexander P.**

**SIMULATION OF ENDOVASAL LASER OBLITERATION AT A WAVELENGTH OF 0.98 μM** 177-183
**A.N. Konovalov. V.I. Yusupov**

**USE OF BIOMARKERS IN THE DIAGNOSIS OF TRAUMATIC BRAIN INJURY: LITERATURE REVIEW** 184-187
**Prokhorycheva Anna A., Zavaleva Elena V., Budko Alexander I., Trashkov Alexander P.**

**AN ALTERNATIVE APPROACH TO DETERMINING BLOOD GROUP AFFILIATION** 187-192
**I.A. Kulikova, T.I. Murashkina, E.A. Badeeva, I.L. Cherednik, I.I. Pavlyuchenko, Yu.A. Vasiliev, T. V. Istomina, E.Y.Plotnikova, Yu.Yu. Vasiliev, M.S. Terenina**

**THE UMBILICAL CORD IS THE OBJECT OF DIAGNOSIS** 192-195
**I.A. Kulikova, T.I. Murashkina, E.A. Badeeva, I.L. Cherednik, I.I. Pavlyuchenko, Yu.A. Vasiliev, M S.Terenina, Yu.Yu.Vasiliev, E.Y. Plotnikova[3]**

**IDENTIFICATION OF LACTOBACILLUS MULIERIS IN FEMALE VAGINAL MICROBIOTA** 196-199
**Vershinina E.A., Maryashkina T.V., Kazakov A.A., Demkin V.V.**

CONTENT

**HAPLOGROUPS OF Y-CHROMOSOME IN THE SENIOR GENERATIONS OF MOSCOW AND NOVOSIBIRSK** 199-204
**I. G. Udina, A. S. Gracheva, M.A. Gubina, Yu. A Vasiliev, O.L. Kurbatova**

**Section 5. PROBLEMS, METHODS AND PRODUCTS OF MODERN BIOTECHNOLOGY**

**THE ROLE OF GLIAL PROGENITOR CELLS IN ANGIOGENESIS** 205-209
**L.R. Grinchevskaia, D.I. Salikhova, T.K. Fatkhudinov, D.V. Goldshtein**

**BENEFITS AND CONSTRAINTS OF IN SILICO TOOLS FOR ANALYZING PROTEGRIN-1 CHARACTERISTICS** 210-216
**E.K. Polishchuk**

**DEVELOPMENT OF METHODOLOGICAL APPROACHES FOR ASSESSING THE RISKS OF PROTEINS PRODUCED USING TECHNOLOGICAL MICROORGANISMS** 216-222
**Olga V. Bagryantseva, Zinaida G. Gureu**

**POLYMERASE CHAIN ASSEMBLY OF HIGHLY HOMOLOGOUS SEQUENCES** 222-225
**E. Mouhammad, A. Mohamed, N. Deeb, G.D. Otinov, E.I. Koshel**

**NTENSIFICATION OF BIOLOGICAL SELF-CLEANING UNDER CONDITIONS OF SLOPE DISCHARGE.** 225-229
**Y. V. Savanina**

**Section 6. GENOMICS. GENES AND DISEASES**

**ON DISCUSSING HYPOTHESES RELATED TO THE ORIGIN OF LIFE** 230-234
**S.V. Shestakov, E.A. Karbysheva**

**STUDYING THE ASSOCIATION OF ALLELIC VARIANTS OF THE GENES IFNL3 AND IFNL4 WITH COVID-19** 235-239
**L.I. Nikolaeva, M.D. Stuchinskaya, N.G. Shevchenko, K.G. Krasnoslobodtsev, E.A. Mukasheva, S.V. Trushakova, E.I. Burtseva**

**Section 7. NITRIC OXIDE AND PRODUCTS OF ITS METABOLISM IN BIOLOGICAL SYSTEMS**

**NITROSYL FERREDOXINS MIMETICS AS PROMISING VASODILATORS IN REACTIONS WITH MODEL BIOLOGICAL SYSTEMS** 240-245
**N.A. Sanina**

**NEW FAMILY OF NITRIC OXIDE (NO) DONORS WITH ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY** 245-250
**N.A. Sanina**

**NITRIC DIOXIDE (•NO2), FORMED IN LIVING ORGANISMS, IS PARTICIPATED IN THE DECREASE OF AVERAGE LIFESPAN OF THE POPULATION** 251-261
**V.P. Reutov, Pasikova, E.G. Sorokina, L.A. Davydova, V.P. Deryagina; Z.V. Kuropteva**

**THE EFFECT OF NO AND NITRITES ON THE LEVEL OF ATP IN LYMPHOCYTES AND THE RELATIONSHIP WITH THE LEVEL OF AUTOANTIBODIES TO GLUTAMATE RECEPTORS IN CHILDREN WHO HAVE SUFFERED A TRAUMATIC BRAIN INJURY** 261-268
**E.G. Sorokina, V.P. Reutov, Z.B. Semenova, O.V. Karaseva, V.G. Pinelis, I.E. Smirnov**

CONTENT

**THE EFFECT OF NEURONAL NO SYNTHASE (NNOS) INHIBITORS ON TUMOR DEVELOPMENT** 268-276
**V. P. Deryagina, N.I. Ryzhova, L.A. Savluchinskaya, L.V. Krivosheeva, V.N. Tazaev**

**MAGNESIUM FUNCTIONS IN NO-NITROSATIVE STRESS REGULATION.** 277-280
**S.V.Vasilieva**

**COMPLEX FUNCTIONS OF HEAT SHOCK PROTEINS AND NITRIC OXIDE TO OXIDATIVE STRESS RESPONSE IN ESCHERICHIA COLI** 281-284
**S.V. Vasilieva, N.A. Sanina**

**INDICATORS OF NITROSATIVE STRESS IN PATIENTS WITH VARICOSE VEINS** 285-289
**N.V. Korotkova, R.E. Kalinin, I.A. Suchkov, N.D. Mzhavanadze**

**NITRIC OXIDE AND ASCORBIC ACID IN THE MACROPHAGES** 290-295
**Kuropteva Z.V.**

**Section 8. CLINICAL NEUROSCIENCES: NEUROPHYSIOLOGY, NEUROLOGY, NEUROSURGERY, NEUROCHEMISTRY AND NEUROPHARMACOLOGY**

**PERSONALIZED PREDICTION OF SURGICAL OUTCOMES IN PATIENTS WITH TUMORS OF DIENCEPHALIC AND SUPRASELLAR LOCALIZATION** 296-302
**I.A.Voronina, E.M.Troshina, O.B. Sazonova, P.L.Kalinin, A.N.Schkarubo, M.A.Kutin, D.V.Fomichev, O.I.Scharipov, D.N. Andreev, I.V.Chernov, A.D.Donskoy, L.I.Astafieva, J.G.Sidneva, I.S.Clochrova, V.V.Ivanov**

УДК 611.4
ГРНТИ 76.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.13-18

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

# РАЗВИТИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПОТОМСТВА ПОСЛЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МАТЕРИНСКИЙ ОРГАНИЗМ В РАННИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ

*Изучены развитие иммунной системы потомства самок мышей, подвергшихся активации иммунной системы в ранние сроки беременности. Установлены отличия морфогенетических процессов в центральных и периферических органах иммунной защиты и отличия в реакциях иммунной системы на развитие воспалительного процесса*
***Ключевые слова:*** *беременность, иммунная система, тимус, селезенка, иммунитет*

**N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin**
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”

# DEVELOPMENT OF IMMUNE SYSTEM IN OFFSPRING AFTER STIMULATION OF MATERNAL IMMUNITY AT EARLY PREGNANCY

*Development of the immune system in offspring of mice exposed to stimulation of immunity in early pregnancy was studied. Differed morphogenesis of central and peripheral organs of immunity and intensity of antiinflammatory immune reactions were found.*
***Key words:*** *pregnancy, immune system, thymus, spleen, immunity*

**Введение.**

Морфологическое и функциональное развитие иммунной системы определяется комплексом эндогенных и экзогенных факторов, действующих на организм во внутриутробном периоде развития, а также после рождения особи. Результаты исследований гистологов, эмбриологов и иммунологов подтверждают, что воздействие на плод во втором и третьем триместрах беременности приводит к изменениям функционального состояния иммунной и эндокринной систем матери и оказывает отрицательное влияние на развивающиеся органы иммунной системы плода [1,2]. Из научной литературы известно, что алиментарный дефицит витаминов, микро- и макроэлементов, белков и др., эндокринные расстройства, инфекционные заболевания, приём ряда лекарственных препаратов, воздействие эндокринных дисрапторов во время беременности отрицательно сказываются на функционировании иммунной системы потомства, что обусловливает увеличение заболеваемости детей аллергическими, аутоиммунными, онкологическими заболеваниями, частые и хронически протекающие инфекционные заболевания [3,4,5,6]. Это диктует необходимость проведения фундаментальных исследований, направленных на выявление причин нарушения функционирования иммунной системы. Наименее изученным аспектом этой проблемы является возможность влияния различных факторов на развитие иммунной системы плода в ранние сроки беременности, а точнее в течение первых четырёх недель. Это наиболее уязвимый период для действия экзогенных факторов, так как ранние сроки беременности являются критическими для развития особи. Цель исследования: изучение постнатального морфогенеза органов иммунной системы потомства самок, подвергшихся однократной иммуностимуляции в ранние сроки беременности.

**Материалы и методы.**

Эксперименты выполнены на 486 мышах С57Bl/6, из них 126 самок и 360 самцов (питомник «Столбовая»). В качестве иммуностимулирующего воздействия беременным самкам однократно вводили в орбитальный синус пан-Т-клеточный митоген конканавалин А (Кон) А в дозе 5 мг/кг. Данная

доза усиливает секрецию цитокинов лимфоцитами и пролиферации лимфоцитов [7] и не влияет на течение беременности.

Объектом исследования было потомство мужского пола (n=360). Первую опытную группу составило потомство самок, которым вводили Кон А на 7-ые сутки беременности (группа Кон А, n=147). Для подтверждения эффектов действия цитокинов и устранения возможных эффектов непосредственного воздействия Кон А на зародыш была сформирована вторая опытная группа из потомства беременных самок, которым на 7-ые сутки вводили активированные *in vivo* сингенные клетки селезёнки (группа «активированные клетки», n=54). Для этого небеременным интактным самкам вводили Кон А в дозе 20 мг/кг, через 2 ч выделяли клетки селезёнки, и вводили в объёме 0,2 мл (10 млн клеток) самкам на 7-ые сутки беременности.

Исследования иммунной системы проводили на 17-ые сутки постнатального развития (препубертатный период), в возрасте 1,5 месяцев (пубертатный период) и 2,5 месяцев (постпубертатный период, начало активного репродуктивного периода). Определяли относительную массу тимуса и селезёнки, проводили исследование гистологических препаратов тимуса, селезёнки и кожи, определяли субпопуляционный состав лимфоцитов тимуса и селезёнки, спонтанной секреции ИЛ-2, ИЛ-10, ФНО-α и ТФР-β и секреции после стимуляции Т-клеточным митогеном Кон А и В-клеточным митогеном ЛПС in vitro клетками тимуса и селезёнки, пролиферацию клеток тимуса и селезёнки ex tempore [8].

Проводили исследование изменений органов иммунной системы потомства при развитии системного воспалительного ответа. Потомству мышей контрольной группы и группы Кон А в возрасте 17-ти сут. однократно внутрибрюшинно вводили ЛПС E. coli штамм O111:B4 («Difco», США) в дозе 15 мг/кг. Оценивали выживаемость животных в течение 48 ч., определяли концентрацию ФНО-α в сыворотке крови, содержание лейкоцитов и лейкоцитарную формулу крови через 24 ч после введения ЛПС. Проводили морфологическое исследование тимуса и селезёнки.

**Полученные результаты.**

Введение Т-клеточного митогена самкам на 7-ые сутки беременности приводило к изменениям морфофункциональных характеристик, как тимуса, так и селезёнки. В тимусе наблюдалась акцидентальная инволюция 3-ей стадии, снижение пролиферативной активности тимоцитов, а в селезёнке – значительное увеличение размеров органа и резкое повышение пролиферативной активности клеток. Таким образом, введение Т-клеточного митогена на 7-ые сутки беременности вызывало усиление физиологических процессов, происходящих в органах иммунной системы во время беременности. Однократная стимуляция Т-клеточного звена иммунной системы на ранних сроках беременности не нарушала физиологическое течение беременности и не влияла на ее исход. Через трое суток после введения Кон А беременным самкам наблюдался повышенный уровень спонтанной выработки цитокинов клетками селезёнки, а дополнительное стимулирование клеток Кон А и ЛПС in vitro не вызывало повышения продукции цитокинов, то есть повышение продукции цитокинов продолжалось в течение нескольких дней. Повышенной уровень пролиферативной активности сохранялся через 7 дней после введения Кон А. Таким образом, однократное введение Кон А беременным самкам являлось адекватной моделью изменений в иммунной системе матери, вызванных увеличением продукции цитокинов, наблюдаемым при инфекционных процессах, стрессовых реакциях и др.

*Морфофункциональные изменения органов иммунной системы потомства самок мышей, перенесших однократную стимуляцию иммунной системы в ранние сроки беременности, в разные периоды постнатального онтогенеза*

Исследование тимуса потомства мышей опытных групп показало, что его развитие к 17-ти дневному возрасту соответствовало параметрам контрольной группы, таким как относительная масса, доля коркового вещества и ширина субкапсулярного слоя, но отмечалось меньшее содержание лимфоцитов в мозговом веществе и увеличение числа тимических телец. Клетки тимуса потомства мышей опытных групп обладали повышенной

пролиферативной активностью. Также наблюдали более высокие темпы дифференцировки лимфоцитов тимуса, о чём свидетельствовало большее содержание CD3+-клеток и B1-клеток, играющих важную роль в негативной селекции тимоцитов [Perera J. et al., 2013]. Среди CD3-позитивных клеток процентное содержание дифференцированных CD4+ и CD8+ не отличалось, дифференцирующихся дубльпозитивных было ниже, а дубль-негативных выше, чем в контрольной группе. Однако, отмечалось уменьшение содержания NK- и NKT- субпопуляций лимфоцитов в тимусе. К периоду полового созревания тимус мышей опытных групп не отличался по структуре от тимуса мышей контрольной группы. Ширина субкапсулярного слоя была меньше, пролиферативная активность клеток тимуса снижена по сравнению с предыдущим сроком исследования, но была статистически значимо выше, чем в контроле. В отличие от контрольной группы, значительно снижались темпы дифференцировки лимфоцитов в тимусе, о чем свидетельствовало более низкое содержание CD3+- и B1-клеток. Отмечали пониженное содержание CD8+-клеток и увеличение численности низкодифференцированных дубль-негативных клеток. Появилась тенденция к увеличению содержания NK- клеток в тимусе, но содержание NKT-клеток оставалось пониженным. После наступления полового созревания у мышей опытной группы не наблюдали возрастной инволюции тимуса. Корковое вещество было развито сильнее, но субкапсулярный слой был уже. В мозговом веществе выявляли большее количество зрелых лимфоцитов, тимических телец было значительно меньше. Пролиферация клеток тимуса была снижена. Содержание CD3+-клеток так и не достигло уровня контрольной группы. Отмечали повышение CD4+-клеток и дубль-негативных клеток среди CD3+-клеток. Отмечено повышенное содержание B1-клеток, но содержание NKT-клеток в тимусе оставалось стабильно пониженным.

У мышей селезёнка является органом кроветворения и органом иммунной системы [9]. У мышей опытной группы в возрасте 17-ти суток не отмечалось существенных отличий по массе и развитию белой пульпы селезёнки, но значительно отставало формирование маргинальной зоны. Второй особенностью было отсутствие миграции нейтрофилов в маргинальную зону, которое начинается после колонизации кишечника микрофлорой [10]. В красной пульпе селезёнки гемопоэз происходил более активно. Пролиферативная активность клеток селезёнки была значительно выше. Усиленная дифференцировка и миграция Т-клеток из тимуса обусловливала их повышенное содержание в селезёнке. Соотношение CD4+ и CD8+ клеток не отличалось. Также в селезёнке содержалось большее число В-клеток и в том числе активированных В-клеток, в то время как активированных B1-клеток, NK- и NKT-клеток, принимающих участие в реализации реакций врожденного иммунитета, было меньше. К периоду полового созревания селезёнка отставала по темпам развития, что подтверждалось меньшей относительной массой органа, долей белой пульпы, шириной маргинальной зоны, содержанием в ней нейтрофилов. Процессы кроветворения происходили более активно. Пролиферативная активность спленоцитов снижалась, но была выше, чем в контрольной группе. Снижение дифференцировки и миграции Т-клеток в тимусе приводило к снижению их содержания в селезёнке. Также уменьшилось содержание В-клеток в селезёнке, в том числе и B1-клеток. Содержание NK-клеток оставалось пониженным, а содержание NKT-клеток начало повышаться. В постпубертатном периоде относительная масса селезёнки мышей всё еще была меньше, чем у мышей контрольной группы, но наблюдали увеличение доли белой пульпы и расширение маргинальной зоны, в то время как у мышей контрольной группы эти показатели были снижены по сравнению с предыдущим сроком исследования. Несмотря на это, ширина маргинальной зоны так и не достигла значений контрольной группы. Содержание нейтрофилов в маргинальной зоне повысилось. Развитие белой пульпы сопровождалось значительным обеднением красной пульпы. Пролиферативная активность клеток селезёнки уменьшалась. Содержание CD3-позитивных клеток соответствовало значениям контрольной группы, но у потомства самок, получавших Кон А, отмечалось замедление дифференцировки дубльпозитивных клеток в CD8+позитивные клетки, а у потомства самок, которым вводили активированные клетки, наоборот, ускорение этого процесса. Увеличилось содержание В-клеток, а также B1-клеток, наметившееся в предыдущем сроке исследования. Подавляющее

большинство В-клеток экспрессировали рецептор к IgE как и в контрольной группе, но активация В1-клеток была резко снижена. Отмечали увеличение числа NK-клеток, особенно у потомства самок, получавших Кон А, и NKT-клеток у потомства самок, которым вводили активированные клетки селезенки.

*Изменения продукции цитокинов in vitro клетками тимуса и селезёнки потомства самок мышей, перенесших однократную стимуляцию иммунной системы в ранние сроки беременности, в разные периоды постнатального онтогенеза в ответ на стимуляцию Т- и В-клеточными митогенами*

У мышей контрольной группы максимальное увеличение продукции тимоцитами ИЛ-2 и ФНО-α при действии Т-клеточного митогена Кон А наблюдали в возрасте 1,5 месяцев, а ТФР-β – в 2,5 месяцев. У мышей опытной группы максимальное увеличение продукции всех цитокинов отмечали в возрасте 17-ти суток, затем секреция цитокинов снижалась. Воздействие В-клеточного митогена ЛПС вызывало наибольшую продукцию цитокинов у мышей контрольной и опытной групп в возрасте 17-ти суток, но в опытной группе продукция цитокинов была более выраженной. Эти данные указывают на наличие в тимусе мышей опытной группы большего количества функционально зрелых клеток в возрасте 17-ти суток, что согласуется с результатами анализа субпопуляционного состава тимоцитов.

При сравнении возрастных особенностей продукции цитокинов клетками селезёнки в ответ на стимуляцию Т- и В-клеточными митогенами у мышей опытной группы также как и в тимусе отмечали более высокую секреторную активность в возрасте 17-ти суток, что указывает на большее количество зрелых Т- и В- клеток. В 1,5 месяца продукция цитокинов была ниже, чем в контрольной группе, что подтверждало выявленное снижение числа дифференцированных лимфоцитов в селезёнке.

*Морфофункциональные изменения органов иммунной системы потомства самок мышей, перенесших однократную стимуляцию иммунной системы в ранние сроки беременности, при развитии системного воспалительного ответа*

Развитие системного воспалительного ответа после введения сублетальной дозы ЛПС у потомства самок, подвергшихся однократной иммуностимуляции на 7-ые сутки беременности, было менее выраженным, о чем свидетельствовала значительно меньшая по сравнению с контролем концентрация ФНО-α в сыворотке через 3 ч после введения ЛПС, а также статистически значимо меньшее количество лейкоцитов в периферической крови с большим содержанием моноцитов и меньшим содержанием лимфоцитов и меньшая гибель животных через 24 ч (30% и 70%, соответственно).

Через 24 ч после введения ЛПС у мышей контрольной группы наблюдали уменьшение относительной массы тимуса, выявляли массивную гибель лимфоцитов в корковом и в мозговом веществе. В отличие от контрольной группы через 24 ч после введения ЛПС масса и размер тимуса мышей опытной группы не изменялись. В корковом веществе наблюдали пикнотизацию и распад ядер лимфоцитов, но эти процессы были выражены меньше, чем в контрольной группе. Относительная масса тимуса через 48 ч после введения ЛПС у мышей опытной группы превышала значения контрольной группы аналогичного срока исследования и соответствовала значениям контрольной группы, наблюдаемым через 24 часа после введения ЛПС. При гистологическом исследовании наблюдали большее опустошение коркового вещества и уменьшение ширины субкапсулярного слоя как по сравнению с предыдущим сроком исследования, так и значениями контрольной группы, вплоть до исчезновения в отдельных случаях.

Через 24 ч после введения ЛПС у мышей контрольной группы наблюдали увеличение относительной массы селезёнки, доли белой пульпы и уменьшение ширины маргинальной зоны. В маргинальной зоне общее количество лейкоцитов уменьшено, но резко увеличено процентное содержание нейтрофилов. В лимфатических узелках выявляли апоптотически измененные лимфоциты с пикнотизированными и фрагментированными ядрами. Количество гемопоэтических клеток и клеток крови в красной пульпе также уменьшено, а доля нейтрофилов увеличена.

При исследовании селезёнки мышей опытной группы через 24 ч после введения ЛПС выявляли увеличение массы органа и доли белой пульпы аналогичное таковому в контрольной группе. Общей чертой было и уменьшение ширины маргинальной зоны и количества клеток в ней, но, тем не менее, последний показатель превышал значения контрольной группы. Нейтрофилы в маргинальной зоне практически отсутствовали. Известно, что при попадании антигенов в организм усиливается миграция нейтрофилов в маргинальную зону селезёнки, где они трансформируются в В-клеточные хелперные нейтрофилы. Синтезируемые ими В-стимулирующие молекулы инициируют антиген-независимую секрецию иммуноглобулинов В-клетками маргинальной зоны [11]. Таким образом, снижение миграции нейтрофилов в маргинальную зону может приводить к снижению выраженности иммунного ответа. В лимфатических узелках селезёнки гибель лимфоцитов была более выражена. Количество клеток в красной пульпе уменьшено, но превышало значения контрольной группы. Нейтрофильные гранулоциты в красной пульпе встречали крайне редко. Через 48 ч после введения ЛПС масса селезёнки мышей опытной группы была уменьшена. Доля белой пульпы и размеры маргинальной зоны были меньше, чем в контрольной группе. Количество клеток в маргинальной зоне также уменьшено, и было немногим больше, чем в контрольной группе, нейтрофилы практически не выявляли. Наблюдали прогрессирующее опустошение красной пульпы.

**Выводы.**

Иммуностимулирующее воздействие на материнский организм, вызывающее усиление пролиферации лимфоцитов и секреции ими цитокинов, в ранние сроки беременности до начала формирования зачатков тимуса и селезёнки зародыша оказывает отдаленные последствия в виде длительных, наблюдаемых даже в постпубертатном периоде, нарушений темпов развития этих органов. Оно обусловливает ускорение развития тимуса в первые недели жизни с последующим снижением дифференцировки тимоцитов в пубертатном периоде и замедлением инволютивных процессов в постпубертатном периоде, а также приводит к замедлению превращения селезёнки потомства из органа гемопоэза в орган иммунной системы в постнатальном развитии. Следствием стимуляции иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности является изменение субпопуляционного состава лимфоцитов селезёнки потомства с более высоким содержанием Т-клеток вследствие их усиленной миграции из тимуса, а также В-клеток, и уменьшением содержания эффекторных NK- и NKT-клеток в препубертатном периоде. Замедленная трансформация селезёнки в орган иммунной системы обусловливает её функциональную незрелость, что проявляется пониженной способностью лимфоцитов селезёнки реагировать на воздействие липополисахарида и на контакт с опухолевыми клетками секрецией фактора некроза опухоли-α.

Структурно-функциональные изменения тимуса при развитии системного воспалительного ответа в препубертатном периоде свидетельствуют о менее выраженной акцидентальной инволюции и замедлении миграции зрелых тимоцитов вследствие более медленной его реакции на стресс. Особенностью гистофизиологических изменений селезёнки является их меньшая выраженность, а также крайне низкая миграция нейтрофилов в маргинальную зону, что способно нарушать межклеточные взаимодействия, лежащие в основе развития ранней стадии иммунного ответа – Т-независимому синтезу иммуноглобулинов В-клетками маргинальной зоны.

Функциональное отставание в развитии иммунной системы потомства приводит к снижению противоопухолевого иммунитета и более слабому развитию системного воспалительного ответа на бактериальный антиген, что может способствовать хронизации течения бактериальных инфекций.

**Заключение.** Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: активация иммунной системы матери в ранние сроки беременности изменяет темпы развития иммунной системы потомства и обусловливает меньшую выраженность реакций иммунитета.

***Работа выполнена по государственному заданию рег. номер № FGFZ-2022-0035.***

**Литература.**


1. Huizink A., Mulder E., Buitelaar, J. Prenatal stress and risk for psychopathology: Specific effects of induction of general susceptibility? // Psychol. Bull. – 2004. – V.130. – No.1. – P.115-142.
2. Warner M., Ozanne S. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. // Biochem. J. – 2010. – V.427. – P.333–47.
3. Яглова Н.В., Цомартова Э.С., Назимова С.В., Обернихин С.С., Мухамедова С.Г., Пашина Н.Р., Мусаева Д.О. Морфологические изменения тимуса новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) во внутриутробном периоде развития // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т.167. № 2. С. 261-264.
4. Palmer A. Nutritionally mediated programming of the developing immune system // Adv. Nutr. 2011.No. 2. P. 377–395
5. McGill J., Meyerholz D., Edsen-Moore M., Young B., Coleman R., Schlueter A., Waldschmidt J., Cook R., Legge K. Fetal exposure to ethanol has long-term effects on the severity of influenza virus infections // J. Immunol. 2009. V.182. P.7803-7808,
6. McDade T., Beck M., Kuzawa C., Adair L. Prenatal undernutrition, postnatal environments, and antibody response to vaccination in adolescence. // Am. J. Clin. Nutr. 2001. V.74. P.543–548.
7. Lei H., Chang C. Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. // Autophagy. – 2007. – V.3. – No.4. – P.402-404.
8. Рахмилевич А.Л., Обернихин С.С. Усиление чувствительности клеток селезёнки мышей к интерлейкину-2 после внутривенного введения конканавалина А. Иммунология. 1990. №1. С.68-69.
9. Яглов В.В., Яглова Н.В. Основы частной гистологии. программированное учебное пособие: учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности "Ветеринария" / Сер. Учебник. М.: КолосС, 2011.
10. Puga I., Cols M., Barra C., He B., Cassis L., Gentile M., Comerma L. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. // Nature Immunology. – 2012. – V.13. – P.170-180.
11. Mantovani A., Cassatella M., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. // Nature Reviews Immunology. – 2011. – No.11. – P.519-531.



**Сведения об авторах**

***Наталья Валентиновна Яглова***
*доктор мед. наук, зав. лабораторией, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия*
*Эл. почта: yaglova@mail.ru*
***Сергей Станиславович Обернихин***
*доктор мед. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского» Москва, Россия*
*Эл. почта: ober@mail.ru*

**Information about author**

***Nataliya Valentinovna Yaglova***
*Doctor of Science (Med.),*
*Head of Department,*
*A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation*
*E-mail: yaglova@mail.ru*
***Sergey Stanislavovich Obernikhin***
*Doctor of Science (Med.),*
*Senior Scientist,*
*A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky NRCS", Moscow, Russian Federation*
*E-mail: ober@mail.ru*

УДК 591.441
ГРНТИ 34.41.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.19-21

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

# РАСПРЕДЕЛЕНИЕ CD27-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ КЛЕТОК В СЕЛЕЗЕНКЕ КРЫС

*Изучали количественные и гистотопографические особенности экспрессии костимулирующей молекулы CD27 в лимфоцитах селезенки половозрелых молодых крыс. Установлено, что большинство CD27-положительных клеток находится в красной пульпе и маргинальной зоне, а не в лимфоидных узелках, что отличает селезенки крысы и человека и указывает на пути рециркуляции активированных лимфоцитов.*

***Ключевые слова:*** *селезенка, лимфоциты, CD27, гистотопография*

**E.P. Timokhina, N.V. Yaglova**
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”

# TISSUE DISTRIBUTION OF CD27-EXPRESSING CELLS IN THE RAT SPLEEN

*Quantification and tissue distribution of lymphocytes expressing costimulatory molecule CD27 in the spleen of adolescent rats was studied. Most CD27-positive cells were found not in lymphoid follicles, but in the red pulp and marginal zone. It differs rat and human spleens and indicate routs of recirculation for activated lymphocytes.*

***Key words:*** *spleen, lymphocytes, CD27, histotopography*

**Введение.**

CD27 представляет собой мембранный белок, являющийся костимулирующей молекулой контрольной точки иммунитета. Он связывается с молекулой CD70, что вызывает дифференцировку и клональную экспансию Т-клеток, а также вызывает активацию В-клеток и синтез иммуноглобулинов. Экспрессия CD27 начинается в эмбриональном периоде, и является характеризующим признаком самых ранних предшественников гемопоэтических клеток аортогонадомезонефрального региона. Крайне мало известно об особенностях экспрессии этой молекулы на лимфоцитах в постнатальном периоде. Известно, что прекращение экспрессии лимфоцитами CD27 является признаком старения иммунной системы [1]. Однако исследования в этой области осложняются малочисленностью данных об особенностях локализации и распределения CD27-позитивных клеток в органах иммунной защиты. Имеются единичные сведения о распределении CD27-позитивных лимфоцитов в лимфоидных образованиях человека и мыши, в которых указывается на различную роль этой молекулы в активации образования плазматических клеток [2, 3]. Цель исследования – изучение количественных и гистотопографических особенностей экспрессии CD27 на лимфоцитах селезенки половозрелых молодых крыс.

**Материалы и методы.**

Исследование выполнено на интактных самцах крыс Вистар в возрасте 2,5 месяцев. Селезенку удаляли, фиксировали в жидкости Буэна и после гистологической проводки заливали в парафин. Изготавливали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Выявление молекулы CD27 проводили методом иммуногистохимии с помощью моноклональных антител в разведении 1 : 200 («Elabscience», Китай). Реакцию визуализировали пероксидазным методом с помощью набора реактивов одноименного производителя. Подсчитывали количество иммунопозитивных лимфоцитов в различных структурах селезенки. Производили морфометрическое исследование препаратов селезенки с помощью программы «ImageScope». Результаты подвергали статистической обработке с помощью пакета программ «Statistica 7.0» («Statsoft», США). Различия считали значимыми при $p<0,05$.

**Полученные результаты.**

Гистологическое исследование селезенки крыс в возрасте 2,5 месяцев выявило высокую степень развития белой пульпы (рис.1). Белая пульпа была представлена первичными и вторичными лимфоидными узелками, периартериальными лимфоидными муфтами (ПАЛМ) и хорошо выраженной маргинальной зоной.

***Рис. 1. Соотношение структурных элементов в селезенке крыс в возрасте 2,5 месяцев.***

Иммуногистохимическое выявление CD27-позитивных лимфоцитов показало, что у взрослых животных их численность невелика. Исследование распределения иммунопозитивных клеток в различных структурах органа установило, что большая часть их находилась не в белой, а в красной пульпе (рис. 2а). Содержание CD27-позитивных лимфоцитов в единице площади красной пульпы было наиболее высоким несмотря на то, что плотность лимфоцитов в ней в несколько раз меньше, чем в белой пульпе. Исследование структур белой пульпы показало, что распределение в ней CD27-экспрессирующих лимфоцитов различно (рис. 2б). Наиболее высокие показатели содержания иммунопозитивных клеток наблюдались в лимфоидных узелках. В ПАЛМ их содержание было более низким. Маргинальная зона также характеризовалась высоким содержанием CD27-положительных лимфоцитов в единице площади среза. Их доля от общего содержания CD27-экспрессирующих клеток в белой пульпе была равна доле лимфоидных узелков. С учетом того, что площадь маргинальной зоны почти вдвое меньше площади, занимаемой узелками, а клеточная плотность значительно меньше, маргинальная зона характеризовалась более высоким содержанием активированных лимфоцитов (рис. 2,3).

***Рис. 2. Количество CD27-позитивных лимфоцитов в 1мм² селезенки крыс (а) и процентное распределение их в белой пульпе (б).***

В селезенке человека CD27-экспрессирующие клетки локализуются в лимфоидных узелках [2]. Имеются сведения, что CD27 экспрессируется на рециркулирующих лимфоидных клетках [1, 2]. Полученные нами данные свидетельствуют, что основным резервуаром CD27-экспрессирующих клеток в селезенке являются в первую очередь красная пульпа, а

также маргинальная зона. Известно, что у крыс лимфоциты мигрируют в селезенку через маргинальные синусы, поэтому чаще мигранты встречаются в маргинальной зоне [4]. У человека CD27(+) и CD27(-) клетки демонстрируют разные пути миграции. Миграция CD27-экспрессирующих лимфоцитов ассоциирована с лимфоидными узелками, в то время как неактивированные клетки рециркулируют либо через артериолы красной пульпы или по наружной части ПАЛМ [5]. Пути выхода лимфоцитов из селезенки в кровоток менее изучены. Вероятно, что они проникают в сосуды красной пульпы через маргинальную зону. Полученные нами данные показывают, что основное скопление активированных и клеток памяти у крыс – это красная пульпа, следовательно, можно рассматривать красную пульпу и маргинальную зону как основной путь рециркуляции активированных лимфоцитов у этого вида животных.

**Выводы.**

У взрослых крыс лимфоциты селезенки характеризуются невысокой экспрессией костимулирующей молекулы CD27. Основным резервуаром CD27-позитивных лимфоцитов в селезенке являются не лимфоидные узелки и ПАЛМ, а маргинальная зона и красная пульпа. Эти особенности отличают селезенку крысы от селезенки человека.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Установлены невысокая экспрессия костимуляторной молекулы CD27 на лимфоцитах селезенки взрослых молодых крыс и видовые гистотопографические особенности, отличающие их от человека.

***Работа выполнена по гранту РНФ № 23-25-00012.***

**Литература.**

1. Lian J., Yue Y., Yu W., Zhang Y. Immunosenescence: a key player in cancer development. J. Hematol. Oncol. 2020. V. 13. N. 1. 151. doi: 10.1186/s13045-020-00986-z.
2. Steiniger B., Timphus E.M., Jacob R., Barth P.J. CD27+ B cells in human lymphatic organs: re-evaluating the splenic marginal zone. Immunology. 2005. V. 116. N. 4. P. 429-442. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02242.x.
3. Raman V.S., Akondy R.S., Rath S., Bal V., George A. Ligation of CD27 on B cells in vivo during primary immunization enhances commitment to memory B cell responses. J. Immunol. 2003. V. 171. N. 11. P.5876-5881. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.5876.
4. Яглов В.В., Яглова Н.В. Основы цитологии, эмбриологии и общей гистологии. Программированное учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария». М.: КолосС, 2008.
5. Steiniger B.S. Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. Immunology. 2015. V. 145. N. 3. P. 334-346. doi: 10.1111/imm.12469.

**Сведения об авторах**

***Екатерина Петровна Тимохина***
*канд. биол. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: rodich@mail.ru*

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

**Information about author**

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

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

УДК 611.018:611.452
ГРНТИ 34.41.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.22-27

**Д.А. Цомартова[1,2], С.В. Назимова[1], Э.С. Цомартова[1,2], Н.В. Яглова[1], С.С. Обернихин[1], Е.П. Тимохина[1], Е.В. Черешнева[2], О.В. Паюшина[2]**
[1]НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
[2]ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

# РЕГЕНЕРАТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МОЗГОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ У ОРГАНИЗМОВ, РАЗВИВАЮЩИХСЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННЫХ ДИСРАПТОРОВ

*В настоящем исследовании установлено, что воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм в постнатальном периоде онтогенеза изменяет регенераторный потенциал хромаффинных клеток надпочечников, активируя процессы пролиферации и ингибируя создание пула клеток для дальнейшей дедифференцировки.*

***Ключевые слова:*** *хромаффинные клетки, надпочечник, эндокринный дисраптор, ДДТ. Регенерация*

**D.A. Tsomartova[1,2], S.V. Nazimova[1], N.V. E.S. Tsomartova[1,2], Yaglova[1], S.S. Obernikhin[1], E.P. Timokhina[1], E.V. Chereshneva[2], O.V. Payushina[2]**
[1]A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”
[2] Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

# REGENERATION CAPACITY OF ADRENAL MEDULLA IN DEVELOPMENTALLY EXPOSED TO ENDOCRINE DISRUPTORS ORGANISMS

*The present investigation shows that postnatal exposure to low doses of endocrine disrupter DDT alters regeneration potential of adrenal chromaffin cells by enhancement of proliferation and inhibition of pool of cells capable of dedifferentiation.*

***Key words:*** *chromaffin cells, adrenal gland, endocrine disrupter, DDT, regeneration*

**Введение.**

Паренхима мозгового вещества надпочечников представлена хромаффинными клетками, продуцирующими катехоламины [1]. Известно, что регенераторный потенциал хромаффинных клеток невелик [2,3,4]. В связи с этим, нарушение процессов физиологической регенерации может иметь негативные последствия для всего организма, поскольку именно мозговое вещество надпочечников является основным источником адреналина – гормона, регулирующего функционирование органов и обменные процессы. Воздействие эндокринных дисрапторов является глобальной проблемой, поскольку они распространены повсеместно [5,6,7]. Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) относится к наиболее распространенным и персистирующим загрязнителям с дисрапторным действием [8,9,10]. В наших предыдущих исследованиях мы установили нарушение синтеза и выделения катехоламинов из хромаффинных клеток при воздействии низких доз ДДТ на развивающийся организм [11,12]. Целью настоящего исследования была оценка регенераторного потенциала мозгового вещества у организмов, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в постнатальном развитии.

**Материалы и методы.**

Эксперимент был выполнен на самцах крыс Вистар (n=40). Животные получали ДДТ с момента рождения до достижения возраста 70 суток, когда рост надпочечников у крыс завершается. Первые три недели крысы получали ДДТ с молоком матери, потреблявшей вместо воды раствор ДДТ с концентрацией 20 мкг/л, затем самостоятельно. Среднесуточная доза потребления не превышала 3 мкг/кг. Расчет дозы ДДТ выполняли согласно требованиям к

определению его низких доз [13]. Животные контрольной группы потребляли водопроводную воду. Животных выводили из эксперимента в пубертатном возрасте (6 недель) и 70 суток, когда рост надпочечника прекращается [14]. Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов надпочечников. Определение β-катенина в хромаффинных клетках, а также Ki-67, Oct4, Sonic Hedgehog (Shh), Ascl1 и тирозингидроксилазы проводили методом иммуногистохимии с помощью поликлональных кроличьих антител («Abcam» США). Реакцию визуализировали с помощью набора реактивов «UltraVision LP Detection System» («ThermoScientific», США). Для количественной оценки морфологических параметров использовали программу для морфометрии «ImageScope» («Leica Microsystems», Германия). Статистическую обработку данных производили с помощью программы Statistica 7.0 («Statsoft Inc.», США). Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и $\chi^2$. Статистически значимыми различия считались при $p<0,05$.

**Полученные результаты.**

Исследование показало, что низкодозовое воздействие на организм крысы не вызывало значимых нарушений в структурном развитии как надпочечника в целом, так и его мозгового вещества. В пубертатном возрасте анатомические и гистологические показатели развития, такие как масса органа, размер, соотношение коркового и мозгового вещества, площадь паренхимы мозгового вещества не отличались от значений контрольной группы. На 70-е сутки постнатального развития, когда рост надпочечника крысы прекращается, морфологических различий от интактных животных мы также не наблюдали.

Пролиферативные процессы в хромаффинных клетках тем не менее протекали иначе. В пубертатном возрасте они замедлялись, а на 70-е сутки вместо физиологического снижения темпов деления клеток наблюдалось значительное его повышение (рис. 1).

В исследовании были выявлены значительно более низкие показатели синтеза тирозингидроксилазы, фермента, лимитирующего скорость синтеза катехоламинов, и периоде роста органа и особенно после его завершения (рис. 1). Таким образом, к моменту максимального развития органа в мозговом веществе надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, обнаруживалось большое количество делящихся хромаффинных клеток с низкой экспрессией тирозингидроксилазы, являющейся маркером высокой степени дифференцировки хромаффиноцитов.

Известно, что механизмы физиологической регенерации мозгового вещества надпочечников включают пролиферацию клеток и создание пула высокодифференцированных хромаффиноцитов способных к переходу в менее дифференцированное состояние путем активации экспрессии факторов плюрипотентности Oct4, лиганда Sonic Hedgehog (Shh) и канонического Wnt-сигналинга [3,15,16,17,18,19,20,21,22]. Изучение изменений экспрессии этих факторов у крыс, потреблявших ДДТ в низких дозах с первого дня жизни, показало значительные отличия от параметров интактных животных (рис. 1). В периоде роста надпочечников экспрессия фактора поддержания плюрипотентности Oct4 характеризовалась более высокими значениями. С возрастом этот показатель увеличивался, как и у интактных животных, но в существенно меньшей степени. Аналогичная картина наблюдалась и в отношении лиганда Shh, который обнаруживался в клетках у интактных крыс только на 70-е сутки. Исследование активации канонического Wnt-сигналинга в хромаффинных клетках показало, что его увеличения к моменту завершения роста органа не наблюдалось. Эти данные свидетельствуют о значительно меньших темпах формирования пула клеток для регенерации.

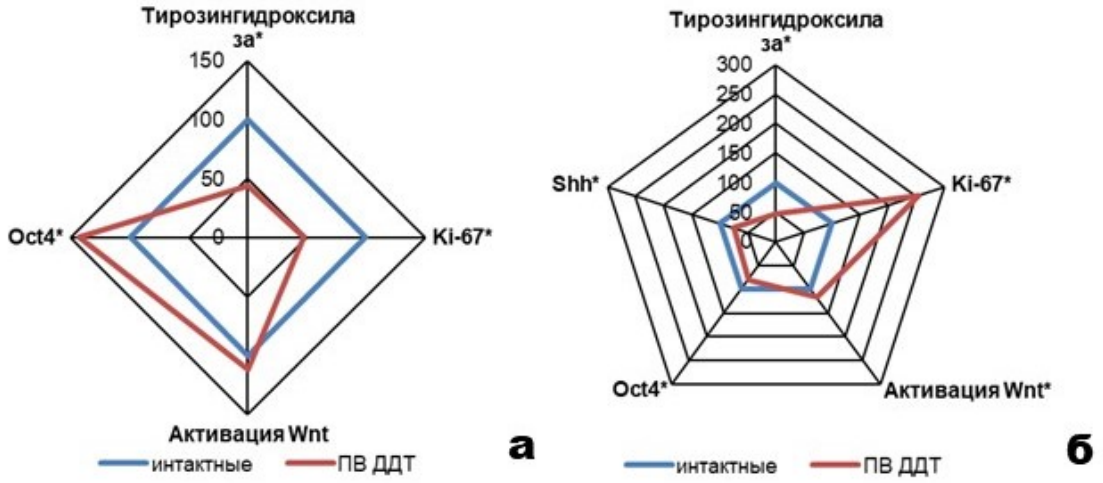



***Рис. 1. Относительные изменения содержания тирозингидроксилазы в хромаффинных клетках, содержания Ki-67, Oct4, Shh-экспрессирующих клеток и клеток с активацией канонического Wnt-сигналинга в пубертатном периоде (а) и после завершения роста органа на 70-е сутки (б). * – p<0,05 по сравнению с контролем.***

Дополнительно было проведено исследование экспрессии фактора Ascl1, играющего важную роль в коммитировании и дифференцировке ранних предшественников шванновских клеток [23]. Иммуногистохимическое определение показало, что в мозговом веществе отсутствуют клетки, содержащие этот белок, следовательно, низкодифференцированных предшественников в мозговом веществе надпочечников у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в постнатальном развитии, не было.

**Выводы.**

Воздействие эндокринного дисраптора ДДТ в постнатальном развитии не влияет на анатомические и гистологические параметры, но изменяет регенераторный потенциал клеток, снижая формирование пула высокодифференцированных хромаффиноцитов, способных к переходу в низкодифференцированное состояние и повышая их пролиферативную активность. Вероятно, что увеличение пролиферации хромаффинных клеток является компенсаторным процессом в ответ на ингибирование синтеза тирозингидроксилазы.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: эндокринный дисраптор ДДТ изменяет механизмы физиологической регенерации хромаффинных клеток надпочечников.

***Работа выполнена по государственному заданию рег. номер № FGFZ-2022-0035.***

**Литература.**

1. Яглов В.В., Яглова Н.В. Основы частной гистологии. программированное учебное пособие: учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности "Ветеринария" / Сер. Учебник. М.: КолосС, 2011.
2. Яглов В.В., Яглова Н.В. Основы цитологии, эмбриологии и общей гистологии. Программированное учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария». М.: КолосС, 2008.
3. Обернихин С.С., Яглова Н.В., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Яглов В.В. Регуляция морфогенетических процессов в постнатальном развитии и обеспечении физиологической регенерации мозгового вещества надпочечников // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2023. №2. С. 98-105. DOI: 10.47056/1814-3490-2023-2-98-105

4. Tischler A.S., Ruzicka L.A., Donahue S.R., DeLellis R.A. Chromaffin cell proliferation in the adult rat adrenal medulla // Int. J. Dev. Neurosci. 1989. V.7. P.439–448. doi:10.1016/0736-5748(89)90004-X
5. Street M.E., Angelini S., Bernasconi S., Burgio E., Cassio A., Catellani C., Cirillo F., Deodati A., Fabbrizi E., Fanos V., Gargano G., Grossi E., Lughetti L., Lazzeroni P., Mantovani A., Migliore L., Palanza P., Panzica G., Papini A.M., Parmigiani S., Predieri B., Sartori C., Tridenti G., Amarri S. Current knowledge on endocrine disrupting chemicals (EDCs) from animal biology to humans, from pregnancy to adulthood: highlights from a national Italian meeting // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. 1647. doi: 10.3390/ijms19061647
6. La Merrill M.A., Vandenberg L.N., Smith M.T., Goodson W., Browne P., Patisaul H.B., Guyton K.Z., Kortenkamp A., Cogliano V.J., Woodruff T.J., Rieswijk L., Sone H., Korach K.S., Gore A.C. Zeise L., Zoeller R.T. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification // Nat. Rev. Endocrinol. 2020. V. 18. P. 45–57. Doi: 10.1038/s41574-019-0273-8
7. Яглова Н.В., Яглов В.В. Эндокринные дисрапторы – новый этиологический фактор заболеваний костной ткани (обзор) // Современные технологии в медицине. 2021. Т.13. №2. С.84-96. DOI: 10.17691/stm2021.13.2.10
8. Anand N., Chakraborty P., Ray S. Human exposure to organochlorine, pyrethroid and neonicotinoid pesticides: Comparison between urban and semi-urban regions of India // Environ. Pollut. 2021. V. 270. ID 116156. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116156
9. Tang D., Liu X., He H., Cui Z., Gan H., Xia Z. Distribution, sources and ecological risks of organochlorine compounds (DDTs, HCHs and PCBs) in surface sediments from the Pearl River Estuary, China // Mar. Pollut. Bull. 2020. V. 152. 110942. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.110942
10. Yu R., Zhou Y., Xu S., Jing J., Zhang H., Huang Y. Distribution, Transfer, and Health Risk of Organochlorine Pesticides in Soil and Water of the Huangshui River Basin // Toxics. 2023. V. 11. 1024. https://doi.org/10.3390/toxics11121024
11. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Влияние пренатального и постнатального воздействия низких доз дихлодифенилтрихлорэтана (ДДТ) на секрецию катехоламинов у крыс в разные периоды онтогенеза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т.163. № 4. С.415-418.
12. Яглова Н.В., Тимохина Е.П., Яглов В.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Цомартова Д.А. Изменения гистофизиологии мозгового вещества надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периоде развития. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т.169. № 3. С. 372-375.
13. Vandenberg L., Colborn T., Hayes T., Heindel J., Jacobs D., Lee D.-H., Shioda T., Soto A., vom Saal F., Welshons W., Zoeller R., Myers J. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses // Endocrine Reviews. 2012. Vol. 33. P. 378–455.
14. Pignatelli D., Xiao F., Gouvtia A., Ferreira J., Vinson G. Adrenarche in the rat // Journal of Endocrinology. 2006. Vol. 191. N. 1. P. 301-308. doi: 10.1677/joe.1.06972
15. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Изменение экспрессии транскрипционного фактора Oct4 в постнатальном развитии мозгового вещества надпочечников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 173. №6. С.775-778. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-173-6-775-778
16. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. Induced pluripotent

stem cell lines derived from human somatic cell // Science. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
17. Ching S., Vilain E. Targeted disruption of Sonic hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia // Genesis. 2009. V. 47. № 9. P. 628–637.
18. Nusse, R.; Clevers, H. Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. Cell 2017, 169, 985–999. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016].
19. Willert, K.; Brown, J.D.; Danenberg, E.; Duncan, A.W.; Weissman, I.L.; Reya, T.; Yates, J.R.; Nusse, R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. Nature 2003, 423, 448–452. doi: 10.1038/nature01611
20. Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., and Clevers, H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature 2007, 449, 1003–1007. doi: 10.1038/nature06196
21. Nusse, R.; Fuerer, C.; Ching, W.; Harnish, K.; Logan, C.; Zeng, A.; ten Berge, D.; Kalani, Y. Wnt signaling and stem cell control. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2008, 73, 59-66. doi: 10.1101/sqb.2008.73.035.
22. Lluis, F.; Pedone, E.; Pepe, S.; Cosma, M.P. Periodic activation of Wnt/beta-catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion. Cell Stem Cell. 2008, 3, 493-507. doi: 10.1016/j.stem.2008.08.017
23. Castro, D.S.; Martynoga, B.; Parras, C.; Ramesh, V.; Pacary, E., Johnston, C.; Drechsel, D.; Lebel-Potter, M.; Garcia, L.G.; Hunt, C.; Dolle, D.; Bithell, A.; Ettwiller, L.; Buckley, N.; Guillemot, F. A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. Genes Dev. 2011, 25, 930-945. doi: 10.1101/gad.627811.

**Сведения об авторах**

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

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

***Элина Сослановна Цомартова***
*канд. мед. наук, младший научный сотрудник, старший преподаватель, НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына*
*ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»*
*Москва, Россия, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)*
*Эл. почта: tselso@yandex.ru*

**Information about author**

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

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

***Elina Soslanovna Tsomartova***
*PhD (Med.), Junior Researcher, Senior Lecturer, FSBSI "Petrovsky NRCS", Russian Federation, Moscow; Senior lecturer, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Russian Federation*
*E-mail: tselso@yandex.ru*

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

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

***Екатерина Петровна Тимохина***
*канд. биол. наук, с.н.с., НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына*
*ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: rodich@mail.ru*

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

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

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

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

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

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

***Payushina Olga Victorovna***
*Doctor of Science (Biol.), Professor, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)*
*e-mail: payushina@mail.ru*

УДК 611.018:611.452
ГРНТИ 34.41.02
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.27-32

**В.В. Яглов[1], С.С. Обернихин[1], Н.В. Яглова[1], С.В. Назимова[1], М.Ю. Иванова[2], Т.А. Ломановская[2]**
[1]НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
[2]ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

# РОЛЬ ФАКТОРОВ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ В РАЗВИТИИ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ

*Изучена экспрессия факторов плюрипотентости в постнатальном развитии хромаффинных клеток надпочечников. Установлено, что увеличение клеточной популяции хромаффиноцитов происходит при низком уровне экспрессии факторов плюрипотентности, а снижение пролиферативной активности хромаффинных клеток после завершения роста органа сопровождается увеличением экспрессии транскрипционных факторов, способствующих переходу клеток в низкодифференцированное состояние.*

***Ключевые слова:*** *надпочечник, мозговое вещество, хромаффинные клетки, факторы плюрипотентности, развитие*

**V.V. Yaglov[1], S.S. Obernikhin[1], N.V. Yaglova[1], S.V Nazimova[1], M.Y. Ivanova[2], T.A. Lomanovskaya[2]**

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

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

## ROLE OF PLURIPOTENCY FACTORS IN DEVELOPMENT OF ADRENAL CHROMAFFIN CELLS DURING ONTOGENY

*Expression of pluripotency factors in adrenal chromaffin cells was assessed during ontogeny. Increase in chromaffin cells population was in parallel with low level of expression of pluripotency factors. Reduction of proliferation rate after the end of adrenals growth was associated with up-regulation of pluripotency factors which contribute to transition of cells to low-differentiated state.*
***Key words:*** *adrenal gland, adrenal medulla, chromaffin cells, pluripotency factors, growth*

**Введение.**

Хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечников возникают из предшественников шванновских клеток и дифференцируются в адреналин-продуцирующие и норадреналин-продуцирующие клетки [1, 2]. В процессе постнатального развития численность хромаффинных клеток увеличивается, а после завершения роста надпочечника они вступают в длительный период самоподдержания клеточной популяции. О роли факторов плюрипотентности в постнатальном развитии хромаффинной ткани известно немногое. Крайне мало данных о транскрипционных факторах, контролирующих пролиферацию и дифференцировку хромаффинных клеток в надпочечниках малочисленны [3]. Установление механизмов развития и регенерации мозгового вещества надпочечников и их транскрипционного контроля позволит сформировать новые подходы к получению линий дифференцированных хромаффинных клеток надпочечников, трансплантация которых рассматривается в настоящее время как наиболее эффективный по сути метод лечения болезни Паркинсона и ряда других заболеваний [4]. Целью работы являлось изучение роли факторов плюрипотентности, связанных с поддержанием самообновления клеток, в процессе постнатального развития мозгового вещества надпочечников.

**Материалы и методы.**

Эксперимент проводился на самцах крыс Вистар (n=20). Животных выводили из эксперимента на 42-е сутки, что соответствует пубертатному периоду, когда надпочечник активно развивается и на 70-е сутки т.е. в постпубертатном периоде, когда рост надпочечника крысы завершается [5]. Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов органа, окрашенных гематоксилином и эозином. Морфометрию светооптических препаратов проводили с помощью программы "Image Scope" ("Leica Microsystems", Германия). Определяли площадь мозгового вещества и площадь, занимаемую хромаффинными клетками в мозговом веществе. Для определения терминальной дифференцировки и функциональной активности хромаффинных клеток использовали иммуногистохимическое выявление тирозингидроксилазы с помощью поликлональных кроличьих антител ("Abcam", Великобритания). Для изучения пролиферативной активности хромаффинных клеток проводили иммуногистохимическое определение экспрессии Ki-67, экспрессию лиганда Shh, транскрипционных факторов Ascl1, Oct4 и Sox2 в хромаффинных клетках выявляли также иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных антител ("Abcam", Великобритания). Подсчитывали процент позитивных клеток. Иммуногистохимические реакции проводили в соответствии с рекомендациями производителя и визуализировали с помощью системы для визуализации "Abcam" (Великобритания). Срезы без инкубации с первичными антителами использовали в качестве негативного контроля. Срезы докрашивали гематоксилином Майера. Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих

приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения (M±m). Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и $\chi 2$. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

**Полученные результаты.**

У крыс пубертатного возраста мозговое вещество надпочечников было образовано скоплениями хромаффинных клеток, разделенных венозными синусоидами. Скопления хромаффинных клеток были разделены прослойками соединительной ткани и контактировали с венозными и капиллярными синусами.

Иммуногистохимическое выявление транскрипционного фактора Ascl1, являющегося ранним фактором дифференцировки клеток нервной системы, не обнаружило наличия этого фактора в хромаффинных клетках. Выявление тирозингидроксилазы, являющейся маркером высокой степени дифференцировки хромаффинных клеток, показало очень высокую экспрессию этого фермента у всех хромаффинных клеток. Исследование Ki-67 выявило наличие небольшого количество пролиферирующих хромаффиноцитов. Среди хромаффинных клеток выявлялись немногочисленные Oct4-позитивные клетки с ядерной локализацией, а транскрипционный фактор Sox2 не выявлялся. Обнаруживались единичные клетки с ядерной локализацией сигнальной молекулы Shh.

После завершения полового созревания к 70-м суткам постнатального развития у крыс размеры надпочечника крыс статистически значимо увеличились по сравнению с пубертатным периодом. Площадь мозгового вещества и хромаффинных клеток в нем увеличились, при этом соотношение паренхимы и стромы не изменялось. Высокое содержание в цитоплазме тирозингидроксилазы отмечалось, как и в предыдущем возрастном периоде, во всех хромаффинных клетках. Пролиферативная активность клеток была снижена, о чём свидетельствовало уменьшение численности Ki-67-позитивных хромаффиноцитов. К началу постпубертатного периода количество Oct-4-позитивных клеток увеличилось. Все они характеризовались ядерной локализацией этого фактора. Доля Shh-позитивных клеток значительно возросла, и, как и ранее, лиганд Shh обнаруживался только в ядре. Sox2 и Ascl1 по прежнему не выявлялись.

Хромаффинные клетки надпочечников и нейроны симпатического звена автономной нервной системы происходят из общих клеток-предшественников нервного гребня [6]. Сигнальный путь Shh играет важную роль в нейрогенезе и формировании нейронных паттернов во время развития нервной системы [7,8]. В настоящем исследовании мы установили, что процент хромаффинных клеток с ядерной локализацией лиганда Shh увеличивается к моменту завершения роста надпочечника.

Факторы транскрипции Oct4 и Sox2 экспрессируются на самых ранних стадиях эмбриогенеза млекопитающих [9]. Oct4 имеет решающее значение для поддержания плюрипотентности во внутренней клеточной массе во время эмбриогенеза и обладает уникальными структурными свойствами, которые отличают его от других членов семейства POU. Sox2 также имеет решающее значение для поддержания плюрипотентности, но необязателен для ее установления во время эмбриогенеза, возможно, из-за дублирования с другими членами семейства Sox [10]. В настоящей работе мы продемонстрировали, что транскрипционный фактор Oct4 также синтезируется и в хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников в процессе постнатального развития. Завершение периода роста сопровождалось закономерным снижением числа пролиферирующих клеток. Высокий уровень экспрессии тирозингидроксилазы и отсутствие Ascl1, обнаруживаемые во всех без исключения хромаффинных клетках указывают на их терминальную дифференцировку и значительную функциональную активность как в периоде роста мозгового вещества, так и после его завершения [11]. Эти данные означают, что выявленные и Ki-67-, и Shh-, и Oct4-позитивные клетки, являются высокодифференцированными хромаффинными клетками и указывают на отсутствие в мозговом веществе пула недифференцированных предшественников. Экспрессия Oct4 напрямую не связана с пролиферацией, так как на фоне снижения доли Ki-67-позитивных клеток

происходит увеличение процента Oct4-позитивных клеток. Активация экспрессии Oct4 и Shh, их связывание с ДНК указывает на возможность дедифференцировки клеток [11]. Аналогичные явления были обнаружены и в корковом веществе надпочечников взрослого организма [12]. Возможно, что отсутствие фактора плюрипотентности Sox2 не является необходимым условием для поддержания регенераторного потенциала хромаффинных клеток, или экспрессия Sox2 кратковременна, так как имеются данные, что этот фактор необходим для индукции, а не поддержания плюрипотентности [13].

**Выводы.**

Хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечников экспрессируют факторы плюрипотентности в постнатальном развитии. Увеличение клеточной популяции хромаффинноцитов происходит при низком уровне экспрессии факторов плюрипотентности, а снижение пролиферативной активности хромаффинных клеток после завершения роста органа сопровождается увеличением экспрессии транскрипционных факторов, способствующих переходу клеток в низкодифференцированное состояние.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Механизмы самоподдержания популяции хромаффинных клеток в постнатальном развитии включают увеличение экспрессии факторов плюрипотентности, что указывает на роль снижения дифференцировки клеток как источника для дальнейшей пролиферации.

***Работа выполнена по государственному заданию рег. номер № FGFZ-2022-0035.***

**Литература.**

1. Яглов В.В., Яглова Н.В. Основы цитологии, эмбриологии и общей гистологии. Программированное учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария». М.: КолосС, 2008.
2. Furlan A., Dyachuk V., Kastriti M.E., Calvo-Enrique L., Abdo H., Hadjab S., Chontorotzea T., Akkuratova N., Usoskin D., Kamenev D., Petersen J., Sunadome K., Memic F., Marklund U., Fried K., Topilko P., Lallemend F., Kharchenko P.V., Ernfors P., Adameyko I. Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla // Science. 2017. Vol. 357. N. 6346. eaal3753. doi: 10.1126/science.aal3753
3. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Изменение экспрессии транскрипционного фактора Oct4 в постнатальном развитии мозгового вещества надпочечников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 173. №6. С.775-778. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-173-6-775-778
4. Vukicevic V., Schmid J., Hermann A., Lange S., Qin N., Gebauer L., Chunk K.F., Ravens U., Eisenhofer G., Storch A., Ader M., Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M. Differentiation of chromaffin progenitor cells to dopaminergic neurons // Cell Transplant. 2012. Vol. 21. N. 11. P. 2471-2486. doi: 10.3727/096368912X638874.
5. Pignatelli D., Xiao F., Gouvtia A., Ferreira J., Vinson G. Adrenarche in the rat // Journal of Endocrinology. 2006. Vol. 191. N. 1. P. 301-308. doi: 10.1677/joe.1.06972
6. Shtukmaster S., Schier M.C., Huber K., Krispin S., Kalcheim C., Unsicker K. Sympathetic neurons and chromaffin cells share a common progenitor in the neural crest in vivo // Neural Dev. 2013. Vol. 8. 12. Doi: 10.1186/1749-8104-8-12
7. Wilson N.H., Stoeckli E.T. Sonic hedgehog regulates Wnt activity during neural circuit formation // Vitamins and Hormones. 2012. Vol. 88. P. 173–209. doi: 10.1016/B978-0-12-394622-5.00008-0
8. Ho K.S., Scott M.P. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms // Current Opinion in Neurobiology. 2002. Vol. 12. N. 1. P. 57–63. doi: 10.1016/S0959-4388(02)00290-8.

9. Wu G., Schöler H.R. Role of Oct4 in the early embryo development // Cell Regen. 2014. Vol. 3. N. 1. 7. doi: 10.1186/2045-9769-3-7
10. Schaefer T., Lengerke C. Sox2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond // Oncogene. 2020. Vol. 39. N. 2. P. 278–292. doi:10.1038/s41388-019-0997-x
11. 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.
12. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Цомартова Д.А. Воздействие низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) нарушает транскрипционную регуляцию развития сетчатой зоны надпочечников у самцов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т.170. №11. С.651-655.
13. Li M., Izpisua Belmonte J.C. Deconstructing the pluripotency gene regulatory network // Nat Cell Biol. 2018. Vol. 20. N. 4. P. 382-392. doi: 10.1038/s41556-018-0067-6.

**Сведения об авторах**

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

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

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

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

***Марина Юрьевна Иванова***
*канд. мед. наук, доцент*
*ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)*
*Эл. почта: ivanova_m_y@mail.ru*

**Information about author**

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

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

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

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

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

***Татьяна Александровна Ломановская***
*канд. мед. наук,*
*старший преподаватель*
*ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)*
*Эл. почта: tatiana_80_80@inbox.ru*

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

УДК 616.858-008.6, 615.038
ГРНТИ 76.29.51
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.32-41

**Ю.А. Золотарев [1], О.В. Долотов [1,4], Д.Д. Марков [1], С.И. Шрам [1], А.К. Дадаян [1], Н.В Кост [2], О.Ю. Соколов [2], С.А. Зозуля [2], Н.В. Баймеева [2], Е.Н. Шубина [3]**
[1] ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»,
[2] ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»,
[3] ООО «Нейропротекция»
[4] Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

# НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПЕПТИДА HLDF-6-H ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА.

*В статье обсуждаются вопросы изучения нейропротекторной активности пептида HLDF-6-H на экспериментальной модели болезни Паркинсона и для коррекции моторных и немоторных симптомов этого заболевания при хроническом интраназальном применении пациентами, страдающими от болезни Паркинсона.*

***Ключевые слова:*** *Пептид HLDF-6-H, нейропротекторы, нейротрофические факторы, модель болезни Паркинсона, лечение болезни Паркинсона.*

**Y.A. Zolotarev [1], O.V. Dolotov [1,4], D.D. Markov [1], S.I. Shram [1], A.K. Dadayan [1], N.V. Kost [2], O.Y. Sokolov [2], S.A. Zozulya [2], N.V. Baymeeva [2], E.M. Shubina [3]**
[1] NRC «Kurchatov Institute»,
[2] FSBSI “Mental Health Research Centre”,
[3] All-Russian Charitable Foundation "Movement - Life",
[4] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology

# NEUROPROTECTIVE EFFECT OF HLDF-6-H PEPTIDE IN PARKINSON'S DISEASE.

*The article discusses the neuroprotective activity of the HLDF-6-H peptide in an experimental model of Parkinson's disease and for overcoming the motor and non-motor symptoms of this disease when chronically administered intranasally to patients suffering from Parkinson's disease.*

***Keywords****: HLDF-6-H peptide, neuroprotectors, neurotrophic factors, Parkinson's disease model, treatment of Parkinson's disease.*

## Введение

Нейродегенеративные заболевания стали одной из наиболее значимых проблем современной медицины. Болезнь Паркинсона (БП), наряду с болезнью Альцгеймера является прогрессирующим хроническим нейродегенеративным заболеванием, сопровождающимся ухудшением когнитивных функций и ухудшающим качество жизни пожилых людей. При БП имеется множество патологических каскадов, связанных с развитием нарушений убиквитин-протеасомного пути, нейровоспалением и дисфункцией митохондрий, которые приводят к

эксайтотоксичности, активации NMDA-рецепторов, окислительному стрессу и апоптотической гибели клеток. Дисфункциями, характерными для БП, являются активация микроглии, сверхэкспрессия белка синуклеина, образование нерастворимых агрегатов синуклеина в нейронах черной субстанции, нейродегенерация в голубом пятне и изменения уровней моноаминов, нейротрофинов, провоспалительных цитокинов, стероидов, белков везикулярного цикла.

Локомоторные симптомы, возникающие на клинической стадии БП вследствие нигростриарной дофаминергической дегенерации, наиболее часто проявляются в виде тремора покоя, брадикинезии, ригидности и снижении постурального рефлекса [1]. Заболевание неизбежно прогрессирует от легкого тремора в покое до тяжелой инвалидности и может сопровождаться различными психическими нарушениями, включая тревогу, депрессию, галлюцинации и деменцию [2]. Некоторые из немоторных симптомов, в том числе, обонятельные дисфункции, нарушения сна и вегетативная дисфункция возникают уже на доклинической стадии БП [3]. Заместительная терапия предшественниками дофамина и агонистами дофаминовых рецепторов широко используется для лечения двигательных симптомов у пациентов с БП, но она не замедляет прогрессирование заболевания и не приводит к выздоровлению. БП неизбежно прогрессирует от легкого тремора в покое до тяжелой инвалидности, сопровождающейся психическими расстройствами. Лечения БП, которое могло бы предотвратить прогрессирование этого неизлечимого заболевания, еще не разработано [4]. Существующая терапия БП направлена на преодоление последствий, вызванных нейродегенерацией дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции (SNpc), а не на саму причину заболевания. Задача нахождения путей для преодоления дегенерации нигростриарной системы является по-настоящему актуальной. В этой связи особую значимость приобретает разработка нетоксичных и высокоэффективных препаратов нейропротекторного действия, направленных на лечение БП за счет преодоления нейродегенерации дофаминергических нейронов в SNpc и купирования нейровоспаления.

Установлено, что свойствами мультитаргетного нейропротекторного препарата обладает синтетический инновационный нейропротекторный пептид HLDF-6-H (Thr-Gly-Glu-Hse-His-Arg-$NH_2$), в котором с целью повышения гидролитической стабильности при хранении водных растворов, аспарагин в пептиде HLDF-6 был заменен на гомосерин (Hse) [5, 6]. Пептид HLDF-6-H является аналогом шестичленного фрагмента 41 – 46 присутствующего в центральной нервной системе белкового фактора Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF) [7]. При этой модификации пептида полностью сохранились его аффинность при связывании с мембранами клеток коры головного мозга крыс [8] и физиологическая активность в экспериментальной модели болезни Паркинсона [5].

Физиологический нормализующий эффект регуляторных нейропротекторных пептидов HLDF-6 и его аналога HLDF-6-H реализуется через несколько регуляторных систем, включающих несколько молекулярных мишеней. Мишенями фармакологической активности являются NMDA-рецепторы, метаботропная глутаматная, серотониновая и опиоидная системы, взаимодействуя с которыми реализуется его ноотропная [8], анксиолитическая [9], нейропротекторная [10] и антивозрастная активность [11].

**Цель работы:** Работа направлена на изучение эффектов пептида HLDF-6-H в экспериментальной МФТП модели доклинической стадии БП и анализ данных по изменению выраженности моторных и немоторных симптомов БП, полученных на основе субъективной оценки пациентов, использующих бальзам “Ринохеалинг” в дополнение к стандартной фармакотерапии.

**Материалы и методы.**

Синтез пептида HLDF-6-H описан [5].

Исследовали 36 самцов мышей линии C57Bl/6 в возрасте 7-8 недель, массой 22-23 г из питомника «Столбовая» РАМН. Условия содержания животных соответствовали действующим санитарным требованиям к устройству, оборудованию и содержанию клиник, предназначенных для биологических экспериментов. Стандартный лабораторный рацион

соответствовал действующим нормам. Мышей содержали по шесть животных в клетке со свободным доступом к воде и пище при 21°C с использованием 12/12-часового цикла свет-темнота. Условия окружающей среды (температура, влажность, освещенность, вентиляция, состав подстилки) соответствовали требованиям содержания лабораторных животных. Испытания на животных начинали после двухнедельного периода адаптации к условиям вивария.

Нейропротекторную активность пептида HDLF-6-H изучали на модели доклинической стадии БП, индуцированной введением мышам линии C57Bl/6 токсина МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин). 36 мышей были случайным образом разделены на три группы по 12 животных в каждой группе: «Контроль» – контрольное введение носителя; «Токсин» - введение МФТП; «Пептид» - введение МФТП / HLDF-6-H. Мыши групп «Токсин» и «Пептид» получали две внутрибрюшинные инъекции МФТП-HCl в дозе 18 мг/кг с интервалом 2 часа в объеме 200 мкл; контрольные мыши получали инъекции физиологического раствора.

Ранее на моделях тревожного расстройства и болезни Альцгеймера было установлено, что физиологически активная доза пептида HLDF-6 составляет 300 мкг/кг, а интраназальное введение имеет преимущество перед другими способами введения пептида [9, 10]. Введение («Пептид») начинали через 1 час после введения токсина. Пептид растворяли в 0,9% NaCl и вводили интраназально в дозе 300 мкг/кг в две ноздри поровну в общем объеме 6 мкл с помощью микропипетки Eppendorf ежедневно в течение 3 недель. В дни тестирования двигательной активности пептиды вводили за час до помещения животных в тесты «Вертикальная решетка», «Вертикальная стержень», «Вращающийся стержень», «Горизонтальная решетка» и «Вынужденное плавание». Животным из групп «Контроль» и «Токсин» интраназально вводили одинаковый объем 0.9% NaCl.

Поведенческие эксперименты в тесте «Вынужденное плавание» выполняли согласно [12]. Этот тест проводили 3 раза, на 9, 16 и 21 день после введения токсина. Тесты «Вертикальная решетка», «Вертикальный стержень» и «Вращающийся стержень» выполнялись еженедельно согласно ранее опубликованной методике [5].

На основе пептида HDLF-6-H был разработан и зарегистрирован «Регенерирующий бальзам Ринохеалинг», содержащий 0,25 или 0,5% пептида HDLF-6-H. В эксперименте по оценке его антипаркинсонической активности участвовала группа пациентов с разными формами и разными стадиями болезни Паркинсона.

В группу были включены 24 пациента с болезнью Паркинсона, из них 10 женщин от 38 до 70 лет с длительностью заболевания от 1 года до 16 лет и 14 мужчин от 36 до 69 лет с длительностью заболевания от 1,5 до 18 лет. Назальный регенерирующий бальзам «Ринохеалинг» применяется как препарат дополнительной терапии, при полном сохранении ранее назначенного фармацевтического лечения болезни Паркинсона. Пациентам проводилось интраназальное введение препарата «Регенерирующий бальзам Ринохеалинг 0,25%» дважды в сутки в суточной дозе 500 мкг из расчета 9–20 мкг в сутки на килограмм веса больного, или трижды в сутки водный раствор «Регенерирующий бальзам Ринохеалинг 0,5%» в суточной дозе 1500 мкг из расчета 15–31 мкг в сутки на килограмм веса больного. Для оценки динамики изменения патологических симптомов БП использовалась упрощенная форма унифицированной шкалы оценки болезни Паркинсона Международного общества расстройств движений MDS-Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (MDS-UPDRS), применяемой во всем мире при клинических испытаниях и тестировании прогрессирования заболевания.

**Полученные результаты.**

Болезнь Паркинсона в настоящее время относится к неизлечимым идиопатическим нейродегенеративным заболеваниям. Патогенез БП связан с одновременным повреждением нервной, эндокринной и иммунной систем. По этой причине все многочисленные попытки создания монотаргетного препарата для лечения БП, основанного на воздействии на одну мишень в одном патологическом каскаде, закончились неудачей. Достичь успеха в лечение БП, можно только при использовании мультитаргетного нейропротекторного препарата,

оказывающего регуляторное воздействие на нервную, эндокринную и иммунную системы. Снижение уровня дофамина в стриатуме является ключевым фактором патогенеза БП и коррелирует с тяжестью заболевания. Установлено, что свойствами мультитаргетного нейропротектора обладает синтетический инновационный нейропротекторный пептид HLDF-6-H, хроническое интраназальное применение которого приводит к нормализации уровня дофамина в стриатуме и двигательной активности на экспериментальной модели БП [5].

Установлено, что на МФТП модели досимптомной стадии БП, в результате одновременного действия токсина МФТП и трехкратного стрессирующего влияния теста «Вынужденное плавание» (ВП) наблюдается развитие депрессивно-подобного синдрома, который блокируется пептидом HLDF-6-H. Время иммобилизации животных группы «Токсин» достоверно превышает этот параметр у животных группы «Контроль». Время иммобилизации мышей в 1.5 раза повышается под действием токсина и снижается практически до уровня контроля после хронического введения пептида (141 ± 17, 204 ± 20 и 172 ± 11 сек в группах «Контроль», «Токсин» и «Пептид», соответственно, $p<0.05$). При тестировании на первой и второй неделях после введения токсина подобных отличий не наблюдалось.

Все нейродегенеративные заболевания сопровождаются развитием нейровоспаления, ассоциированного с развитием воспалительных реакций в кровяном русле. Оценка активности маркеров воспаления лейкоцитарной эластазы (ЛЭ) и α1-протеиназного ингибитора (α1-ПИ) и их соотношения в сыворотке крови показала, что реализуемая на МФТП модели БП депрессия сопровождается значительным снижением протеазно-ингибиторного индекса **(**ПИИ**)**, определяемого соотношением активности ЛЭ и α1-протеиназного ингибитора α1-ПИ. Основным регулятором активности ЛЭ является α1-ПИ, который относится к белкам острой фазы. ПИИ характеризует активность воспалительных реакций и определяет направленность деструктивного процесса. Протеазно-ингибиторный индекс положительно коррелирует со временем иммобилизации мышей в тесте ВП ($r = + 0.67$, $p = 0.032$). На рассмотренной МФТП модели БП установлено, что противовоспалительное действие HLDF-6-H связано со снижением активности ЛЭ. Время иммобилизации мышей в тесте ВП положительно коррелирует с уровнем лейкоцитарной эластазы ($r = + 0.81$, $p = 0.015$) и отрицательно с α1-протеиназным ингибитором ($r = - 0.79$, $p = 0.012$).

Развитие депрессии на МФТП модели влияет на уровни провоспалительных цитокинов в отделах мозга. При развитии депрессии на МФТП модели, уровень мРНК фактора некроза опухоли α (TNF-α) в гипоталамусе и среднем мозге положительно коррелируют со временем иммобилизации мышей в тесте ВП ($r = + 0,80$, $p = 0,005$) и ($r = + 0,56$, $p = 0,0481$), соответственно. Уровень мРНК фактора ингибирования миграции макрофагов (MIF) в среднем мозге также положительно коррелирует со временем иммобилизации мышей в тесте ВП ($r = + 0,62$, $p = 0,032$).

Пептид HLDF-6-H восстанавливает в стриатуме уровень интерлейкина 1β, обладающего наряду с иммунотропной и нейротропной активностью, регулируя синтез нейротрофинов в ЦНС и стимулируя аксоногенез на МФТП модели БП. Восстановление аксонов SNpc нейронов приводит к росту дофамина в стриатумах при БП. Через три недели после введения МФТП наблюдалось снижение уровня мРНК мРНК IL-1β на 24% в среднем мозге мышей. На этом фоне три недели интраназального введения HLDF-6-H приводил к повышению уровня мРНК интерлейкина 1β на 28%. Уровень мРНК IL-1β в стриатуме отрицательно коррелирует с временем иммобилизации в тесте ВП ($r = - 0.659$, $p = 0.020$). Таким образом, повышение уровня мРНК IL-1β в стриатуме сопровождается снижением проявления депрессии. Ранее было установлено, что протекторное влияние пептида HLDF-6-H на МФТП модели досимптомной стадии БП также сопровождается восстановлением пониженных уровней мРНК IL-1β и мРНК IFNγ в целом мозге мышей [5].

Хроническое лечение пептидом HLDF-6-H при развитии депрессии на МФТП модели БП оказывает влияние на измененные уровни нейротрофических факторов и ростовых факторов в отделах мозга. Для животных получавших пептид, в гипоталамусе время иммобилизации в тесте ВП отрицательно коррелировало с мРНК BDNF ($r = - 0,51$ $p = 0,090$) и

трансформирующего фактора роста β1 (TGF β1) ($r = - 0.71$, $p = 0.020$). Таким образом, снижение уровней BDNF и TGF β1 в гипоталамусе коррелирует с повышением симптомов депрессии. Одним из ключевых отделов мозга при развитии стресса и депрессии является гипофиз. В гипофизе животных группы «Токсин» по сравнению с контролем произошло некоторое снижение мРНК BDNF на 8%. В результате введения пептида в течение трех недель, уровень мРНК BDNF в группе «Пептид» увеличился на 41%, по сравнению с группой «Токсин». При этом в гипофизе животных получавших пептид, уровень мРНК BDNF отрицательно коррелировал со временем иммобилизации в тесте ВП ($r = - 0,69$ $p = 0,019$). Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение под действием пептида HLDF-6-H уровня мРНК BDNF в гипофизе сопровождается снижением проявления депрессии.

При развитии депрессии на МФТП модели БП происходит снижение уровней эстрадиола и кортизола, а действие HLDF-6-H приводит к их восстановлению. Положительная активность HLDF-6-H сопровождается снижением воспалительных реакций и нормализацией уровней стероидов. Тестостерон и прогестерон в тканях подвергаются биотрансформации под действием фермента 5-альфа редуктазы, превращаясь в соответствующие дигидро-производные. Снижая активность этого фермента, удается повысить уровень тестостерона и направить его биотрансформацию в сторону образования 17-эстрадиола, обладающего высокими нейропротекторными свойствами.

Проявление депрессивно-подобного синдрома нарастает при снижении уровня андростендиона и прогестерона. Это находит свое выражение в том, что у животных группы «Токсин» время иммобилизации мышей в тесте ВП отрицательно коррелирует с уровнем андростендиона ($r = - 0.79$, $p = 0.006$) и прогестерона ($r = - 0.67$, $p = 0.011$). Хроническое лечение пептидом HLDF-6-H при развитии депрессии на МФТП модели БП оказывает влияние на систему кортикостероидов и половых гормонов. По сравнению с группой «Контроль», через три недели после введения МФТП происходит снижение уровня кортизола и эстрадиола на 58 и 27%, соответственно. По сравнению с группой «Токсин», три недели интраназального введения HLDF-6-H приводит к повышению уровней кортизола и эстрадиола на 41 и 27%, соответственно. Для мышей получавших пептид, время иммобилизации в тесте ВП, отрицательно коррелирует с кортизолом ($r = - 0.78$, $p = 0.022$) и с эстрадиолом ($r = - 0.73$, $p = 0.015$). Установлено, что проявление депрессии снижается с ростом концентрации этих стероидов.

Таким образом, в результате исследований на экспериментальных животных было установлено, что хроническое введение пептида HLDF-6-H (интраназально, 3 нед, 300 мкг/кг/сут) восстанавливает уровень дофамина и его оборот в стриатуме, повышает уровень эстрадиола в сыворотке крови и приводит к преодолению двигательных дисфункций. Кроме того, HLDF-6-H нормализуют уровни мРНК нейротрофина BDNF и медиаторов воспаления TGFβ1, IL1β и IFNγ в головном мозге. Нейропротекторный механизм HLDF-6-H при БП включает нормализацию уровня нейровоспалительных маркеров, эстрадиола и экспрессию ключевых факторов нейротрофической поддержки. Результат нормализации многих патологических симптомов БП в нервной, эндокринной и иммунной системах, достигнут впервые в мире, так как современная фармацевтика не способна даже замедлить прогрессирование болезни Паркинсона. Полученные результаты свидетельствуют о том, что пептид HLDF-6-H обладает терапевтическим потенциалом для лечения болезни Паркинсона [5].

Пептид HLDF-6-H зарегистрирован как назальный регенерирующий бальзам «Ринохеалинг» (ЕАЭС N RU Д-RU.PA09.B.82178/23). Полностью безвредный регенерирующий бальзам «Ринохеалинг» правомерно применять всем гражданам без ограничения. Впервые установлено, что использование в качестве дополнительной терапии назальных капель «Ринохеалинг», приводит к положительному эффекту, связанному с купированием отрицательных симптомов БП, как при ранних, так и развернутых стадиях этого заболевания. Применение для лечения БП регенерирующего бальзама «Ринохеалинг», позволило впервые обратить это неизлечимое заболевание вспять. Использование регенерирующего бальзама «Ринохеалинг» в качестве дополнительной терапии для преодоления патологических симптомов, возникших в результате БП, не имеет аналогов, так как другого лечения этого неизлечимого

в настоящее время заболевания, еще не разработано [4].

Отмечено, что ослабление выраженности ряда моторных и немоторных патологических симптомов БП от применения в качестве дополнительной терапии регенерирующего бальзама «Ринохеалинг» в дозе 0,5 мг/сутки развивается во времени. Установлено, что в результате применения «Ринохеалинг» в течение 1 и 6 месяцев, происходит увеличение доли пациентов, у которых произошло ослабление выраженности патологических симптомов БП: тремора с 22 до 61%, ригидности с 35 до 87%, нарушений скорости движения с 48 до 71%, нарушений равновесия с 47 до 82%, застывания с 40 до 80%, тревожно-депрессивного состояния с 40 до 80%, галлюцинаций 100 и 100%, нарушений памяти с 73 до 100%, нарушений когнитивных функций с 87 до 100%, нарушений терморегуляции с 56 до 85%, запоров с 55 до 78%, нарушений аппетита с 85 до 93%, снижения периода действия L-DOPA с 38 до 69%, нарушений сна с 68 до 88%, соответственно (Рисунки 1, 2).

Результатом, достигаемым за счет реализации дополнительной терапии пептидом HDLF-6-H, является повышение эффективности лечения за счет уменьшения резистентности к компенсирующей (базисной) антипаркинсонической терапии, а также за счет интенсивного преодоления патологических моторных и немоторных симптомов БП. Таким образом, если при традиционном лечении БП происходит неуклонное нарастание патологических симптомов, то при использовании в качестве дополнительной терапии назального регенерирующего бальзама «Ринохеалинг» происходит ремиссия и снижение выраженности патологических симптомов БП.

**Выводы.**

Установлено антидепрессанто-подобное, нейропротекторное и противовоспалительное действие HLDF-6-H при развитии депрессии на экспериментальной модели досимптомной стадии болезни Паркинсона. Хроническое применение HLDF-6-H приводит к нормализации локомоторной активности, многих измененных уровней цитокинов в отделах мозга, уровней стероидов в кровяном русле и сопровождается снижением воспалительных реакций.

По субъективной оценке всех пациентов, применявших в качестве дополнительной терапии регенерирующий бальзам «Ринохеалинг», наблюдается ослабление выраженности ряда моторных и немоторных симптомов болезни Паркинсона.

**Заключение**

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

Пептид HLDF-6-H обладает антидепрессантной, нейропротекторной и противовоспалительной активностью при развитии депрессии на экспериментальной модели досимптомной стадии болезни Паркинсона.

В результате хронического интраназального применения пептида HLDF-6-H, в значительной мере происходит ослабление выраженности патологических моторных и немоторных симптомов болезни Паркинсона у всех пациентов, принимавших регенерирующий бальзам «Ринохеалинг» в качестве дополнительной терапии. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований пептида HLDF-6-H в качестве дополнительного средства для терапии болезни Паркинсона.

***Рисунки к статье***

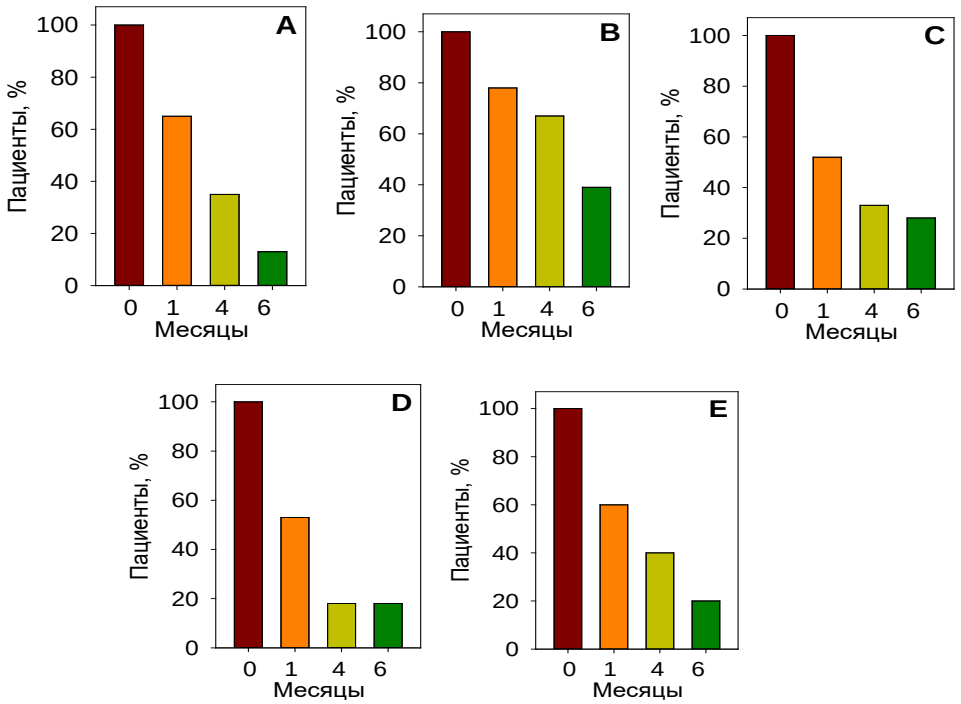
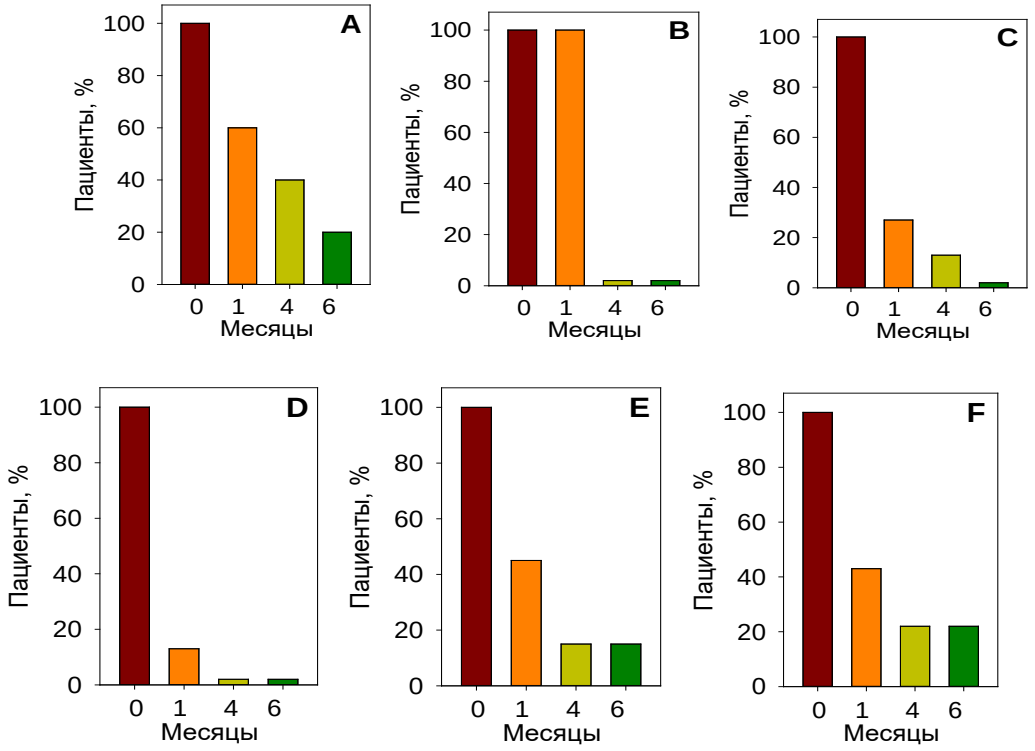



***Рис 1. Фармакодинамика изменения патологических симптомов болезни Паркинсона при применении регенерирующего бальзама «Ринохеалинг» на фоне основной фармакотерапии. Оценка по упрощенной шкале MDS-UPDRS. Пациенты с исходным уровнем проявления паталогического симптома (100%) и доля этих пациентов без ослабления выраженности проявления симптома через 1, 4 и 6 месяцев (%). Моторные симптомы. A - Ригидность, B - Тремор, C - Скорость движения, D - Равновесие, E - Застывания.***



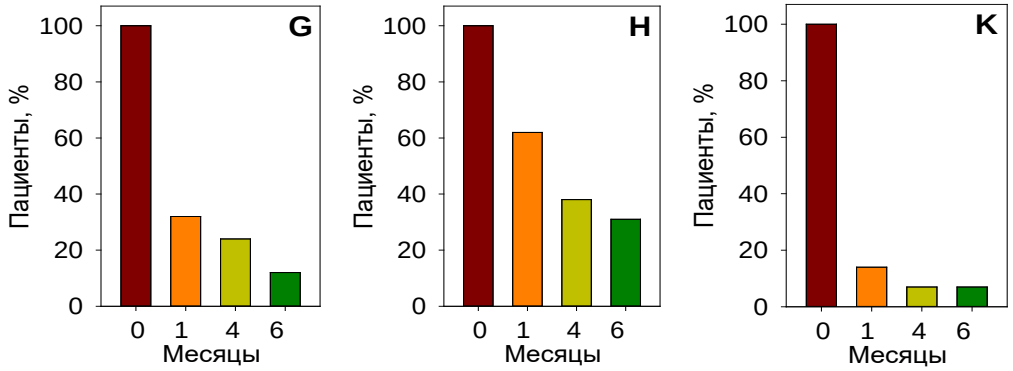



***Рис 2. Фармакодинамика изменения патологических симптомов болезни Паркинсона при применении регенерирующего бальзама «Ринохеалинг» на фоне основной фармакотерапии. Оценка по упрощенной шкале MDS-UPDRS. Пациенты с исходным уровнем проявления паталогического симптома (100%) и доля этих пациентов без ослабления выраженности проявления симптома через 1, 4 и 6 месяцев (%). Немоторные симптомы. A - Тревожно-депрессивное сост., B - Галлюцинации, C - Память, D - Когнитивные функции, E – Нарушения терморегуляции, F - Запоры, G - Сон, H - Период действия L-DOPA, K - Нарушения аппетита.***

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

**Литература.**

1. Magrinelli F, Picelli A, Tocco P, et al. Pathophysiology of motor dysfunction in Parkinson's disease as the rationale for drug treatment and rehabilitation. // Parkinsons Dis. 2016. V.10. P. 1-18. DOI: 10.1155/2016/9832839
2. Franke C and Storch A Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease. // Int. Rev. Neurobiol. 2017. V. 134. P. 947–971. DOI: 10.1016/bs.irn.2017.05.021
3. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. // Neurobiology of Aging. 2003. V. 24. P. 197–211. DOI: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9
4. Kalia LV, Lang AE Parkinson's disease. // Lancet. 386(9996) (2015) 896-912. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3
5. Zolotarev YuA, Shram SI, Dadayan AK, Dolotov OV, Markov DD, Nagaev IYu, Kudrin VS, Narkevich VB, Sokolov OYu, Kost NV. HLDF-6 peptides exhibit neuroprotective effects in the experimental model of preclinical Parkinson's disease. // Neuropeptides, December 2022. V. 96. 10228715 https://doi.org/10.1016/j.npep.2022.102287
6. Zolotarev Yu. A., Dadayan A. K., Kozik V. S., Nagaev I. Yu., Azev V. N., Gorbunova E. Yu., Mustaeva L. G., Bogachouk A. P., Lipkin V. M., and Myasoedov N. F. Investigation of the Hydrolytic Stability of the HLDF-6-AA Antitumor Peptide by the Method of Accelerated Aging. // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2020. Vol. 46. No. 6. P. 1044–1051. ISSN 1068-1620, DOI 10.1134/S1068162020060394
7. Костанян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницина С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Либкин В.М., Биологически активный фрагмент фактора дифференцировки клеток линии LH–60. Идентификация и свойства. // Биоорган. Химия. 2000. Т. 26. №7. С. 505-511
8. Ковалёв Г.И., Васильева Е.В., Салимов Р.М., Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Богачук А.П., Липкин В.М. Влияние субхронического введения пептида HLDF-6 на эффективность исследовательского поведения мышей линий C57Bl/6 и Balb/c. // Биоорган химия. 2021. Т. 47 № 1. С. 144–152. DOI: 10.31857/S0132342321010115

9. Zolotarev Yu.A., Kovalev G.I., N.V. Kost, M.E. Voevodina, O.Y. Sokolov, A.K. Dadayan, E.A. Kondrakhin, E.V. Vasileva, A.P. Bogachuk, V.N. Azev,V.M. Lipkin and N.F. Myasoedov Anxiolytic activity of the neuroprotective peptide HLDF-6 and its effects on brain neurotransmitter systems in BALB/c and C57BL/6 mice // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30 (9), P. 922–935 DOI: 10.1177/0269881116660705.
10. Bogachouk A.P., Storozheva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Yu.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A. and Lipkin V.M. Comparative study of the neuroprotective and nootropic activities of the carboxylate and amide forms of the HLDF-6 peptide in animal models of Alzheimer's disease. // J. Psychopharmacol., 2016, V. 30 (1), P. 78–92. doi: 10.1177/0269881115616393.
11. Sokolov OYu, Prokhorova TA, Tereshkina EB, et al. Neurotropic peptide HLDF-6-amide reduces age-related decline in sexual activity in old male rats. // Experimental Gerontology. 2021. V. 149. 111329. http://link.springer.com/article/10.1134/S1068162020060394
12. Lucki I., Dalvi A., Mayorga A.J. Sensi-tivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. // Psychopharmacol. (Berl). 2001. Vol. 155. N 3. P. 315-322.

**Сведения об авторах**

***Юрий Александрович Золотарев***
*доктор хим. наук, профессор.*
*Ведущий научный сотрудник ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* zolyural@yandex.ru

***Долотов Олег Валентинович***
*Кандидат биологических наук.*
*Старший научный сотрудник*
*ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* olegd-img@rambler.ru

***Дадаян Александр Карэнович***
*Кандидат химических наук.*
*Старший научный сотрудник. ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* dak72@rambler.ru

***Станислав Иванович Шрам***
*Кандидат биологических наук. Старший научный сотрудник.*
*ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:*shram.img@yandex.ru

***Дмитрий Дмитриевич Марков***
*Кандидат биологических наук, младший научный сотрудник*
*ФГБНУ НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* Molgenebio@gmail.com

***Кост Наталия Всеволодовна***
*Доктор биологических наук, профессор*
*Главный научный сотрудник*
*ФГБНУ «Научный центр психического здоровья",*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* nat-kost@yandex.ru

**Information about author**

***Yuri Alexandrovich* Zolotarev**
*Doctor of Science (Chem.), Professor,*
*Leading Researcher*
*NRC «Kurchatov Institute»,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail:* zolyural@yandex.ru

***Dolotov Oleg Valentinovich***
*PhD, Cand. of Sci. (Biol.) Senior Researcher*
*NRC «Kurchatov Institute»,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail:* olegd-img@rambler.ru

***Dadayan Alexandr Karenovich***
*PhD, Cand. of Sci. (Chem.)*
*Senior Researcher*
*NRC «Kurchatov Institute»,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail:* dak72@rambler.ru

***Stanislav Ivanovich Shram***
*PhD, Cand. of Sci. (Biol.) Senior Researcher*
*NRC «Kurchatov Institute»,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail:*shram.img@yandex.ru

***Dmitrii Dmitrievich Markov***
*PhD, junior research associate*
*NRC «Kurchatov Institute»,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail:* Molgenebio@gmail.com

***Kost Natalia Vsevolodovna***
*Doctor of Science (Biol.), Professor*
*Chief Researcher*
*FSBSI "Mental Health Research Centre",*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail:* nat-kost@yandex.ru

***Соколов Олег Юрьевич***
*Доктор биологических наук.*
*Ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия*
*Эл. почта:* oleg-sokolov@yandex.ru

***Sokolov Oleg Yurievich***
*Doctor of Science (Biol.) Leading Researcher*
*FSBSI "Mental Health Research Centre", Moscow, Russian Federation*
*E-mail:* oleg-sokolov@yandex.ru

***Зозуля Светлана Александровна***
*Кандидат биологических наук.*
*Ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия.*
*Эл. почта:* s.ermakova@mail.ru

***Zozulya Svetlana Alexandrovna***
*PhD, Cand. of Sci. (Biol.)*
*Leading Researcher*
*FSBSI "Mental Health Research Centre", Moscow, Russian Federation*
*E-mail:* s.ermakova@mail.ru

***Баймеева Наталья Викторовна***
*Кандидат биологических наук*
*Старший научный сотрудник.*
*ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия*
*Эл. почта:* baymeeva_n@mail.ru

***Baimeeva Natalya Viktorovna***
*PhD, Cand. of Sci. (Biol.) Senior Researcher*
*FSBSI "Mental Health Research Centre", Moscow, Russian Federation*
*E-mail:* baymeeva_n@mail.ru

***Шубина Елена Николаевна***
*Генеральный директор ООО «Нейропротекция», Москва, Россия.*
*Эл. почта:* elenanshubina@gmail.com

***Shubina Elena Nikolaevna***
***General Director of Neuroprotection LLC,***
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail:* elenanshubina@gmail.com

УДК 57.084.1:612.664.1:612.82
ГРНТИ 34.39.37
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.41-46

**А.А. Кибиткина, Е.Р. Василевская, Н.А. Ильин, Г.С. Толмачева**
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН

## ИЗМЕНЕНИЯ В МОЛОКЕ МЫШЕЙ TPH2 HET ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СТРЕССА

*Взаимосвязи нейрорегуляторных факторов головного мозга и состава грудного молока являются интересной и малоизученной темой. Статья направлена на исследование изменений химического состава молока мышей, склонных к развитию аффективных нарушений (гетерозиготных по TPH2) под воздействием стресса и без стресса относительно молока обычных мышей. Для исследования был использован метод рамановской спектроскопии комбинационного рассеивания света (длина волны 785 нм, фокусное расстояние 50х). Молоко мышей Het имеет менее богатый белковый и пептидный профиль, однако спектр жирных кислот, особенно под воздействием стресса, увеличивается.*
***Ключевые слова:*** *триптофан гидроксилаза 2, тревожность, рамановская спектроскопия.*

**A.A. Kibitkina, E. R. Vasilevskaya, N.A. Ilin, G.S. Tolmacheva**
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences

## CHANGES IN MILK OF TPH2 HET MICE UNDER EXPOSURE TO STRESS

*The relationship between neuroregulatory factors of the brain and the composition of breast milk is an interesting and little-studied topic. The article is aimed at studying changes in the chemical composition of the milk of mice prone to the development of affective disorders (heterozygous for TPH2) under the influence of stress and without stress relative to the milk of ordinary mice. Raman spectroscopy (wavelength 785 nm, focal length 50x) was used for the study. Het mouse milk has a less rich protein and peptide profile, but the range of fatty acids, especially under stress, increases.*
***Keywords****: tryptophan hydroxylase 2, anxiety, Raman spectroscopy.*

**Введение**.

Послеродовой период является одним из ключевых этапов материнства, и связан как с множественными физиологическими, так и психологическими изменениями, связанными с адаптацией к материнству. Психическое благополучие матери в послеродовой период имеет огромное значение как для матери, так и для здорового развития новорожденного, при этом непосредственно после родов до 20% родивших женщин подвержены развитию послеродовой депрессии [1]. Невылеченная послеродовая депрессия может иметь существенные неблагоприятные последствия для благополучия матери и ребенка, отрицательно влияя на когнитивное, поведенческое и эмоциональное развитие ребенка с долгосрочными последствиями [2].

При диагностике подобных аффекторных нарушений при медикаментозном лечении происходит замена материнского молока на кормовые смеси, в связи с чем отсутствует понимание влияния нейрорегуляторных факторов на состав грудного молока, и, собственно, потенциальное его влияние на ребенка. Материнство как социально мотивированное поведение подразумевает пластичность многих нейромодулирующих систем мозга (серотонин (5-HT), дофамин, гамма-аминомасляная кислота и норадреналин). Синтез 5-HT зависит от фермента триптофан гидроксилазы 2 (TPH2), нарушение экспрессии которого приводит к развитию тревожно-депрессивных состояний, в связи с чем мыши с нокаутом гена TPH2 являются высокоточной биомоделью стресс-индуцированной депрессии. При гетерозиготности гена TPH2, у мышей наблюдается частичная инактивация TPH2 и снижение регистрируемого уровня серотонина в головном мозге на 20-30%, что близко к аффекторным нарушениям у человека [3]. Под воздействием стресса фенотипический профиль гетерозиготных особей изменяется и характеризуется повышенным агрессивным состоянием и тревожностью.

На сегодняшний день мало известно о том, как снижение серотонинергической иннервации, опосредованное эндогенными и экзогенными факторами, влияет на компоненты грудного молока. В данной работе изучение химического состава молока будет проводиться с применением метода Рамановской спектроскопии комбинационного рассеивания света, который благодаря своим узким полосам и высокому разрешению позволяет неразрушающим образом извлекать химическую и физическую информацию о образцах.

**Цель работы.**

Данная работа посвящена выявлению изменений в химическом составе молока гетерозиготных самок мышей TPH2 при воздействии стресса.

**Материалы и методы.**

Эксперимент проводился на базе Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН. Исследуемый штамм мышей поддерживается гаремным разведением гетерозиготных нокаутных особей TPH2 SPF-категории на генетическом фоне C57BL/6J. Животных размещали со свободным доступом к пище и воде в индивидуально вентилируемых клетках Bio A.S. (Vent II, EHRET, Германия) типа 2L (размер 350 x 200 x 140 мм). Условия содержания животных были стандартизированы: температура – 20 ± 3 °C, влажность - 35 ± 2%, входной и выходной поток воздуха - 95 ± 5 м3/ч, а также режим дневного/ночного освещения с 6:00 до 18:00 / с 18:00 до 6:00.).

Процедура отбора грудного молока проводилась на 10 сутки после родов (PND10) у самок дикого типа (Wt, n=5), гетерозиготных нокаутных самок без моделирования хронического стресса (Het, n=5), и гетерозиготных нокаутных самок с моделированием хронического стресса (Het*стресс, n=5). Моделирование хронического стресса осуществляли путем иммобилизационной изоляции самки в домашней клетке с PND2 по DND9 ежедневно на 1 час, при этом помет также находился в домашней клетке, вне зоны доступа самки. Для предотвращения переохлаждения помета на клетку направляли лампу инфракрасного света (100 Вт).

Молоко отбирали на PND10, перед процедурой отбора помет изолировали в домашней клетке на 3 часа в сетчатой емкости, для предотвращения прямого физического контакта. После этапа разделения физический контакт между самками-матерями и пометом

восстанавливался путем открытия изолирующей емкости на 3-5 минут [4]. Затем самок вводили в ингаляционную анестезию изофлураном (Laboratorios Karizoo, Испания) с помощью установки для анестезии BrandRWD (R540, КНР), вводили внутрибрюшинно окситоцин (0,1 мл/ голову), капли молока собирали с помощью автоматической пипетки (Thermo Fisher Scientific, США) в пробирки типа эппендорф (Sarstedtstr, Германия) не более 15 минут. Самку возвращали в домашнюю клетку через 1 час, убедившись, что дыхательная и моторная функции восстановлены.

Химический состав молока оценивали с помощью Рамановской спектроскопии комбинационного рассеивания света InVia Raman (Renishaw, UK) при длине волны 785 нм и записью спектров комбинационного рассеяния света с фокусным расстоянием 50х. Молоко в общем объеме 25 мкл стабилизировали в фольгированной алюминием лунке. Сканирование проводили в различных точках лунки для учета неоднородности образца, со временем экспозиции 10 с и 1 аккумуляцией в общем диапазоне от 890 до 1800 см-1. Для одного образца снимали минимум три спектра, все измерения проводили при комнатной температуре. Обработку полученных спектров проводили в программном обеспечении WiRE 5.5 путем удаления космических лучей; коррекции базовой линии; нормализации и сглаживанием пиков сглаживанием с использованием алгоритмов второй производной Савицкого-Голая. Анализ и идентификация спектров комбинационного рассеивания проводились по положению пика, определяемому его максимумом, соответствующим частоте вибрации химической связи, с использованием базы данных Interactive IRUG Spectrum [5].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 (Statsoft, США) с применением критерия Манна-Уитни и анализа главных компонент (PCA), уровень статистической значимости принимали при $p<0.05$.

**Полученные результаты.**

Для упрощения биологического набора данных полученных методом Рамановской спектроскопии, был проведен анализ главных компонентов в спектральном диапазоне 840-1800 см−1. Первые два компонента PC составляли 98,03% (PC1 91,47%; PC2 6,58%) от общих вариаций комбинационного рассеяния вокруг основных положений пиков комбинационного рассеяния. Отмечено преобладание колебательных особенностей жирных кислот (ЖК), липидов, белков. Загрузка PC1 содержала пики комбинационного рассеяния света, характерные для жирных кислот (1062, 1083, 1125, 1263, 1300, 2849, 2889 см−1); белков или белковых структур со включением аминокислот триптофана и тирозина, α-спиралей или фосфолипидов (1348, 1368, ≈1542, ≈2871 см−1 (рис.1, 2)). Нагрузка на PC2 фиксировала пики комбинационного рассеяния, аналогичные таковым при загрузке PC1, отражая основные компоненты спектров комбинационного рассеяния.

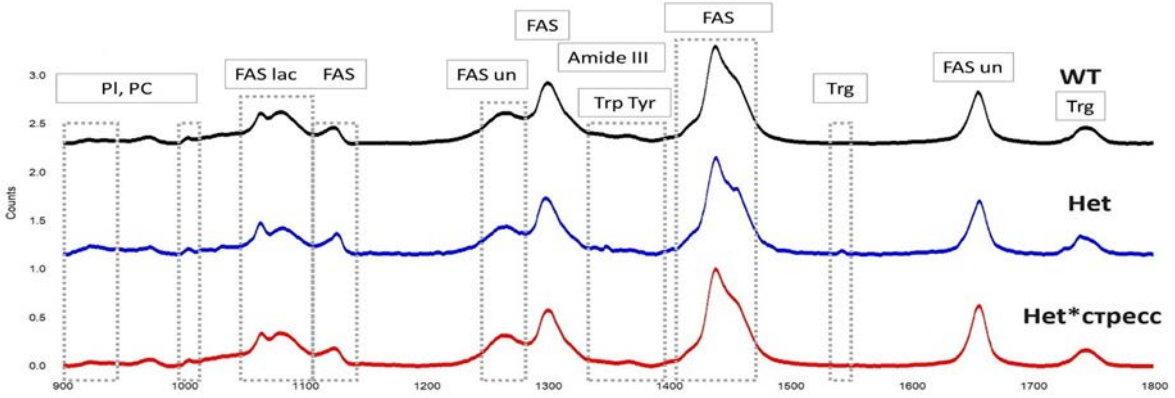



***Рисунок 1. Рамановские пики образцов молока в диапазоне 900 – 1800 Raman shift см$^{-1}$***
***(Pl – фосфолипиды, PC – фосфатидилхолины, FAS – насыщенные жирные кислоты, lac- лактоза, Trp – триптофан, Tyr - тирозин, Trg – триглицериды, Fas un – ненасыщенные жирные кислоты)***

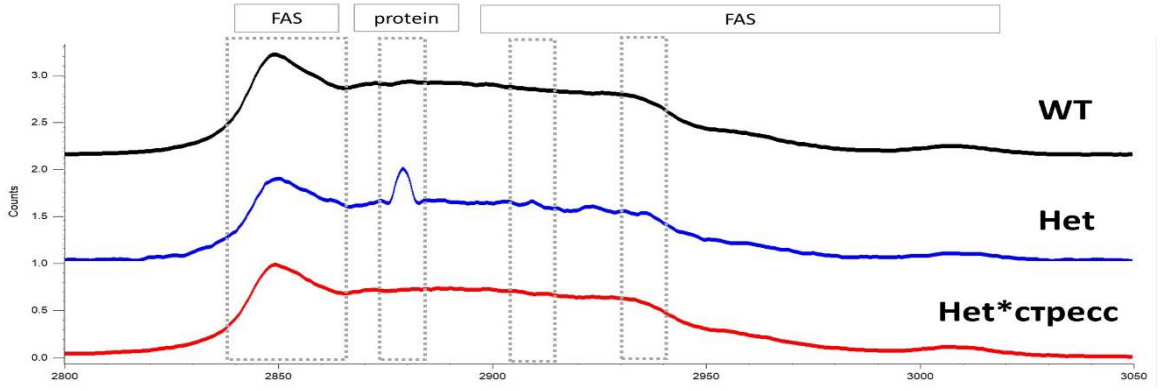



***Рисунок 2. Рамановские пики образцов молока в диапазоне 2800 – 3050 Raman shift см $^{-1}$***

В молоке самок Het, в независимости от наличия стрессового фактора, были увеличены интенсивности колебаний в областях 840 cm-1 (комбинация связей –O–C–C–N–) и 971 см−1 (колебания метильной группы CH2). Спектры в диапазоне 1124-1125 см−1 представляют собой колебания одинарных углерод-углеродных связей (C–C), характерных для жирных кислот. Аналогичное увеличение интенсивностей зарегистрировано по области 1063 см−1, характерной для маркеров липидов кристаллического состояния.

При этом, в молоке мышей Het отсутствовали пики в области 1079 см−1 (анион метафосфита PO2−, характеризующий симметричные растягивающие колебания РНК, ДНК), 1262 см−1 (амид III, входящий в структуры белков), 1340 см−1 (углерод-водородная связь CH, появляющаяся при деформации аденина, фенилаланина), 1368 см−1 (симметричные колебания карбокси-группы COO– при растяжении и изгибе метила CH3, входящей в структуры липидов и белков). Интенсивности пиков в молоке самок Het под воздействием стресса во многом были аналогичны WT, однако, стоит отметить отсутствие пиков в областях 922 см−1 (углерод-углеродный C–C участок кольца пролина/ глюкозы/ коллагена), 1340 см−1 и 1362 см−1 (симметричное растяжение метильной группы CH2, входящей в структуру аминокислот).

Колебания в области 1400–1800 см−1, соответствующие колебаниям пептидных связей O=NH=, формирующих белковую основу, и колебаниям, связанным с боковыми цепочками аминокислот, равносильно наблюдались в образцах всех групп (рис. 3).

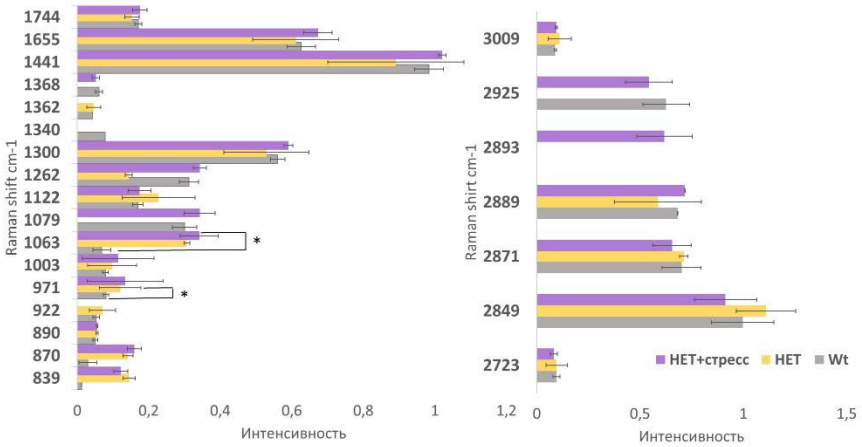



***Рисунок 3. Интенсивность Рамановских пиков (Raman shift cm$^{-1}$) в молоке***

Пики комбинационного рассеяния при 2849 см−1 (симметричное растяжение метильной группы CH2) и 2872 см−1 (симметричное растяжение метила CH3) указывают на наличие в молоке холестерина, и более интенсивно отображаются в молоке мышей Wt и Het. Пик в

области 2723 см−1 характерен для ассиметричного растяжения ν(C–H) вибрации метила CH3 ацильных цепей, пик 2880 см−1 характерен для растяжения ферми-резонанса метильных групп CH2 ацильных цепей в кристаллическом состоянии, а область 2898 см−1 для ν(C-H) ацильной цепи. Пик 3008 см−1 характерен для валентных симметричных колебаний (C-H) ненасыщенных жирных кислот. Полоса, характерная для C-H симметричного растяжения липидов (метилы CH3 жирных кислот) в области 2930 см−1, в большей интенсивности наблюдалась в образцах Wt, в молоке самок Het данная область отсутствовала. Стоит отметить пик в области 2893 см−1 (протеины), который наблюдался только в молоке мышей Het, подвергнутых стрессу (рис.3).

Пики в областях 971, 1262 и 1655 см-1 отражают степень ненасыщенности, в то время как сигналы при 1300, 1440, и 1744 см-1 соответствуют насыщенным связям или сложноэфирным группам [6]. Образцы молока от всех генотипов имели интенсивные пики 1300 см-1 и 1655 см-1. Данный показатель был выше для молока мышей Het, подвергнутых стрессу, на 17,3% относительно WT (и на 20,4% относительно Het). Согласно данным из таблицы 1 видно, что молоко WT Het имело сниженное число геометрического отношения (GeoMean) интенсивностей (0,549), что может свидетельствовать о более низкой доле двусвязанных жирных кислот и более высокой доле насыщенных жирных кислот (таблица 1).

***Таблица 1. Содержание ненасыщенных жирных кислот в образцах молока***

| $I\ FAS^{un}$ / I FAS | **WT** | **Het** | **Het*стресс** |
|---|---|---|---|
| I 971 / I 1300 | 0,143 | 0,229 | 0,227 |
| I 971 / I 1441 | 0,081 | 0,136 | 0,131 |
| I 971 / I 1744 | 0,468 | 0,791 | 0,766 |
| I 1266 / I 1300 | 0,557 | 0,272 | 0,580 |
| I 1266 / I 1440 | 0,317 | 0,161 | 0,336 |
| I 1266 / I 1744 | 1,826 | 0,940 | 1,960 |
| I 1655 / I 1300 | 1,116 | 1,155 | 1,139 |
| I 1655 / I 1440 | 0,636 | 0,686 | 0,659 |
| I 1655 / I 1744 | 3,661 | 3,993 | 3,846 |
| GeoMean | 0,549 | 0,528 | 0,664 |

**Выводы.**

Согласно полученным результатам по анализу химического состава молока мышей без воздействия моделирования стресса и при воздействии хронического стресса, а также самок дикого типа можно сделать следующий вывод: молоко обычных мышей WT имело стабильное соотношение жирных кислот, также в молоке мы не наблюдали отсутствия пиков, характерных для химических связей пептидных и липидных соединений. В молоке гетерозиготных мышей TPH2 Het, генетически склонных к развитию аффекторных нарушений, зарегистрировано отсутствие пиков, характерных для некоторых белков и жирных кислот, при этом коэффициент соотношения жирных кислот был несколько ниже, чем у WT, что может свидетельствовать о потенциальном нарушении процессов миелинизации нервных волокон и медленном развитии мозга потомства при употреблении лактата. Воздействие хронического стресса на самок TPH2 Het также позволило выявить некоторые изменения в молоке, аналогично результатам гетерозиготных мышей без стресса: обнаружено отсутствие пиков, характерных для некоторых белков и жирных кислот, при этом интенсивность присутствующих пиков была выше, чем у WT, о чем также свидетельствуют результаты по соотношению жирных кислот в молоке. Полученные результаты могут свидетельствовать о стимулирующей роли стресса на компенсаторную выработку жирных кислот в материнском молоке, которые необходимы для роста и развития и играют важную роль в развитии центральной нервной системы.

**Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: в частности, впервые был изучен химический состав молока мышей с помощью метода Рамановской спектроскопии комбинационного рассеивания света, в результате были получены ценные данные, свидетельствующие о недостаточной питательной ценности молока самок гетерозиготного генотипа (TPH2 Het), а также о возможном компенсаторном механизме питательной ценности молока от стрессированных гетерозиготных самок TPH2.

***Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-76-01045), https://rscf.ru/project/23-76-01045***

**Литература.**

1. Ystrom, E. Breastfeeding cessation and symptoms of anxiety and depression: a longitudinal cohort study // BMC Pregnancy and Childbirth. 2012. Vol. 12. № 1. P. 36.
2. Postpartum depression and anxiety: a community-based study on risk factors before, during and after pregnancy // Journal of Affective Disorders. 2021. Vol. 286. P. 158-165.
3. Mice Genetically Depleted of Brain Serotonin Do Not Display a Depression-like Behavioral Phenotype // ACS Chemical Neuroscience. 2014. Vol. 5. № 10. P. 908-919.
4. Milk Collection Methods for Mice and Reeves' Muntjac Deer // Journal of Visualized Experiments. 2014. № 89.
5. Reference database of Raman spectra of biological molecules // Journal of Raman Spectroscopy. 2007. Vol. 38. № 9. P. 1133-1147.
6. Bee, G. Effect of dietary energy supply and fat source on the fatty acid pattern of adipose and lean tissues and lipogenesis in the pig1 // Journal of Animal Science. 2002. Vol. 80. № 6. P. 1564-1574.

**Сведения об авторах**
***Кибиткина Анастасия Анатольевна***
*инженер-исследователь*
*ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им.В.М.Горбатова» РАН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: a.kibitkina@fncps.ru*
***Екатерина Романовна Василевская***
*К.т.н., научный сотрудник*
*ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им.В.М.Горбатова» РАН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: e.vasilevskaya@fncps.ru*
***Ильин Николай Александрович***
*инженер-исследователь*
*ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им.В.М.Горбатова» РАН*
*Москва, Россия*
*E-mail: n.ilin@fncps.ru*
***Толмачева Галина Сергеевна***
*инженер-исследователь*
*ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им.В.М.Горбатова» РАН*
*Москва, Россия*
*E-mail: tgs2991@yandex.ru*

**Information about author**
***Anastasia Anatolievna Kibitkina***
*research engineer*
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
*Moscow, Russian Federation*
*Эл. почта: a.kibitkina@fncps.ru*
***Ekaterina Romanovna Vasilevskaya***
PhD (technical sciences), *Researcher,*
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: e.vasilevskaya@fncps.ru*
***Nikolai Alexandrovich Ilin***
*senior lab technician*
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: n.ilin@fncps.ru*
***Tolmacheva Galina Sergeevna***
*research engineer*
V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: tgs2991@yandex.ru*

УДК 577.12
ГРНТИ 31.23
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.47-50

**А.А.Ш. Хасан[1], Е.В. Калинина[1], Ю.Л. Володина[2], А.С. Петрова[1], Д.Д. Жданов[3], А.А. Штиль[2], В.В. Татарский[4]**
[1]Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»
[2]НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России
[3]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича
*[4]Институт биологии гена РАН*

## ОБРАЩЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЦИСПЛАТИНУ ПРИ ДЕЙСТВИИ КУРКУМИНА.

*В статье обсуждается влияние растительного полифенола куркумина на устойчивость клеток аденокарциномы яичников SKOV-3 к противоопухолевому препарату цисплатину. Представлены данные, показывающие, что действие куркумина вызывает «обращение» лекарственной устойчивости опухолевых клеток, что связано с подавлением клеточной антиоксидантной системы и сигнального пути PI3K/Akt/mTOR*

***Ключевые слова:*** *лекарственная резистентность опухолевых клеток, экспрессия генов, сигнальный путь PI3K-AkT-mTOR, цисплатин.*

**A.A. Hasan[1], E.V. Kalinina[1], V, Yu.L. Volodina[2], A.S. Petrova[1], D.D. Zhdanov[3], A.A. Shtil[2], V.V. Tatarskiy[4]**
[1]Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)
[2]Blokhin National Medical Research Center of Oncology
*[3]Research Institute of Biomedical Chemistry*
*[4]Institute* of *Gene Biology, Russian Academy* of *Sciences*

## REVERSAL OF CANCER CELL RESISTANCE TOWARDS CISPLATIN BY CURCUMIN.

*The article discusses the effect of the plant polyphenol curcumin on the resistance of SKOV-3 ovarian adenocarcinoma cells to the antitumor drug cisplatin. Data are presented showing that the action of curcumin causes a "reversal" of drug resistance in tumor cells, which is associated with suppression of the cellular antioxidant system and the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.*

***Key words:*** *drug resistance of tumor cells, gene expression, PI3K-AkT-mTOR signaling pathway, cisplatin.*

**Введение.**

Важной проблемой противоопухолевой терапии является развитие лекарственной устойчивости опухолевых клеток, что связано с поиском путей её преодоления. Формирование лекарственной устойчивости имеет многофакторный характер, в число наиболее известных механизмов её развития в настоящее время включаются редокс-зависимые пути регуляции [1, с.3; 2, с.42742]. Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR, контролирующий пролиферацию, выживаемость, метаболизм и ответы на стресс, рассматривается в качестве важной характеристики развития резистентности опухолевых клеток [3, с.7]. Активность PI3K/Akt/mTOR важна для регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза путем активации как систем генерации активных форм кислорода (АФК), так и процессов антиоксидантной защиты, обеспечивая поддержание уровня АФК, которое может оказывать проонкогенное действие [4, с.3]. Учитывая важность значения сигнального пути PI3K/Akt/mTOR поиск его ингибиторов представляется перспективным направлением в химиотерапии**.** Среди потенциальных противоопухолевых препаратов в настоящее время активно разрабатывается куркумин – растительный полифенол, обладающий антиоксидантным, антипролиферативным, противоспалительным действием [5, с.1]. Химиотерапевтический потенциал куркумина установлен для различных типов злокачественных новообразований [5, с.2].

Цель работы заключалась в исследовании влияния куркумина на устойчивость клеток

аденокарциномы яичников SKOV-3 и изогенной сублинии SKOV-3/CDDP к противоопухолевому препарату цисплатину, клеточный редокс-статус и сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR.

**Материалы и методы.**

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

**Полученные результаты**.

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

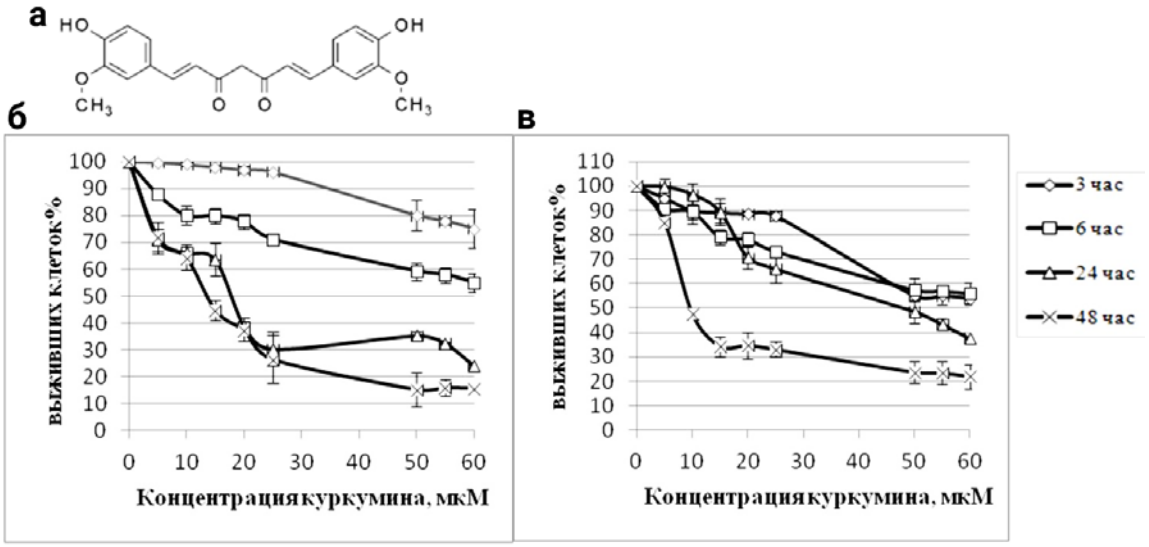



***Рис. 1. Влияние куркумина (а) на пролиферацию чувствительных (б) и резистентных (в) к цисплатину клеток SKOV-3 в зависимости от концентрации и времени инкубации.***

При концентрации 17 мкМ (значение $IC_{50}$ для клеток SKOV-3) в течение 24 ч куркумин нарушает распределение фаз цикла: увеличивается доля клеток в G2/M, достоверно для клеток SKOV-3 (рис. 2).

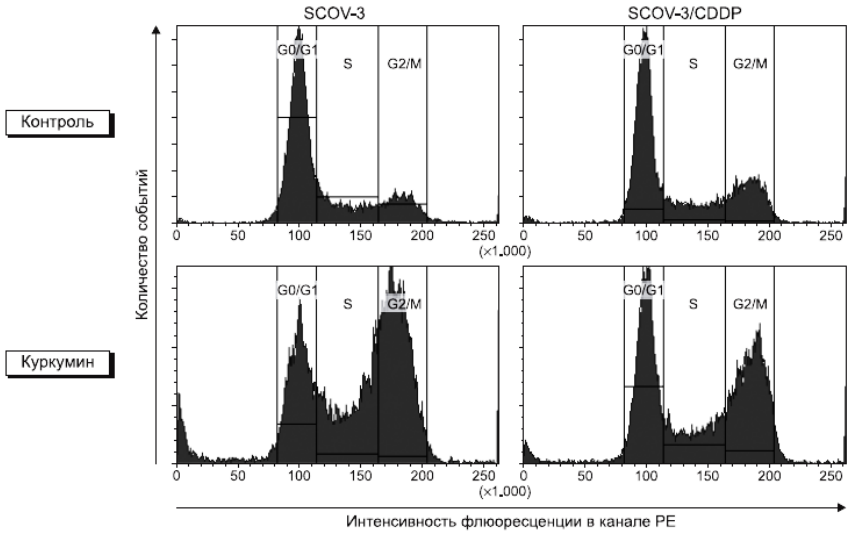



**Рис. 2. Распределение фаз цикла клеток SKOV-3 и SKOV-3/CDDP при действии куркумина (17 мкМ, 24 ч). Гистограммы интенсивности флюоресценции йодида пропидия (PI).**

Однако этот эффект по-разному реализуется: для SKOV-3 доля гибнущих клеток (subG1) нарастает, тогда как у SKOV-3/CDDP вызванная куркумином задержка в G2/M не

сопровождается повышением доли клеток в subG1. Инкубация клеток SKOV-3/CDDP с куркумином при нетоксичной концентрации 17 мкМ (24 час) приводила к повышению их чувствительности («обращению» резистентности) к CDDP, снижая $IC_{50}$ (таблица).

***Таблица. Оценка цитотоксичности (IC50) действия куркумина, цисплатина и их комбинации на чувствительные и резистентные клетки SKOV3.***

| Условия инкубации | SKOV-3 | SKOV-3/CDDP |
|---|---|---|
| CDDP, 72 ч | 10μM ± 0.8 | 34μM ± 0.6 |
| Куркумин, 3 ч | >50μM | >50μM |
| Куркумин, 6 ч | >50μM | >50μM |
| 17μM куркумин, 3 ч + CDDP, 72 ч | 4.9μM ± 0.6 | 16.5μM ± 0.4 |

Оценка экспрессии генов протеинкиназ PI3K/Akt/mTOR в клетках SKOV3 и SKOV-3/CDDP позволила установить, что формирование устойчивости сопровождается значительным повышением мРНК PI3K, Akt и mTOR. Напротив, действие куркумина (17 мкМ, 24 ч) приводит к резкому снижению экспрессии генов PI3K, AKT, MTOR в сублинии SKOV3/CDDP по сравнению с клетками SKOV3; у последних не обнаружено достоверного изменения экспрессии этих генов.

Подавление экспрессии генов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR наблюдалось наряду с резким снижением экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов – Cu,Zn- и Mn-супероксидлисмутазы, глутатионпероксидазы 1, гемоксигеназы 1, каталазы (SOD1, SOD2, CPX1, HO1, CAT) в сублинии SKOV-3/CDDP по сравнению с SKOV-3, у которых не обнаружено достоверного изменения экспрессии этих генов, за исключением небольшого снижения экспрессии гена SOD2. В отличие от родительских клеток у резистентной сублинии куркумин снижал мРНК транскрипционного фактора Nrf2 (NFE2L2**),** контролирующего экспрессию указанных антиоксидантных ферментов.

**Выводы.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: на клетки SKOV-3 и SKOV-3/CDDP куркумин действует как цитостатик в первом случае и как ингибитор антиоксидантной защиты во втором; куркумин-зависимое подавление антиоксидантной защиты клеток SKOV3/CDDP происходит за счет значительного снижения экспрессии генов ключевых антиоксидантных ферментов и транскрипционного фактора Nrf2; вызываемое куркумином «обращение» устойчивости клеток аденокарциномы яичника к цисплатину связано с подавлением клеточной антиоксидантной системы и сигнального пути PI3K/Akt/mTOR.

**Литература.**

1. Bukowski K., Kciuk M., Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy //*International Journal of* Molecular Sciences. 2020. No. 21 (9). 3233.
2. Liu Y., Li Q., Zhou L., Xie N., Nice E.C., Zhang H., Huang C., Lei Y. Cancer drug resistance: redox resetting renders a way //Oncotarget. 2016. No. 7 (27). P. 42740-42761.
3. Pungsrinont T., Kallenbach J., Baniahmad A. Role of PI3K-AKT-mTOR Pathway as a Pro-Survival Signaling and Resistance-Mediating Mechanism to Therapy of Prostate Cancer // International Journal of Molecular Sciences. 2021. No. 22 (20). 11088.
4. Koundouros N., Poulogiannis G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer // Frontiers in *Oncology*. 2018. No. 8. 160.
5. Zoi V., Galani V., Lianos G.D., Voulgaris S., Kyritsis A.P., Alexiou G.A. The Role of Curcumin in Cancer Treatment //Biomedicines. 2021. No. 9 (9). 1086.

**Сведения об авторах**

***Хасан Асиль Али Шехадех***
*аспирант*
*Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы (РУДН)*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* ali.aseel.hasan@gmail.com

***Калинина Елена Валентиновна***
*д.б.н., профессор*
*профессор кафедры биохимии*
*Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН)*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* kalinina-ev@rudn.ru

***Володина Юлия Леонидовна***
*научный сотрудник лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток*
*НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* uvo2003@mail.ru

***Петрова Альбина Сергеевна***
*к.б.н., ассистент кафедры биохимии*
*Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН)*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* albina.s.petrova@yandex.ru

***Жданов Дмитрий Дмитриевич***
*д.б.н., заведующий лабораторией медицинской биотехнологии*
*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им В.Н. Ореховича (ИБМХ)*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* zhdanovdd@mail.ru

***Штиль Александр Альбертович***
*д.м.н., заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток*
*НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* shtilaa@yahoo.com

***Татарский Виктор Вячеславович***
*к.б.н., доцент*
*заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии*
*Институт биологии гена* РАН *(ИБГ РАН)*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:* tatarskii@gmail.com

**Information about author**

***Hasan Aseel Ali Shehadeh***
*postgraduate student*
*Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University)*
*Russian Federation*
*E-mail:*ali.aseel.hasan@gmail.com

***Kalinina Elena Valentinovna***
*Doctor of Science (Biol.), Professor*
*Professor of Biochemistry Department*
*Peoples' Friendship University of Russia*
*(RUDN University)*
*Russian Federation*
*E-mail: kalinina-ev@rudn.ru*

***Volodina Yulia Leonidovna***
*Researcher of Laboratory of Tumor Cell Death*
*Blokhin National Medical Research Center of Oncology*
*Russian Federation*
*E-mail:* uvo2003@mail.ru

***Petrova Albina Sergeevna***
*PhD (Biol)*
*assistant of Biochemistry Department*
*Peoples' Friendship University of Russia*
*(RUDN University)*
*Russian Federation*
*E-mail:* albina.s.petrova@yandex.ru

***Zhdanov Dmitry Dmitrievich***
*Doctor of Science (Biol.), Head of the Laboratory of Medical Biotechnology*
*Research Institute of Biomedical Chemistry, VN Orekhovich*
*Russian Federation*
*E-mail:*zhdanovdd@mail.ru,

***Shtil Alexander Albertovich***
*Doctor of Medical Science (DMS), Head of Laboratory of Tumor Cell Death*
*Blokhin National Medical Research Center of Oncology*
*Russian Federation*
*E-mail:* shtilaa@yahoo.com

***Tatarskiy Victor Vyacheslavovich***
*PhD*
*(Biol Head of Laboratory of Molecular Oncobiology Institute* of *Gene Biology, Russian Academy* of *Sciences*
*Russian Federation*
*E-mail:* tatarskii@gmail.com

УДК: 635.153+533.9.07
ГРНТИ 68.43
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.51-55

**Пушкина Н.В.**
НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ
г. Минск, Республика Беларусь

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ ДЛЯ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН

*В работе приведены данные исследования действия экзогенной обработки комплексным интенсивным электромагнитным полем (КЭМП) на прорастание семян редьки масличной (Raphanus sativus L. var. oleifera Metzg). Описана экспериментальная методики обработки и результаты экспериментов по обработке семян редьки масличной.*

***Ключевые слова**: ЭМП излучение, плазменный генератор, семена растений, цирканнуальные ритмы.*

**N.V. Pushkina**
Institute for Nuclear Problems, Belarusian
State University, Minsk, Republic of Belarus

# USAGE OF COMPLEX INTENSE ELECTROMAGNETIC FIELD FOR PRE-SOWING SEEDS TREATMENT

*The paper presents data from a study of the effect of exogenous treatment with an complex intense electromagnetic field (CEMF) on the germination of seeds of oil radish (Raphanus sativus L. var. oleifera Metzg). The description of the experimental stand for the studied EMF seed treatment, the methodology and results of experiments on the treatment of seeds of oil radish.*

***Key words:** microwave radiation of low intensity, microwave generator seeds, barley, peas, circannual rhythms.*

**Введение.**

Влияние неионизирующих электромагнитных излучений на биологические объекты изучается достаточно давно, однако широкого практического применения в сельском хозяйстве и растениеводстве, так и не получила. Положительное влияние малых доз излучения на всхожесть, прорастание и урожайность семян растений сельскохозяйственных культур известна [1, с.8, 2, с.34, 3, с. 235].

Первоначально обработка холодной плазмой [4] в основном служила для стерилизации чувствительных к температуре материалов [5, с. 47, 6, с. 20], чуть позже был отмечен положительный эффект инактивации патогенных микроорганизмов в пищевой промышленности, биомедицине [7, 8, с. 6, 9 с. 77], и в последнее десятилетие плазменная нетермическая обработка стала активно применяться в сельском хозяйстве.

**Целью** данной работы было исследование действия экзогенной обработки семян комплексным интенсивным электромагнитным излучением на всхожесть и первичные ростовые параметры редьки масличной *(Raphanus sativus L. var. oleifera Metzg).*

**Материалы и методы.** В данном исследовании, для получения электромагнитного излучения использовалась технология электротермического псевдоожиженного (кипящего) [10] слоя, поддерживаемого электрическим разрядом. Это позволило подвергать исследуемые образцы тройному (комплексному) воздействию экстремальных факторов: абразивное воздействие на образцы (семена) кипящего слоя, кратковременное воздействие повышенной температуры (в верхней части рабочей камеры до 300 $^0$C) и воздействие электромагнитных полей, генерируемых в кипящем слое при наличии высоковольтного поля, под воздействием микроразрядов и стримеров. Для проведения экспериментальных исследований материалов, на базе Физико-технической лаборатории, НИИ ЯП БГУ, был разработан и изготовлен экспериментальный стенд [11, 12].

Проведенные предварительные исследования [13, с. 20] показали наличие широкого спектра (ЭМП) в интервале частот от 0,3 до 40 ГГц. Предлагаемый способ [13, с. 20] подразумевает более широкий спектр физических явлений в комплексном воздействии на биологические объекты (семена сельскохозяйственных культур), а именно: ультрафиолетовое

излучение, СВЧ, террагерцовое излучение, повышенная температура, наличие озона, градиент высоковольтного потенциала, абразивное воздействие в интенсивном потоке газообразного носителя (воздуха) и др. Возможно, значительный вклад в интенсификацию прорастания семян вносит СВЧ излучение, но не исключено определяющее воздействие излучения крайне высокочастотного (КВЧ) диапазона, наличие которого установлено экспериментально [13, с. 20].

В качестве объекта исследования использовались семена редьки масличной *(Raphanus sativus L. var. oleifera Metzg)*, которые подвергались обработке плазмой с использованием экспериментального стенда в течение 2 и 4 секунд. Необработанные семена служили контролем.

Эксперименты были заложены в лабораторных условиях с трехкратной повторяемостью для каждого варианта. Семена редьки масличной проращивали в чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге. Их выдерживали первые три дня прорастания при пониженной температуре (5 $^0$C), далее до 14-го дня роста при температуре 20-21 $^0$C, и ежедневно производили замеры. Каждая партия контрольных и обрабатываемых образцов содержала по 100 семян. Согласно ISTA (*International seed testing association*) энергию прорастания семян редьки масличной определяли на 7-ий день роста, а всхожесть на 14-ой день. Проросшими считали проклюнувшиеся семена с зародышевым корешком около 2 мм. Морфометрические параметры (длину и массу корней и побегов) исследуемой культуры определяли на 14-ый день роста [14, с. 21].

**Полученные результаты.**

В результате проведенных исследований установлено, что предпосевная обработка семян интенсивным электромагнитным полем 4 секунды максимально повышала всхожесть редьки масличной на 8% в условиях лабораторных опытов (рисунок 1). При этом исследуемая обработка не оказывала выраженного действия на энергию прорастания.

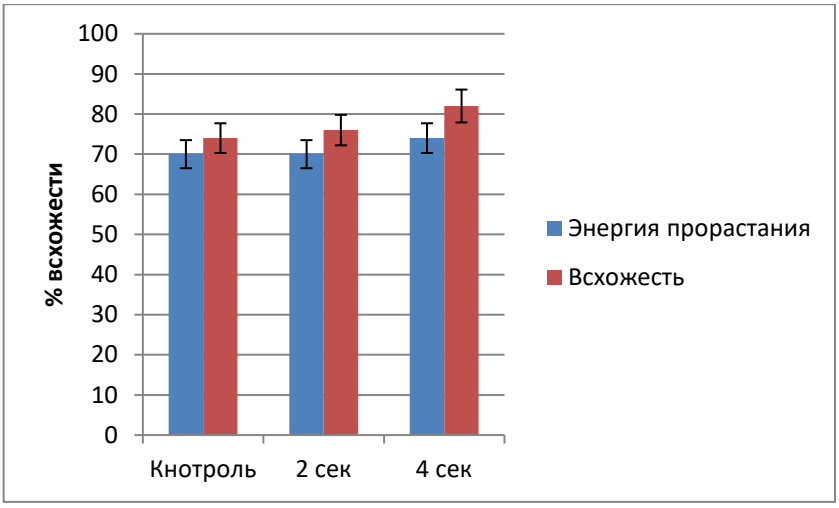



***Рисунок – 1. Влияние обработки семян интенсивным электромагнитным полем на энергию прорастания и всхожесть редьки масличной (Raphanus sativus L. var. oleifera Metzg.)***

Морфометрические параметры такие, как длина корней и проростков изменялись следующим образом. Предпосевное воздействие интенсивным электромагнитным полем с экспозицией 2 секунды повышало длину корня на 285%, а воздействие с экспозицией 4 секунды – на 134% (рисунок 2).

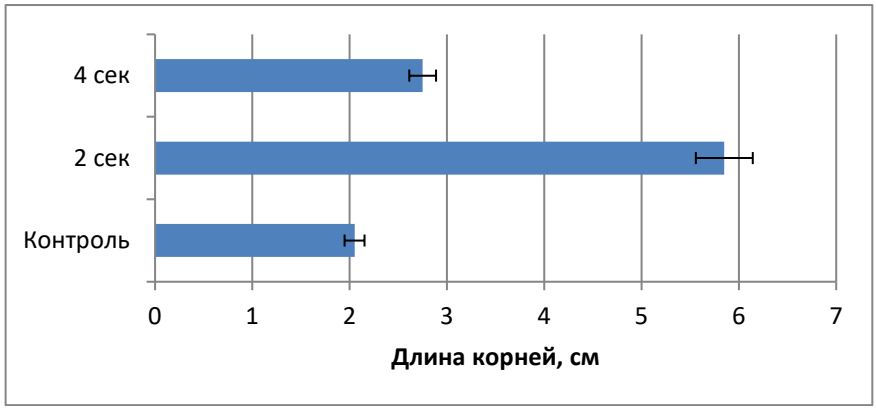



*Рисунок – 2. Влияние обработки семян интенсивным электромагнитным полем на длину корней редьки масличной (Raphanus sativus L. var. oleifera Metzg.) в лабораторных опытах*

Длина побегов изменялась аналогично длине корней. Обработка семян интенсивным электромагнитным полем повышала данный параметр на 400% после воздействия 2 секунды, и на 212,5% после облучения с экспозицией 4 секунды (рисунок 5). В результате проведенных исследований видно, что обработка семян редьки масличной интенсивным электромагнитным полем с экспозицией 2 секунды существенно стимулирует рост корней и проростков, при этом выраженного действия на всхожесть не оказывала. Возможно, имел место эффект компенсации за счет того, что всхожесть не повышалась, а существенно возрастали морфометрические параметры. А обработка семян интенсивным электромагнитным полем с экспозицией 4 секунды повышает лабораторную всхожесть исследуемой культуры на 8% и стимулирует ростовые параметры (рисунок 4).

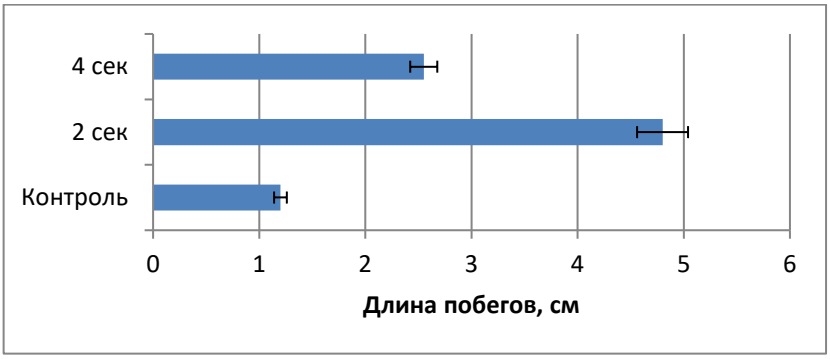



*Рисунок – 3. Влияние обработки семян интенсивным электромагнитным полем на длину побегов редьки масличной (Raphanus sativus L. var. oleifera Metzg.) в лабораторных опытах*

Таким образом, различные экспозиции исследуемого воздействия могут быть использованы для разных целей: обработка 2 секунды – для стимуляции ростовых параметров, 4 секунды – для стимуляции всхожести.

*Рисунок – 4. Фотографии контрольного (I) и обработанного (II) образцов на 7-ой день роста (а) и на 14-й день роста (б)*

**Выводы.**

Из данного исследования следует, что обработка семян комплексным интенсивным электромагнитным полем может ускорять прорастание семян и увеличивать длину проростков редьки масличной *(Raphanus sativus L. var. oleifera Metzg.)*. Использование описанного способа позволило увеличить всхожесть семян и скорость их роста, при этом достаточное время обработки семян составило 2 секунды, в то время как использование традиционных способов обработки семян предусматривает время от 5 до 30 секунд. Это значительно снижает энергозатраты процесса обработки семян интенсивным электромагнитным полем в сравнении с прототипами.

Как видно из приведённого выше исследования, использование предлагаемой технологии позволяет повысить качество ЭМП обработки семян редьки масличной, повысить производительность (за счет снижения времени обработки), снизить удельные энергозатраты (за счет более высокого КПД технологии по сравнению с технологиями, реализующими иной способ генерирования ЭМП).

**Заключение.**

Автор считает, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: особенность предлагаемого способа обработки семян заключается в том, что семена не присутствуют в плазме высоковольтного электрического разряда, а находятся на его периферии, в потоке воздуха под верхней сеткой, служащей препятствием их уносу за пределы рабочей зоны. Семена не попадают в зону плазменного разряда, но в полной мере получают сопровождающие плазменный разряд физические действия, а именно: 1) повышенная температура восходящего потока газа; 2) облучение ультрафиолетом от низкотемпературной плазмы; 3) воздействие озоном; 4) интенсивное микроволновое излучение, возникающее в псевдоожиженном слое (микроразряды между частицами порошка, краевые явления на остриях, локальные явления ускорения и торможения ионов и электронов в поле высокого градиента напряжения). Совокупность этих факторов и создаёт требуемый эффект – стимулирование всхожести семян и первичных ростовых параметров.

**Литература.**

1. Исследование энергии прорастания и всхожести семян горчицы при сушке импульсным ИК-способом / Н. А. Зуев [и др.] // Вестник ФГОУ ВПО МГАУ. 2011. № 2(47). С. 7–10.
2. Пушкина Н. В. Влияние предпосевной обработки семян электромагнитным полем сверхвысокочастотного диапазона на структурно-функциональное состояние проростков кукурузы // Междунар. науч.-исслед. журн. 2016. № 4 (46), ч. 5. С. 32–34.
3. Радиационные технологии в сельском хозяйстве и пищевой промышленности / Козьмин Г. В. [и др.]. Обнинск, 2015. 400 с.
4. Плазменная технология обработки семян и плазменные семена [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.lana-pav.com/plazmennaya-texnologiya-obrabotki-semyan-i-plazmennye-semena.html. - Дата доступа: 10.03.2024.
5. Корнев И. И., Баранов Г. А., Ульянов В. И. Низкотемпературные методы стерилизации в профилактике хирургической инфекции // Хирургия. 2011. № 6. С. 43–47.
6. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms / M. Moisan [et al.] // Int. Journal Pharmaceut. 2001. No. 226, N1. P. 1–21.
7. Drexel A. J. Plasma Institute in Camden [Электронный ресурс] : 1st International Workshop on Plasma Agriculture, IWOPA – 1 (May 15th – 20th 2016, USA). – Режим доступа: http://www.iwopa.org/program/IWOPA-1%20Abstracts.pdf. – Date of access: 10.03.2023.
8. Thirumdas, R., Sarangapani, C., Annapure, U.S. Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing // Food Biophysics. 2015. No. 10. P. 1–11.
9. Исследование влияния неравновесной низкотемпературной плазмы на структуру дермы полуфабриката из шкур речных рыб: сазана и судака / И.Ш. Абдуллин [и др.] // Вестник Казанского технологич. ун-та. 2014. Т. 17, № 1. С. 75–77.

10. Забродский, С. С. Высокотемпературные установки с псевдоожиженным слоем / С. С. Забродский. – М.: Энергия, 1971. 328 с.
11. Евразийский патент № 037157, “Устройство для получения плазмы тлеющего разряда”, Заявитель НИУ ЯП БГУ, авторы - Мартынюк В.И., Зеленин В.А., Сенько С.Ф., Быченок Д.С., Любимов А.Г. (BY).
12. Патент РБ № 23960, “Способ генерации излучения электромагнитных волн широкого и непостоянного спектра”, Заявитель НИУ ЯП БГУ, авторы - Мартынюк В.И., Гринчик Н.Н., Сенько С.Ф., Любецкий Н.В., Мартинов О.Г., Быченок Д.С., Максименко С.Ф., Зеленин В.А., Дронов В.Н.. (BY).
13. Применение СВЧ технологии сверхнизкой интенсивности в сельском хозяйстве. А. А. Гаврилова, В. Г. Егорашин, А. В. Чурмасов, М. А. Кревский. // “Радиоэлектроника” 2014. № 11, С. 19-25.
14. Handbook of vigour test methods / ed.: J. G. Hampton, D. M. TeKrony. – 3rd ed. – Zurich : ISTA, 1995. 117 p.

**Сведения об авторах**

***Пушкина Надежда Викторовна***
*Кандидат биол. наук, ст.науч.сотрудник физико-технической лаборатории*
*НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ*
*Минск, Беларусь*
*e-mail: nadyapushkina@gmail.com*

**Information about authors**

***Pushkina Nadezhda Viktorovna***
*Ph. D. of Biology Sciences, senior scientific employee of the physical and technical laboratory of the National Research University*
*"Institute of Nuclear Problems" BSU*
*Minsk, Belarus*
*e-mail: nadyapushkina@gmail.com*

УДК 616-092.9
ГРНТИ 34.39
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.55-59

**О.П.Чжу, И.И. Маринич, Д.Э. Аравиашвили**
Курчатовский комплекс медицинской приматологии

## ПОКАЗАТЕЛИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА КАК БИОМАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ И КОРРЕКЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ

*В статье рассматриваются возможности применения показателей оксидативного стресса в качестве биомаркеров возникновения, развития и коррекции патологических процессов, в том числе и ранней диагностики, на модели лабораторных приматов.*

***Ключевые слова:*** *оксидативный стресс, биомаркеры, продукты окисления, антиоксидантная защита, приматы*

**O.P. Chzhu, I.I. Marinich, D.E. Aravishvili**
Kurchatov Complex of Medical Primatology

## OXIDATIVE STRESS INDICATORS AS BIOMARKERS OF DEVELOPMENT AND CORRECTION OF PATHOLOGIC STATE

*In the article the possibilities of application of oxidative stress indicators as biomarkers of occurrence, development and correction of pathological processes, including early diagnosis, on the model of laboratory primates are considered.*

***Keywords****: oxidative stress, biomarkers, oxidation products, antioxidant defense, primates*

**Введение**.

Оксидативный стресс занимает одну из ключевых ролей во многих патофизиологических процессах. Внутри клетки окислительный гомеостаз регулируется, в том числе,

производством активированных кислородных метаболитов, а также посредством внутриклеточных защитных механизмов. Окислительный стресс провоцирует воспаление, которое, в свою очередь, приводит к увеличению активных форм кислорода. Чрезмерное производство активных форм кислорода вызывает окисление макромолекул, индуцирующих апоптоз клеток. Оксидативный стресс повышает проницаемость сосудов, способствует адгезии лейкоцитов, вызывает изменения в эндотелиальной трансдукции сигнала и в процессах, регулируемых редокс-чувствительными факторами транскрипции.

Оксидативный стресс считается важным фактором риска развития и прогрессии ряда сердечно-сосудистых заболеваний (сердечная недостаточность, аритмия, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца), он влияет на начало заболевания, его прогноз, качество жизни и выживаемость пациентов. Окислительный стресс также играет важную роль в развитии онкологических процессов, диабета, артрита, нейродегенеративных расстройств, заболеваний легких, почек и печени. Число этих патологий увеличивается с возрастом, поэтому окислительный стресс считается одним из основных факторов старения и связанных со старением заболеваний [1, 2].

Оксидативный стресс определяется как изменение баланса между выработкой активных форм кислорода (свободных радикалов) и системой антиоксидантной защиты, направленной на противодействие им. Оценка состояния антиоксидантной системы включает в себя определение активности основных антиоксидантных ферментов (активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы эритроцитов). В дополнение к эндогенной ферментативной антиоксидантной системе ключевую роль играют неферментативные антиоксиданты. Эти антиоксиданты подразделяются на две группы: гидрофобные (витамины А и Е) защищают мембраны от воздействия свободных радикалов, а гидрофильные (витамин С) взаимодействуют со свободными радикалами в крови для нейтрализации образующихся свободных радикалов.

Оценка выраженности свободнорадикальных реакций предусматривает определение в пробах крови или тканей продуктов окисления, к которым относят продукты окисления липидов (малоновый диальдегид, флуоресцирующие продукты - комплексы липопротеидов, входящие в состав внутриклеточного образования – липофусцина ("пигмента старения")), белков (уровень карбонильных групп – «белковых карбонилов»), ДНК (8-OHdG). Совокупность этих показателей позволяет оценить как состояние основных звеньев антиокислительной системы организма, т.е. ее способность предотвращать избыточный ход реакций свободнорадикальной природы, так и фактическую интенсивность реакций радикального окисления и синтеза активных форм кислорода. Данные тесты могут рассматриваться в качестве критериев диагностики окислительного стресса.

Клиническая значимость биомаркеров окислительного стресса у людей должна быть доказана многочисленными исследованиями и стандартизирована для каждого конкретного заболевания, они должны отражать состояние редокс-баланса в организме

Для достоверной и адекватной клинической интерпретации полученных результатов принципиальное значение имеет не только абсолютная величина показателей, но и их динамика на фоне проведения лечебных мероприятий. Каждый из показателей имеет свои достоинства и недостатки, поэтому в данном случае важен комплексный подход. Основными требованиями, предъявляемыми к лабораторным методам, являются точность, простота выполнения и хорошая воспроизводимость.

Прогресс в разработке методов обнаружения и количественной оценки этих биомаркеров может облегчить требуемые ресурсы и время анализа, а также способствовать применению их в клинической практике.

Маркеры окислительного стресса являются важными инструментами для оценки биологического статуса редокс-потенциала, течения заболевания и его прогрессии [1,2].

**Цель работы.**

Оценить возможности использования показателей диагностики оксидативного стресса в качестве биомаркеров возникновения, развития и коррекции патологических состояний на

модели лабораторных приматов.

**Материалы и методы.**

В данной работе рассматривали динамику изменения показателей оксидативного стресса в группе возрастных приматов на фоне введения препарата с антиоксидантными свойствами, а также у приматов с нарушениями ферментативной активности печени.

В качестве показателей оксидативного стресса были выбраны продукт конечного окисления липидов малоновый диальдегид (МДА), ферментативный компонент антиоксидантной системы организма супероксиддисмутаза (СОД) и низкомолекулярный жирорастворимые антиоксиданты (витамины А, Е).

Измерение малонового диальдегида (МДА) и жирорастворимых витаминов А и Е в сыворотке крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа типа «1100 Series» фирмы Agilent с диодно-матричным детектором. Для обнаружения МДА проводили дериватизацию с использованием тиобарбитуровой кислоты. Продуктом реакции является триметиновый комплекс, имеющий характерную розовую окраску с $\lambda$ max = 532 нм. Идентификацию жирорастворимых витаминов А и Е осуществляли по времени удержания и спектру, регистрируемому с помощью с диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200-400 нм [3].

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

**Полученные результаты.**

В группе возрастных приматов независимо от способа введения препарата наблюдалось выраженное снижение концентрации МДА в плазме крови. До введения препарата среднее значение МДА по группам составило: экспериментальная – (0,61±0,10) мкмоль/л, контрольная – (0,53±0,15) мкмоль/л. После прекращения введения препарата на 40 день эксперимента среднее значение концентрации МДА в экспериментальной группе составило (0,25±0,10) мкмоль/л, в контрольной – (0,55±0,10) мкмоль/л.

Это позволяет предположить снижение активности процессов перекисного окисления и активизацию антиоксидантной защиты организма, что особенно важно у возрастных особей.

Наблюдение за группой проводилось в течение года, при этом стоит отметить сохранение низких показателей индикатора оксидативного стресса.

При внутривенном введении препарата в течение первых дней наблюдалось увеличение концентрации МДА, что может быть связано либо со способом введения, либо эффектом активации рецепторов, ответственных за механизмы взаимодействия с препаратом.

Особенностью механизма действия препарата можно считать выравнивание показателя оксидативного стресса по всей группе до статистически близких значений через месяц после прекращения введения субстанции независимо от состояния исходного окислительно-восстановительного фона особей, индивидуальных особенностей, различии в возрасте.

До введения препарата среднее значение концентрации витамина Е составляло в экспериментальной группе (2,19±0,49) мкг/мл, в контрольной группе – (2,34±0,34) мкг/мл. После прекращения введения препарата на 40 день эксперимента среднее значение концентрации витамина Е в экспериментальной группе составило (3,30±0,30) мкг/мл, в контрольной – (2,11±0,42) мкг/мл. Введение препарата сопровождалось увеличением концентрации витамина Е в плазме крови экспериментальных животных, что возможно связано с снижением активности процессов перекисного окисления под действием исследуемого препарата, за счет чего происходит увеличение уровня витамина Е, как одного из основных компонентов антиоксидантной защиты организма.

Метод ВЭЖХ позволил достаточно точно и с хорошей воспроизводимостью определить концентрации МДА и жирорастворимых витаминов в крови приматов, что невозможно было сделать методами иммуноферментного анализа.

В группе приматов в возрасте от 20 до 45 лет, инфицированных гепатитом, наблюдается корреляция между ростом МДА в сыворотке крови, биохимическим показателями и появлением антител. Следует отметить, что рост МДА происходит на неделю раньше, чем изменение классических биохимических маркеров, сопровождающих инфицирование. Концентрация МДА меняется с 0,17 мкмоль/л на первой неделе эксперимента до 0,42 мкмоль/л на третьей неделе, достигая максимума на в 0,70 мкмоль/л на четвертой неделе с последующим снижением до исходных значением. Появление первых антител зафиксировано только на четвертой неделе эксперимента.

При введение препарата с антиоксидантным действием в группе приматов с нарушениями ферментативной активности печени активность СОД в эритроцитах статистически значимо увеличивается от (2498,42±450,12) усл.ед./мин/г до (6123,56±830,00) усл.ед./мин/г и сохраняется в течение двух недель после отмены препарата, снижаясь затем до исходного значения.

**Выводы.**

Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что рассмотренные в работе показатели оксидативного стресса могут быть биомаркерами развития и коррекции патологических процессов, в том числе возрастных и дегенеративных, а также могут быть использованы в качестве маркеров ранней диагностики возникновения патологии.

**Заключение**

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

1. отработаны методы определения ряда биомаркеров окислительного стресса на приматах, т.к. несмотря на то, что приматы являются лучшими моделями человеческого организма, ряд физиологических процессов у них протекает с индивидуальными особенностями. Поэтому референсные значения, в том числе и окислительно-восстановительных реакций, отличаются от человека и не определяются классическими методами;
2. показана взаимосвязь между рассмотренными в работе показателями оксидативного стресса и возможность их применения в качестве биомаркеров ранней диагностики, в частности, по концентрации малонового диальдегида.

**Литература.**

1. Волкова М.В., Рагино Ю.И. Современные биомаркеры окислительного стресса, оцениваемые методом иммуноферментного анализа // Атеросклероз. 2021. № 17 (4). С. 79–92.
2. Marrocco I., Altieri F., Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017. Article ID 6501046. P.1–32.
3. Шантырь И. И. и др.Оценка оксидативного стресса у сотрудников ГПС МЧС России и основные направления его коррекции: методические рекомендации: Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины // СПб.: ВЦЭРМ. 2019. 55 с.
4. RU 2144674 C1, 2000 / Сирота Т.В. Опубл. 20.01.2000, Бюлл. № 2.

**Сведения об авторах**

***Чжу Ольга Петровна***
*К.х.н., ведущий научный сотрудник*
*Курчатовский комплекс медицинской приматологии*
*Сочи, Россия*
*Эл. почта: olga.chzhu@mail.ru*

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

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

**Information about author**

***Chzhu Olga Petrovna***
*Candidate of Chemical Sciences, Leading Researcher*
*Kurchatov complex of medical primatology*
*Sochi, Russia*
*E-mail: olga.chzhu@mail.ru*

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

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

УДК 616-092
ГРНТИ 34.39
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.59-67

**А.Д. Черкасов**
Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии
Е.Н. Петрова
Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН

## РЕАЛЬНЫЕ ПУТИ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ЧЕЛОВЕКА

*В статье анализируются концепции преждевременного старения, разработанные известными учеными С.П. Боткиным и И.И. Мечниковым. Авторами предложены две новые концепции, позволяющие избегать преждевременного старения и увеличивать продолжительность жизни человека.*

***Ключевые слова:*** *старение, остеохондроз позвоночника, микробиота, нервная трофика.*

**A.D. Cherkasov**
Research Institute of General Pathology and Pathophysiology
**E.N. Petrova**
Institute for Information Transmission Problems (Kharkevich Institute)

## REAL WAYS TO INCREASE HUMAN LIFE EXPECTANCY

*The article analyzes the concepts of premature aging developed by famous scientists S.P. Botkin and I.I. Mechnikov. The authors proposed two new concepts to avoid premature aging and increase human life expectancy.*

***Keywords****: aging, spinal osteochondrosis, microbiota, nervous trophism.*

### Введение

Существует более 200 теорий старения. Старение является общебиологическим явлением. На тему старения написаны сотни статей и книг, без особых перспектив радикального увеличения продолжительности жизни. Данную статью следует рассматривать как аннотацию книг, написанных автором за последние 5 лет. Эти книги посвящены возможности увеличения продолжительности жизни человека более чем на 20 лет. Книги приведены в списке литературы и опубликованы на сайте автора www.healthsys.ru. Наша концепция

подтверждается тем, что наши пациенты избавлялись от так называемых возрастных заболеваний и доживали до 92-летнего возраста, оставаясь практически здоровыми. Нами было показано, правда на одном-единственном пациенте, имевшем онкологический диагноз, что человек может быть избавлен без помощи медицины от имеющихся у него заболеваний и доживать до 90 лет, оставаясь здоровым. С этим пациентом мы работали 17 лет.

В настоящее время мы работаем в течение 35, 13, 15 и 5 лет с несколькими другими пациентами по предупреждению возрастных заболеваний. В течение указанного срока эти пациенты избавились от имевшихся у них заболеваний и в течение указанного срока более ими не страдали.

Статья посвящена развитию концепций преждевременного старения. Эти концепции мы дополнили двумя своими концепциями, задачей которых является увеличение продолжительности жизни человека, это концепция обратимых физиологических нарушений и концепция патологических цепей развития хронических заболеваний. Концепции основаны на том принципе, что так называемые возрастные заболевания возникают задолго до начала старения и являются результатом накопления дисфункций в физиологических системах организма человека.

**Цель работы.** Разработка стратегии увеличения продолжительности жизни человека

**Материалы и методы.**

В течение 25 лет мы использовали методы оздоровления и продления жизни в рамках Школ здоровья. Через Школы здоровья прошли более 300 человек. Клинические данные получены в диагностических центрах Москвы.

**Результаты.**

**Концепция преждевременного старения по И.И. Мечникову**

Подавляющее большинство людей умирает от болезней, считая, что умирают от возрастных заболеваний, вызванных их старением. Но вспомним изречение Гиппократа, этого величайшего врача всех времен и народов: «Болезнь не сваливается человеку на голову, как гром среди ясного неба. Она является результатом постоянных нарушений законов природы. Постепенно расширяясь и накапливаясь, эти нарушения внезапно прорываются в виде болезни, но сия внезапность только кажущаяся». Это было верным 2000 лет назад, и это правомерно и сейчас.

С открытием микроорганизмов причинами многих болезней стали считать микробов. В организме здорового человека обнаруживают до 400 видов микроорганизмов, среди которых имеются возбудители смертельных заболеваний человека. Когда Кох опубликовал данные о своих открытиях об обнаружении возбудителей холеры, один из выдающихся немецких врачей того времени, профессор Петтенкофер, хотел показать, что Кох ошибся. Вместе со своими ассистентами он выпил стакан жидкости, кишевшей микробами холеры, и никто из них не заболел. Впоследствии Петтенкофер организовал первый в мире Институт Гигиены. На самом деле, Кох не ошибался. Заболевание холеры действительно возникает при попадании возбудителей холеры в организм человека, но в организм ослабленного человека. Сегодня нам известно, что вибрионы холеры выживают в организме человека, если у него пониженная секреция соляной кислоты в желудке.

Но какие факторы в таком случае приводят к смертельным болезням?

Знаменитый на весь мир Илья Ильич Мечников доказывал, что человек страдает и преждевременно умирает от аутоинтоксикации. Патогенные микроорганизмы, живущие в кишечнике, продуцируют токсичные вещества, которые проникают через стенки толстого кишечника и попадают в кровеносную систему, вызывая хроническую интоксикацию. Именно интоксикация, по мнению Мечникова, приводит к развитию ряда хронических заболеваний и к преждевременному старению человека. Мечников доказывал, что больные с болезнями сердца, печени или почек очень чувствительны к задержке пищевых остатков в кишечнике. Приведем несколько высказываний Мечникова по этому поводу.

«Часто одно отклонение от правильной диеты или простой запор вызывают у них серьезные заболевания. Среди чрезвычайно вредных микробных ядов нужно считать масляную

кислоту и продукты гниения белковых веществ, которые образуются главным образом в толстом кишечнике. Общеизвестно, что расстройства часто сопровождаются отделением гнилостных газов (сероводород, болотный газ) и зловонными испражнениями. Роль микробов гниения в этих случаях не вызывает сомнения. С нашей точки зрения, особенно интересны яды бактерий постоянной кишечной флоры, способные вызывать медленное отравление и перерождение органов, соответствующее старости, т.е. склероз артерий мозга, почек, печени и пр.». «Давно уже убедились в том, что запор благоприятствует разложению пищевых остатков в кишках, вследствие этого он и вызывает так часто заболевания.» «Очень вероятно, что, рядом с самоотравлением микробными ядами, во время запоров кишечные микробы непосредственно проникают в кровообращение».

«Итак, несомненно, что кишечные микробы и их яды могут распространяться в организме и вызывать в нем более или менее серьезные повреждения. Отсюда естественный вывод, что чем больше изобилует кишечник микробами, тем более становится он источником зла, сокращающим существование. Из всех частей кишечника толстые кишки всего богаче микробами и развиты всего более у млекопитающих. Поэтому мы вправе предположить, что продолжительность жизни последних значительно сократилась именно вследствие хронического отравления их обильной кишечной флорой».

Концепция преждевременного старения по Мечникову сводится, с одной стороны, к отравлению токсинами кишечной микрофлоры, а, с другой стороны, к проникновению патогенных микроорганизмов из кишечника в ткани внутренних органов. Развитие кишечной микрофлоры на накопленных в тканях метаболитах кишечного происхождения вызывает воспалительные процессы в этих органах. Это могут быть нефрит, воспалительные процессы в печени и воспаление легких.

**Концепция преждевременного старения С.П. Боткина**

Другим человеком, который придерживался концепции преждевременного старения, был знаменитый врач Сергей Петрович Боткин. В своих воззрениях С.П. Боткин исходил из понимания организма как целого, находящегося в неразрывном единстве и связи с окружающей его средой. Эта связь, прежде всего, выражается в форме обмена веществ между организмом и средой, в форме приспособления организма к среде. Центральным ядром клинической концепции Боткина является учение о внутренних механизмах развертывания патологического процесса в организме (учение о патогенезе).

Боткин считал, что первичным звеном развития патологической цепи так называемых возрастных заболеваний является нейротрофический компонент. Наша вегетативная нервная система управляет моторикой, секрецией и обновлением тканей внутренних органов. Последняя сфера деятельности вегетативной нервной системы, а именно, обновление клеточного состава и обеспечение регенеративных процессов называется нервной трофикой или трофической функцией нервной системы.

Первоначально неврогенную теорию патогенеза предложил Федор Иванович Иноземцев (1802—1869), профессор кафедры хирургии Московского университета (1846—1859 гг.). Он говорил, что обмен веществ в клетках и тканях не может совершаться без участия нервной системы: «Кровь без деятельности узловых нервов есть только живой материал в нашем теле, неспособный сам собою совершать физиологические операции в сфере питания».

С.П. Боткин продолжил развитие учения о нервной трофике. Развивая все эти идеи, он создал новое направление в медицине, получившее название "теория нервизма". Главный принцип теории нервизма, развитой Боткиным, состоит в том, что в каждом неинфекционном заболевании имеется нервный компонент, без устранения которого заболевание не может быть полностью излечено.

Сергей Петрович исходил из учения И.М. Сеченова о том, что анатомо-физиологическим субстратом всех актов человеческой деятельности является механизм рефлекса. Развивая эту теорию, он выдвинул положение, что и патологические процессы внутри организма развиваются по рефлекторным нервным путям. Так как в рефлекторном акте главным членом является тот или иной узел ЦНС, то Боткин большое внимание уделял исследованию

различных центров головного мозга. Неврогенная теория патогенеза (процесса развития патологических процессов в организме человека) С.П. Боткина ставит в поле зрения врача не только одни анатомические, но главным образом физиологические или функциональные (через нервную систему) связи организма и, следовательно, обязывает врача рассматривать организм в целом, диагностируя не только болезни, но и проводя «диагностику больного», то есть лечить следует не только болезни, но и больного в целом. В этом коренное отличие клиники Боткина от клиник гуморальной и целлюлярной школы. Развивая все эти идеи, он создал новое направление в медицине, охарактеризованное И.П. Павловым как направление нервизма.

**Современное отношение к концепциям преждевременного старения**

Концепции преждевременного старения, обоснованные Мечниковым и Боткиным, были разработаны 150 лет назад, когда физиология человека делала свои первые шаги. Распространенные случаи долгожительства среди некоторых народов Кавказа, в частности, среди абхазов, уже давно привлекали внимание ученых различных специальностей. Нельзя не вспомнить в этой связи абхазского педагога и ученого-краеведа С.П. Басария, который во время трех экспедиций в 1928 —1930-х годах собрал материалы для описания жизни 18 выдающихся случаев долголетия в Абхазии (от 95 до 150). Мечников в своих трудах рассматривал два варианта старения: естественное и преждевременное и болезненное. Естественное старение изучал советский геронтолог Г.Н. Сичинава. Он в течение многих лет наблюдал за 127 жителями Абхазии в возрасте свыше 100 лет и был свидетелем последних дней их жизни. Некоторые долгожители в возрасте 100 - 115 лет умирают спокойно, предчувствуют приближение смерти, собирают семью, отдают все необходимые распоряжения, укладываются в определённой позе и умирают. Нельзя сказать, что они были здоровы, но их болезни не были причиной смерти.

Каково же состояние проблемы увеличения продолжительности жизни в настоящее время? Исследования научных центров направлены на достижение старения без болезней.

Сегодня уровень физиологии неизмеримо вырос благодаря современным методам исследования. В последнее время снова стал актуален состав микрофлоры кишечника и возможность ее обновления с помощью пробиотиков. У большинства людей присутствие дружественной микрофлоры, а именно: молочнокислых бактерий и бифидобактерий составляет менее 20%, в то время как у долгожителей Абхазии, которым было 90 лет и более, эти бактерии составляли до 90%, а остальные 10% занимали дрожжи. Кокки в кишечнике долгожителей менее многочисленны и принадлежат к Str. Durans, Str. faecium, Str. Faecalis; число их не превышает сотен тысяч клеток в 1 г исследуемого материала, в то время как число лактобактерий составляет десятки миллионов. Влияние токсинов микрофлоры кишечника на развитие патологического старения доказывают эксперименты на лабораторных животных. Применение сорбентов увеличивает среднюю продолжительность жизни на 43%, а максимальную продолжительность на 34%. Применение сорбентов у человека могло бы вызвать увеличение продолжительности его здоровой жизни на 30 лет. Однако радикальное изменение микрофлоры кишечника является серьезной проблемой. Парадоксальным является факт неэффективности изменения состава микрофлоры с помощью пробиотиков (более 50 научных работ, с 2010 г. по настоящее время).

К описанным выше факторам, вызывающим преждевременное старение, добавились еще несколько. Это в первую очередь неврозы и стрессы, недостаток витаминов, незаменимых аминокислот и микроэлементов. Другим фактором старения и проявления преждевременного старения является остеохондроз позвоночника. Фактором преждевременного старения являются также проблемы с суставами. Но самым серьезным фактором остается нарушение нервной трофики. Наконец, имеются часы судного дня или финального этапа жизни. Это нарушение щелочного показателя крови – алкалоз. С возрастом кислотность крови и тканевых жидкостей смещается из щелочного состояния к нейтральному, а затем при переходе в кислотную область жизнь человека прекращается.

Следующим этапом в развитии концепции Боткина стала доктрина академика

Сперанского о нейродистрофических процессах во внутренних органах. В многочисленных экспериментах было доказано, что компрессия симпатических нервов вызывает дистрофические процессы в тканях внутренних органов, а раздражение симпатических нервов провоцирует язвообразование на слизистых оболочках ЖКТ, кровоизлияния и некрозы. Доктрина доказывает, что нарушения состояния симпатической иннервации вызывают все те патологии, которые развиваются при возрастных заболеваниях. После разгрома физиологии висцеральных систем в 1950 г. научные материалы по нервной трофике под названием «Трофическая функция нервной системы» были изъяты из медицинских курсов. Для современных врачей это тайна за семью печатями.

Проблема преждевременного старения не исчезла. Люди по-прежнему не доживают до естественного старения и продолжают умирать от болезней. Нашей задачей является поиск причин сохранения столь значительного разрыва между средней продолжительностью жизни человека в нашей стране, составляющей 73,5 года, и потенциалом продолжительности жизни, составляющим 120 – 140 лет. Таким образом, оба ведущих фактора преждевременного старения сохраняются.

Ключевым вопросом долголетия является связь старения и возрастных заболеваний. Медики однозначно считают, что так называемые возрастные заболевания вызваны старением. Это подтверждает медицинская статистика. Однако ведущие геронтологи считают, что старение и возрастные заболевания - это два независимых процесса. И, наконец, имеется третье мнение. Оно принадлежит И.И. Мечникову. Возрастные хронические заболевания приводят к преждевременному старению человека. Перед нами стоит задача увеличения продолжительности жизни людей на 20 лет, что считается вполне реальным, исходя из воззрений геронтологов, и возможность этого нами уже показана.

**Концепция обратимых физиологических нарушений**

Концепция обратимых физиологических нарушений позволяет предотвращать преждевременное старение.

**Стрессы.** Рядом исследователей убедительно доказано, что эмоциональные стрессы являются одной из ведущих причин артериальной гипертензии, сердечно-сосудистых заболеваний, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

**Микробиота.** По данным Всемирной организации здравоохранения, до 95% жителей земного шара страдают дисбактериозом кишечника. В кишечнике человека в среднем 80% микрофлоры относятся к патогенным и условно патогенным организмам. Они вызывают аутоинтоксикацию, выполняя протеолиз (расщепление белков) и вырабатывая токсины. Полезными микроорганизмами считаются только молочнокислые бактерии и бифидобактерии. Нами было показано, что радикальная смена микрофлоры кишечника устраняет аутоинтоксикацию и спастические состояния мышц, а также посттравматические болевые синдромы.

**Аутоинтоксикация** приводит к нарушению деятельности нервной системы, снижению интенсивности клеточного обновления и регенеративных процессов. Из кишечника по портальной вене в сутки в кровеносную систему поступают более 10 л жидкости, 7 л из которых выводятся из нее в виде соков ЖКТ, 2 л выводятся через почки и до 1 л через легкие и кожу. Кишечный приток жидкости несет в себе токсины, вырабатываемые кишечной микрофлорой. Перегрузка токсинами печени сверх ее способности очищения приводит к ее воспалению и транспорту токсинов в обход печени через анастомозы. Это основной фактор аутоинтоксикации по Мечникову.

**Дефицит незаменимых биокомпонентов**: незаменимых аминокислот, витаминов и микроэлементов приводит к нарушению метаболизма тканей внутренних органов, клеточного обновления.

**Нарушение иннервации** внутренних органов вызывает нейродистрофические процессы во внутренних органах: снижение общего объема клеток, сокращение числа секреторных клеток, отвечающих за синтез ферментов, гормонов, биологически активных веществ, а также происходит нарушение деятельности иммунной системы.

**Спастические состояния** межпозвонковых мышц приводят не только к появлению

болевых синдромов в спине, шее и пояснице, но и остеохондрозу позвоночника – дистрофическим процессам в тканях костной, хрящевой, мышечной, кровеносной и симпатической нервной системы. Остеохондроз позвоночника - это наиболее наглядное проявление преждевременного старения, не требующее доказательств. Компрессия нервов симпатической нервной системы, иннервирующих внутренние органы, вызывает нарушение метаболизма в тканях внутренних органов и подавление их функций. Если раньше радикулит и остеохондроз позвоночника называли «бичом XX века», то теперь эти состояния следует именовать «Дамокловым мечом XXI века» - огромным мечом, подвешенным за один конский волос над головой желающих сидеть на троне и пользоваться всеми мыслимыми благами. «Дамоклов меч» является символом неотвратимой опасности, угрожающей каждому человеку, не заботящемуся о своем здоровье и долголетии. Спастические состояния межпозвонковых мышц обязательно приводят к хроническим заболеваниям и преждевременному старению организма. Остеохондроз позвоночника делает процесс преждевременного старения необратимым.

Наше изучение состояния мышц позвоночника по данным 600 МРТ-исследований показало, что межпозвонковые мышцы могу переходить в спастические состояния и в состояние фиброзного перерождения. Это вызывает, с одной стороны, болевые синдромы в позвоночнике и остеохондроз позвоночника, а с другой стороны, нарушения симпатической иннервации внутренних органов и, как следствие, хронические заболевания. Нами было найдено недостающее звено в теории нервизма. Это компрессия и раздражение симпатических нервов на выходе из позвоночника. Симпатические нервы выходят из позвоночника в составе спинномозговых нервов. Они проходят между мышцами, находящимися в спастическом состоянии. И, так как симпатические нервы лишены прочной миелиновой оболочки, они легко подвергаются компрессии или раздражению продуктами, возникающими при воспалительных процессах в межпозвонковых мышцах.

Наши исследования состояния межпозвонковых мышц, проведенные на группе спортсменов юниоров в возрасте от 12 до 17 лет включительно, показали, что спастические состояния мышц позвоночника возникают уже в подростковом возрасте. Воздействуя на кровеносные сосуды, питающие позвонки, спастические состояния мышц позвоночника вызывают развитие остеохондроза позвоночника уже в подростковом возрасте. Воздействуя на нервы симпатической нервной системы, спастические состояния мышц позвоночника вызывают развитие хронических заболеваний, неустранимых с помощью лекарственных препаратов. Это запускает цепь патологических процессов, приводящих к началу преждевременного старения уже в подростковом возрасте.

Наши многолетние наблюдения показывают, что спастические состояния мышц позвоночника вызваны избыточным потреблением продуктов, содержащих крахмал и сахар при недостатке витамина B1 – тиамина, отвечающего за усвоение углеводов. Это вариант болезни «бери-бери» - полиневрита. Эпидемия болезни «бери-бери» разразилась в юго-восточной Азии в конце XIXвека и уносила ежегодно сотни тысяч жизней. Эпидемия была вызвана употреблением в пищу очищенного от оболочки риса, содержащего 95% крахмала. Главный врач голландских тюремных больниц на острове Ява Кристиан Эйкман обнаружил, что употребление коричневого риса с оболочкой и шелухой приводит к выздоровлению от заболевания. Эйкман задался вопросом: может ли очищенный и неочищенный рис играть роль в возникновении болезни «бери-бери» у людей? Выяснилось, что у заключенных, получавших белый очищенный рис, заболеваемость была в 300 раз выше, чем у тех, кто использовал для приготовления пищи нешлифованный рис.

Вернувшись в Голландию в 1896 году, Эйкман написал отчет о своем опыте. В 1911 году работа Эйкмана случайно попала в руки молодого польского исследователя Казимира Функа. Функ выделил из рисовой шелухи вещество, препятствующее развитию этого заболевания. Это вещество, называемое сейчас тиамином или витамином B1, не содержится в очищенном рисе. Функ ввел для этих веществ термин «витамины» — от латинских слов «вита» (жизнь) и «амин» (азот). Однако первым человеком, кто сказал, что есть продукты, без

которых невозможна жизнь, был Фредерик Хопкинс. В 1929 году Эйкман и Фредерик Хопкинс получили Нобелевскую премию за вклад в открытие витаминов.

После возвращения к питанию неочищенным рисом, в оболочке которого содержался витамин B1, эпидемия прекратилась. В Европе, в отличие от юго-восточной Азии, имеются продукты, содержащие витамин B1, а рис не является основным продуктом питания. Тем не менее, болезнь «бери-бери» встречается и у нас в виде болей в суставах и позвоночнике.

Спастические состояния межпозвонковых мышц возникают также по причине нейротоксинов, вырабатываемых микрофлорой нашего кишечника. На основе наших двадцатилетних наблюдений возникло предположение, что нейротоксины, вызывающие спастические состояния не только в мышцах позвоночника, но и в мышцах суставов конечностей, вырабатываются какими-то видами грибков, возможно, дрожжей, обитающих в кишечнике человека. Радикальная смена резидентной микрофлоры кишечника на молочнокислые бактерии и бифидобактерии устраняет спастические состояния во всей скелетной мускулатуре и предотвращает образование новых спастических состояний мышц [8]. Медики рассматривают боли в суставах как артрит или артроз и предлагают лекарственную терапию. Но стоит радикально изменить состав микрофлоры кишечника, как суставные боли исчезают. Однако для предотвращения проблем с позвоночником необходима также гимнастика для позвоночника, устраняющая уже имеющиеся спастические состояния мышц и предотвращающая возникновение новых спастических состояний, вызванных физическими перегрузками [1-7]. Ещё одним методом восстановления состояния мышц позвоночника является массаж глубоких мышц позвоночника [9]. Проблемы с позвоночником являются главнейшим фактором преждевременного старения человека.

Концепция обратимых физиологических нарушений открывает путь к предотвращению преждевременного старения. И чем в более раннем возрасте начнется работа над предупреждением старении, тем продолжительнее станет жизнь человека.

**Концепция патологических цепей развития хронических заболеваний**

Большинство неинфекционных хронических заболеваний проходит стадию обратимых физиологических нарушений, которые человек может сам отслеживать и устранять, пока эти нарушения не перешли в стадию необратимых нарушений. Эти нарушения выстраиваются в патологическую цепь развития заболевания. Патологическая цепь - это последовательность причинно-следственных связей и патологических процессов, связывающих различные патологические состояния физиологических систем организма человека. Разработанные нами методы позволяют предотвращать хронические заболевания. Прежде всего, это контроль за состоянием межпозвонковых мышц, контроль за кислотностью крови и контроль состояния микрофлоры кишечника. Для действий человека в этом направлении необходимо дополнительное образование в области физиологии. Для этого нами были написаны 2 курса лекций: «Физиология здоровья и долголетия» и «Нейротрофические факторы развития хронических заболеваний. Курс лекций по современным разделам патофизиологии».

**Патологическая цепь гастрита.** Физические и психические перенапряжения – спастические состояния межпозвонковых мышц в области 6 – 8 грудных позвонков – компрессия симпатических нервов, иннервирующих желудок, – остеохондроз позвоночника – нарушение процессов восстановления слизистой оболочки желудка – болевой синдром в желудке – дистрофия слизистой оболочки желудка – уменьшение числа секреторных клеток – атрофический гастрит – снижение секреции соляной кислоты и фермента пепсина – нарушение пищеварения – аутоинтоксикация – повышение кислотности крови и тканевых жидкостей – гипоалкалоз – онкологические заболевания – ацидоз – летальный исход.

**Патологическая цепь язвенной болезни желудка.** Физические и психические перенапряжения – спастические состояния межпозвонковых мышц в области 6 – 8 грудных позвонков – остеохондроз позвоночника – миозит межпозвонковых мышц – раздражение симпатических нервов, иннервирующих желудок, – язвообразование на слизистой желудка – прободение стенки желудка.

**Патологическая цепь заболеваний сердца.** Физические и психические

перенапряжения – спастические состояния межпозвонковых мышц в области 2 – 5 грудных позвонков – компрессия симпатических нервов, иннервирующих сердце, – нарушения работы синусного узла – брадикардия – нарушение работы атриовентрикулярного узла – сердечная недостаточность и тахикардия.

**Патологическая цепь инфаркта миокарда.** Физические и психические перенапряжения – спастические состояния межпозвонковых мышц в области 2 – 5 грудных позвонков - остеохондроз позвоночника – миозит межпозвонковых мышц – раздражение симпатических нервов, иннервирующих коронарные артерии, – спазм коронарных артерий – при наличии значительного гипоалкалоза возникает тромбоз коронарных артерий - инфаркт.

**Патологическая цепь артериальной гипертензии.** Физические и психические перенапряжения – спастические состояния межпозвонковых мышц в области 9 – 11 грудных позвонков – остеохондроз позвоночника – компрессия симпатических нервов, иннервирующих почки, – снижение экскреции воды из кровеносной системы – увеличение объема лимфы в кровеносной системе – повышение артериального давления. Следует помнить, что кровеносная система – это не герметичная система, в которой тонус кровеносных сосудов однозначно определяет артериальное давление. Из кишечника по портальной вене в сутки в кровеносную систему поступают более 10 л жидкости, 7 л из которых выводятся из нее в виде соков ЖКТ, 2 л выводятся через почки и до 1 л через легкие и кожу.

**Патологическая цепь атеросклероза.** Физические и психические перенапряжения – спастические состояния межпозвонковых мышц в области 11 - 12 грудных позвонков остеохондроз позвоночника – компрессия симпатических нервов, иннервирующих тонкий кишечник, – энтероколит – нарушение синтеза хиломикрон в стенке тонкого кишечника - первичных липопротеидов – образование слипшихся хиломикрон большего размера – закупоркаваза вазорум в стенках артерий – инфаркт стенки артерии – некроз среднего слоя артерии, меди, – атака на область некроза тучных клеток - иммунных клеток крови, содержащих гранулы холестерина, – образование атеросклеротической бляшки.

Концепция патологических цепей дает нам возможность понять патогенез хронических заболеваний и обратить патологические процессы вспять.

**Стратегия увеличения продолжительности жизни человека**

В настоящее время геронтология ставит перед собой две задачи по увеличению продолжительности жизни человека.

Первая задача это устранение факторов, сокращающих продолжительность жизни человека. Только очень небольшая часть населения доживает до настоящей старости, под которой мы будем понимать необратимые дистрофические изменения в организме и нарушение функций основных физиологических систем, которые в совокупности приводят к окончанию жизни.

Вторая задача геронтологии это поиск методов замедления старения. Некоторые геронтологи считали, что заниматься замедлением процессов старения не имеет смысла, пока не решена задача по предотвращению заболеваний, сокращающих продолжительность жизни человека. Биологический потенциал продолжительности жизни человека, по мнению ведущих геронтологов, составляет 120 – 140 лет. Стратегия увеличения продолжительности жизни человека сводится к устранению описанных выше факторов преждевременного старения.

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

1. Длительно существующие физиологические нарушения в организме человека приводят к хроническим заболеваниям (концепция патологических цепей). 2. Хронические заболевания, в свою очередь, приводят к преждевременному старению. 3. На ранних стадиях развития патологической цепочки физиологические нарушения обратимы (концепция обратимых физиологических нарушений). Приведены методы, позволяющие устранить нарушения и предотвратить их появление в дальнейшем и, таким образом, увеличить продолжительность жизни человека.

**Литература**

1. Черкасов А.Д. Теория и практика обретения здоровья. Руководство по оздоровлению и предотвращения хронических заболеваний. Издательские решения. По лицензии Ridero. 2017. 456 с.
2. Черкасов А.Д. Комплексная противораковая оздоровительная система. Руководство по предупреждению онкологических заболеваний и реабилитации больных этими заболеваниями. Альтернативные методы исцеления. Издательские решения. По лицензии Ridero. 2017. 402 с.
3. Черкасов Анатолий Данилович. Курс лекций по физиология здоровья и долголетия. Учебное пособие. Издательские решения. По лицензии Ridero. 2018. 426 с.
4. Реальные пути увеличения продолжительности жизни человека. Издательские решения. По лицензии Ridero. 2020. 516 с.
5. Предотвращение остеохондроза позвоночника у подростков. Методические рекомендации для персонала детско-юношеских оздоровительных лагерей. Издательские решения. По лицензии Ridero. 2021. 164 с.
6. Черкасов А.Д. Радикулиты и остеохондрозы. Причины, профилактика и реабилитация. Руководство по оздоровлению. Издательские решения. По лицензии Ridero. 2023. 120 с.
7. Черкасов А.Д. Нейротрофические факторы развития хронических заболеваний. Курс лекций по современные разделы патофизиологии. Издательские решения. По лицензии Ridero. 2024. 261 с.
8. Черкасов А.Д. Секреты долголетия или как дожить до 120 лет, оставаясь здоровым. В печати.
9. URL: http://www.healthsys.ru. (дата обращения: 15.02.2023).

**Сведения об авторах**

***Черкасов Анатолий Данилович***
*Кандидат биологических наук, к.б.н., с.н.с., Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: healthsys@mail.ru*

***Петрова Елена Николаевна***
*к.ф-м.н., с.н.с., Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: petrova@iitp.ru*

**Information about author**

***Cherkasov Anatoliy Danilovich***
*Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology.*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: healthsys@mail.ru*

***Cherkasov Anatoliy Danilovich***
*Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology.*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: petrova@iitp.ru*

УДК 611.4
ГРНТИ 76.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.68-72

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

# ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПОСТЕПЕННОМ УВЕЛИЧЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ

*Изучено влияние постепенного увеличения содержания дейтерия в организме на изменения функциональной активности щитовидной железы. Установлено, что происходит увеличение синтеза гормонов щитовидной железы с последующим развитием временной гипофизарной дисфункции и нормализации продукции гормонов на фоне постепенного увеличения продукции Na+/I-симпортера.*
***Ключевые слова:*** *дейтерий, эндокринная система, щитовидная железа, гормоны*

**N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin**
A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”

# CHANGES IN FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE THYROID GLAND ASSOCIATED WITH GRADUAL INCREASE IN DEUTERIUM BODY CONTENT

*Changes of functional activity of the thyroid gland associated with a gradual increase in deuterium content was studied. An increase in the synthesis of thyroid hormones with further pineal disfunction and later normalizing of thyroid hormone production was found. A gradual increase in the production of Na+/I-symporter followed all the changes in thyroid profile.*
***Key words:*** *deuterium, endocrine system, thyroid gland, hormones*

## Введение

Роль стабильных изотопов основных биогенных элементов, до сих пор мало изучена и является перспективным направлением биофизических, биохимических, молекулярных, генетических и других исследований. Водород имеет два стабильных изотопа: дейтерий и протий. Наличие большого количества дейтерия в живых организмах хорошо известно [1,2]. Однако роль дейтерия в метаболизме до конца не изучена и требует обширных исследований. Сдвиги в содержании дейтерия в организме влияют на метаболические процессы и изменяют физиологию органов, а развитие этих изменений зависит от времени и амплитуды дисбаланса дейтерия/протия [3, 4]. Следовательно, сдвиг изотопного баланса может приводить к изменениям физиологии эндокринных желез.

Наименее изученной областью исследований щитовидной железы является влияние стабильных изотопов биогенных атомов на секрецию и функцию гормонов щитовидной железы и её ион-транспортирующих каналов. Известно, что функция щитовидной железы зависит в первую очередь от поступления йода [5]. Поглощение йода опосредовано Na+/I-симпортером (НЙС), белком, расположенным в базолатеральных мембранах фолликулярных клеток щитовидной железы. Таким образом, выяснение роли содержания дейтерия в функционировании гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси могло бы также раскрыть некоторые механизмы предотвращения или коррекции дисфункции щитовидной железы. Цель настоящего исследования — оценить динамику секреции тиреоидных гормонов и гипофизарного тиреотропного гормона при постепенном увеличении содержания дейтерия в организме, а также оценить возможную роль Na+/I-симпортера (НЙС), в изменении функции щитовидной железы.

**Материалы и методы**

Эксперимент выполнен на самцах крыс линии Вистар 350-360 кг (n=20) (НЦ биомедицинских технологий ФМБА России, г. Пущино). Крысы были рандомизированы на две группы. Контрольная группа (n=10) потребляла водопроводную воду с нормальным содержанием дейтерия (146 ppm), экспериментальная группа (n=10) - обогащенную дейтерием воду с [D]=500000 ppm в течение на 21-го дня. Забор венозной крови и взвешивание проводили под золетиловым наркозом в 10-11 часов утра накануне эксперимента, а также на 1-е, 3-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки. После инкубации при комнатной температуре кровь центрифугировали и собирали сыворотку. Общее изменение массы тела рассчитывали на 21-е сутки. Объем потребляемой воды измеряли ежедневно в 1-й и 3-й сроки, затем каждые 3 дня в 7-й, 14-й и 21-й сроки. Рассчитывали количество потребляемой воды на 1 кг массы тела.

В сыворотке крови с помощью наборов ИФА определяли концентрацию общего (Т4) и свободного тироксина (сТ4), общего (Т3) и свободного трийодтиронина (сТ3) (Cusabio, Ухань, Китай), тиреотропного гормона (BioVendor, Брно, Чехия) и НЙС (Fine тест, Ухань, Китай). Статистический анализ проводился с использованием программного пакета «Statistica 7.0» (StatSoft, Талса, Оклахома, США). Нормальность распределения была подтверждена критерием Шапиро-Уилка. Центральная тенденция и дисперсия количественных признаков с примерно нормальным распределением были представлены как среднее значение и стандартное отклонение (M±м). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

**Полученные результаты**

Поскольку в исследование были включены молодые крысы постпубертатного возраста, в конце эксперимента наблюдался физиологический прирост массы тела. У крыс контрольной группы к 21-му дню наблюдалось увеличение массы тела на 38%. У крыс, потреблявших обогащенную дейтерием воду, наблюдался незначительный прирост массы тела – 9,7%, а их масса на 21-й день эксперимента была значительно меньше, чем в контрольной группе.

Через 1 сутки у крыс опытной группы уровень Т4 был повышен, тогда как концентрация сТ4 находилась в диапазоне контрольных значений. Изменения концентрации Т3 были аналогичными, а снижение его свободной фракции было более выраженным. ТТГ также был снижен по сравнению с контролем.

На 3-и сутки эксперимента отмечалось увеличение продукции Т4 и Т3, а также их свободных фракций. Концентрации этих гормонов значительно превышали значения контрольной группы. Уровень ТТГ также был выше, чем в предыдущем сроке исследования, но был ниже, чем в контрольной группе и группе.

Через 7 суток у крыс, потреблявших обогащенную дейтерием воду, концентрация Т4 и сТ4 не отличалась от контрольных значений. При этом уровень сТ3 не изменился по сравнению с 3-м днем и не уже отличался от контрольных значений. Уровень ТТГ также был ниже контрольных значений

На 14-е сутки исследования концентрация Т4 соответствовала контрольным значениям, а уровень Т3 был незначительно ниже. Концентрация сТ4 была значительно ниже, чем в контроле, а сТ3 превышали контрольные значения. Уровень ТТГ также был значительно снижен.

Оценка уровней НЙС в сыворотке крови выявила значительное повышение уровня уже с первого дня у крыс, которые потребляли воду, обогащенную дейтерием. В дальнейшем продолжало постепенное увеличение НЙС. Общее увеличение концентрации НЙС с 0 по 21 день составило 60%.

Исследование физиологических показателей не выявило существенных различий в суточном потреблении воды с модифицированным содержанием дейтерия. Оценка прироста массы тела и потребления воды показала, что у крыс, потреблявших обогащенную дейтерием воду, увеличение массы тела по сравнению с контролем было незначительным. Эти факты согласуются с имеющимися данными о негативном влиянии высоких концентраций $D_2O$ на

клеточный метаболизм и пролиферацию [6,7]. Таким образом, у крыс, потреблявших воду, обогащенную дейтерием, возник фактор, который мог повлиять на нормальную физиологию эндокринной системы или быть вызван эндокринной, в том числе щитовидной, дисфункцией.

Изменения в профилях гормонов щитовидной железы, обнаруженные после 1-го дня эксперимента, свидетельствуют о чувствительности щитовидной железы к изменениям содержания дейтерия. Важно отметить, что для дейтерирования биополимеров требуется определённое время [8], а это означает, что интенсивность секреции гормонов щитовидной железы связана с изменением градиента дейтерия в крови/тканях. Ранние изменения уровней гормонов щитовидной железы соответствовали ранее опубликованным данным об активации выработки гормонов щитовидной железы после 24 часов потребления обогащенной дейтерием воды [9]. Возвращение к нормальному уровню продукции тиреоидных гормонов было опосредовано адекватной реакцией гипофиза на избыток тиреоидных гормонов. Это указывает на то, что изменения в поставках дейтерия не влияют на отрицательную обратную связь между синтезом ТТГ и гормонов щитовидной железы. На 7-й день эксперимента мы обнаружили начальные признаки гипофизарной дисфункции. Было выявлено неадекватное снижение продукции ТТГ после дейтерирования. Это предполагает поражение клеток гипоталамуса или гипофиза. На 14-е сутки мы наблюдали типичные для вторичного гипотиреоза профили щитовидной железы. Изменения в гипоталамо-гипофизарном комплексе было транзиторным, и уже через 21 сутки в экспериментальной группе наблюдались изменения, свидетельствующие о восстановлении активности гипофиза и отрицательной обратной связи на тиреоидные гормоны. Низкая скорость восстановления функции щитовидной железы, вероятно, могла быть следствием возрастающей токсичности 50% $D_2O$. Это означает, что ось гипоталамо-гипофиз-щитовидная железа чувствительна к сдвигам баланса дейтерия и протия.

50% раствор $D_2O$ является мощным источником дейтерия, а его употребление в течение 3 недель обеспечивает значительное дейтерирование организма. Однако снижения концентрации йодированных тиронинов в сыворотке крови к 21-му дню нами не выявлено, несмотря на то, что негативное последствие дейтерирования - замедление прироста массы тела - проявляется ярко. Полученные данные свидетельствуют о том, что сдвиги в содержании дейтериевой воды создают градиент изотопов водорода между клетками и внутренней средой, а затем между цитозолем и органеллами, что влияет на секреторный процесс в клетках щитовидной железы.

Хорошо известно, что функция щитовидной железы зависит от поступления йода. Транспорт йодида от которого зависит функция щитовидной железы опосредуется НЙС — белком, расположенным на базолатеральных мембранах клеток щитовидной железы, а также клетках слюнных желез, слизистой оболочки желудка и клетках почек [11]. Снижение уровня НЙС в крови обычно связано со снижением выработки гормонов щитовидной железы, а восстановление экспрессии НЙС положительно влияет на активность щитовидной железы [12]. Однако, мы не обнаружили никакой связи с изменениями концентрации гормонов щитовидной железы. Более того, НЙС не коррелировал с ТТГ, основным положительным регулятором экспрессии НЙС [13]. Мы наблюдали четкие различия в уровнях НЙС между экспериментальными группами. Длительное употребление воды, обогащенной дейтерием, вызывало постепенное повышение уровня НЙС в сыворотке крови. Возможно, это связано с изменением транспортной активности йодидных каналов. Известно, что дейтерирование клеток замедляет скорость переносчиков ионов, ингибирует активность АТФ-синтазы и снижает продукцию АТФ [14]. Уменьшение содержания дейтерия не влияет на параметры продукции НЙС [15]. Таким образом, повышение уровня НЙС у крыс, потребляющих воду, обогащенную дейтерием, можно рассматривать как компенсаторный процесс и отражать изменения, вызванные градиентом крови/тканей и энергетически-связанным снижением эффективности НЙС.

**Выводы**

Увеличение содержания дейтерия стимулировало секрецию гормонов щитовидной железой. В дальнейшем происходила нормализация продукции гормонов, но более длительное потребление воды с повышенным содержанием дейтерия приводило к гипофункции

гипофиза. Эти изменения носили временный характер.

Дейтерирование приводило к длительному увеличению продукции Na+/I-симпортера, что с учетом разносторонних изменений продукции тиреоидных гормонов не позволяет его считать единственным механизмом изменения активности щитовидной железы.

**Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: результаты исследования демонстрируют взаимозависимость продукции гормонов щитовидной железы и содержания дейтерия и открывают новое направление в изучении влияния стабильных изотопов на физиологию эндокринных желез.

***Работа выполнена по государственному заданию рег. номер № FGFZ-2022-0035.***

**Литература**

1. Podlesak, D.W.; Torregrossa, A.-M.; Ehleringer, J.R.; Dearing, M.D.; Passey, B.H.; Cerling, T.E. Turnover of oxygen and hy-drogen isotopes in the body water, CO2, hair, and enamel of a small mammal. Geochim. Cosmochim. Acta 2008, 72, 19–35.
2. Shchepinov, M.S. Do “heavy’ eatersagive longer? Bioessays 2007, 29, 1247-1256.
3. 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, 19, 1790-1804.
4. Yaglova, N.V.; Obernikhin, S.S.; Yaglov, V.V.; Nazimova, S.V. Time-dependent effect of deuterium depletion on tumor growth and metastasis. RusOMJ 2020, 9, e0210.
5. Hatch-McChesney A., Lieberman, H.R. Iodine and Iodine Deficiency: A Comprehensive Review of a Re-Emerging Issue. Nutrients 2022, 14, 3474.
6. Mosin, O.; Shvets, V.; Skladnev, D.; Ignatov, I. Studying of microbic synthesis of deuteriumlabelled l-phenylalanine by me-thylotrophic bacterium brevibacterium methylicum on media with differeny content of heavy water. Russ. J. Biopharmaceut. 2012, 4, 11–22.
7. Li, X.; Snyder, M. Can heavy isotopes increase lifespan? Studies of relative abundance in various organisms reveal chemical perspectives on aging. Bioessays 2016, 38, 1093-1101.
8. Kosenkov, A.V.; Gulyaev, M.V.; Lobyshev, V.I.; Yusubalieva, G.M.; Baklaushev, V.P. The reversible effect of deuteration on tissue fluid and biopolymers in normal and tumor tissues of mice. Biophysics (Russian Federation) 2018, 63, 820-824.
9. Yaglova, N.V.; Obernikhin, S.S.; Timokhina, E.P.; Yaglov, V.V. Response of Pituitary-Thyroid Axis to a Short-Term Shift in Deuterium Content in the Body. Bull. Exp. Biol. Med. 2021, 171, 262–264.
10. Yaglova NV, Obernikhin SS, Timokhina EP, Yaglov VV, Tsomartova DA, Nazimova SV, Tsomartova ES, Ivanova MY, Chereshneva EV, Lomanovskaya TA. Bilateral Shifts in Deuterium Supply Similarly Change Physiology of the Pituitary-Thyroid Axis, but Differentially Influence Na+/I- Symporter Production. Int J Mol Sci. 2023 Apr 6;24(7):6803.
11. Carrasco, N. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. Endocr. Rev. 2003, 24, 48–77.
12. Yaglova, N.V.Yaglov V.V. Mechanisms of Disruptive Action of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on the Function of Thyroid Follicular Epitheliocytes. Bull. Exp. Biol. Med. 2015, 160, 231–233.
13. Pesce, L.; Kopp, P. Iodide transport: implications for health and disease. Int. J. Pediatr. Endocrinol. 2014, 2014(1), 8.
14. Olgun, A. Biological effects of deuteronation: ATP synthase as an example. Theor Biol Med Model. 2007, 22, 4-9. doi: 10.1186/1742-4682-4-9 74.
15. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Obernikhin S.S., Yaglov V.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 3107.

**Сведения об авторах**

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

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

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

**Information about author**

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

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

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

УДК 577.152.191
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.73-77

**А.Ф. Топунов[1], О.В. Космачевская[1], О.Е. Багрова[1,2]**
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук,
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНОВ

*Рассмотрены ферментативные системы, поддерживающие гемоглобины в активном восстановленном состоянии. Наличие таких систем является обязательным для функционирования всех гемоглобинов. Это могут быть специальные метгемоглобинредуктазы; редуктазные домены, связанные с молекулой глобина, а также неспециализированные редуктазы, для которых восстановление гемоглобина является одной из возможных функций.*
***Ключевые слова:*** *гемоглобин, легоглобин, метгемоглобинредуктаза, метлегоглобинредуктаза, цитохром $b_5$ редуктаза, флавогемоглобин, метгемоглобинемия*

**A.F. Topunov[1], O.V. Kosmachevskaya[1], O.E. Bagrova[1,2]**
[1]Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[2]Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

## ENZYMATIC SYSTEMS FOR REDUCTION OF HEMOGLOBINS

*The view on the reductase systems supporting hemoglobin in physiologically active reduced state is providing. The existence of such reductase systems is essential for functioning of all hemoglobins. They can be special reductases, reductase domains, connected with globin molecule, and reductases of wide spectrum of activitie for which reduction of hemoglobin is one of possible functions.*
***Keywords****: hemoglobin, leghemoglobin, methemoglobin reductase, metleghemoglobin reductase, cytochrome $b_5$ reductase, flavohemoglobin, methemoglobinemia.*

### Введение

Гемоглобины (Hb) могут выполнять свои функции связывания и переноса кислорода, как и других гемовых лигандов, только в физиологически активном восстановленном состоянии, когда железо в геме двухвалентно. А поскольку в живых системах действуют разнообразные окислители, необходимы системы, восстанавливающие такие белки, в первую очередь ферментативные. Большой интерес представляет сравнение свойств ферментов, восстанавливающих различные кислородпереносящие гемопротеиды. В 1989 году [1] мы предложили таблицу сравнения свойств таких ферментов, однако за это время появились новые данные как по гемоглобинам, так и по восстанавливающим их ферментам - метгемоглобинредуктазам (мет-НЬ-редуктазам).

### Цель работы

Провести обзор известных к настоящему времени ферментативных систем, восстанавливающих гемоглобины различной природы и функционирующие в различных организмах.

### Материалы и методы

На основании имеющихся данных по ферментам, восстанавливающим различные кислородпереносящие гемопротеиды, было проведено сравнение их свойств и распространения в различных царствах живой природы.

### Полученные результаты

Исследование процесса ферментативного восстановления Hb началось с изучения метгемоглобинемии, заболевания, при котором значительная часть Hb находится в окисленном состоянии и не способна переносить кислород. Метгемоглобинемия может быть наследственной, или вызванной действием некоторых химических соединений. При наследственной метгемоглобинемии организм не синтезирует или синтезирует недостаточно фермента − редуктазы, восстанавливающей Hb.

В то время, как для гемоглобина крови такая редуктаза известна давно [2], ферменты, восстанавливающие миоглобин (Mb) [3] и легоглобин (леггемоглобин, Lb) – симбиотический кислородсвязывающий гемопротеид клубеньков бобовых [4], были описаны намного позже. Важнейшую роль в восстановлении Hb играет NADH-зависимая метгемоглобинредуктаза (мет-Hb-редуктазы) [6]. Показано, что эта метгемоглобинредуктаза и цитохром $b_5$-редуктаза представляют собой один и тот же фермент − NADH: феррицитохром $b_5$-оксидоредуктазу (КФ 1.6.2.2) [5], при этом в эритроцитах цитохром $b_5$ является переносчиком электронов на Hb [6]. Показано, что метмиоглобинредуктаза также является цитохром $b_5$-редуктазой [7].

Первая обзорная статья, описывающая наши работы по ферментативному восстановлению Lb люпина, была опубликована в 1982 году [8]. В дальнейшем аналогичные исследования были выполнены и для Lb других бобовых растений, показано наличие двух типов мет-Lb-редуктаз, ферменты обоих типов были клонированы [9, 10]. Ферменты, восстанавливающие Lb, внесены в номенклатуру ферментов под одним номером (КФ 1.6.2.6) с названием: NAD(P)H: феррилеггемоглобин оксидоредуктаза. Что касается восстановления несимбиотических растительных Hb, то здесь есть разные мнения. Игамбердиев с соавт. предположили, что редуктазной системой для них может быть аскорбат/монодегидроаскорбатредуктаза [11]. В то же время было показано, что феррилеггемоглобинредуктаза 2 сои способна восстанавливать несимбиотический Hb риса [12].

Очень интересен вопрос о восстановлении бактериальных Hb. Присутствие таких редуктаз было впервые показано нами в клубеньковых бактериях *Rhizobium lupini* (теперь *Bradyrhizobium lupini*) [13], впоследствии этот фермент был выделен и очищен [14]. Мет-Hb-редуктаза была обнаружена и у бактерии *Vitreoscilla* [15], из которой ранее был выделен первый бактериальный Hb (VtHb). Она также оказалась NADH-зависимой FAD-содержащей оксидоредуктазой. Функционирование таких ферментов в бактериях может быть объяснением того факта, что как бактериальные Hb, так и эукариотические Hb, экспрессированные в прокариотах, присутствуют там в физиологически активном восстановленном состоянии.

Особо стоит отметить такую группу Hb, как флавогемоглобины, обнаруженных сначала в дрожжах [16], а потом и в прокариотах [17]. Они содержат два принципиально разных домена: глобиновый, аналогичный другим Hb, и редуктазный, аналогичный флавиновым оксидоредуктазам, причем он гомологичен цитохром $b_5$-редуктазе [17], которая в эритроцитах выполняет функцию метгемоглобинредуктаы. Основной функцией бактериальных флавогемоглобинов является NO-диоксигеназная реакция, которую они выполняют благодаря редуктазам, ассоциированным с глобиновым доменом [18]. То есть в данном случае мы имеем белок, соединенный в одной молекуле со своей собственной редуктазой.

Таким образом, для всех гемоглобинов обязательным является наличие редуктазных систем, поддерживающих их в физиологически активном состоянии. Это могут быть как специальные редуктазы, так и редуктазные домены, соединенные с глобиновыми доменами в одной молекуле, а также редуктазы широкого спектра действия, для которых восстановление гемоглобинов является одной из возможных функций. Рассматривая как полученные нами, так и литературные данные, можно сделать заключение, что ферменты, восстанавливающие кислородсвязывающие гемопротеиды, являются, как правило, NADH-зависимыми FAD-содержащими оксидоредуктазами. Многие их них восстанавливают гемоглобины через цитохром $b_5$ как промежуточный переносчик электронов. Поэтому при поиске ферментов, восстанавливающих «новые» гемоглобины, необходимо в первую очередь проводить поиск среди подобных редуктаз.

По некоторым свойствам редуктазы, восстанавливающие гемоглобины, проявляют большое сходство, что интересно с эволюционной точки зрения, так как эти ферменты функционируют в организмах, далеко разошедшихся в процессе эволюции. В то же время в некоторых случаях наблюдаются и существенные различия между такими ферментами. В связи с этим интересен вопрос о происхождении систем ферментативного восстановления кислородпереносящих гемопротеидов, их сходстве и различиях. Он требует дальнейших кропотливых исследований.

Определенную роль в восстановлении кислородпереносящих гемопротеидов могут играть и другие процессы. Однако, по нашему мнению, основную роль играют ферментативные системы с участием соответствующих редуктаз. В связи с этим вероятно, что число организмов, у которых содержатся аналогичные системы, может быть значительно увеличено при расширении списка объектов исследований. Это имеет большой теоретический и практический интерес, так как кислородпереносящие гемопротеиды являются важнейшими для жизнедеятельности организмов белками.

Как ни странно, несмотря на активное изучение таких «новых» и потенциально важных Hb, как нейроглобин в нервных клетках, цитоглобин в различных тканях и андроглобин в мужских гонадах, пока не проводилось серьезных работ по ферментативному восстановлению этих белков. Мы полагаем, что, поскольку цитохром $b_5$-редуктаза присутствует во многих тканях организма, то в первую очередь необходимо проверить возможность её функционирования для восстановления и этих гемоглобинов. То же относится и к поддержанию в восстановленном состоянии миоглобина в опухолевых клетках, где, как выяснилось, он также может синтезироваться. Пока не выяснен вопрос и с восстановлением усеченных гемоглобинов, также содержащихся во многих прокариотах.

Укажем на еще одно возможное поле для исследований в данной области. В настоящее время активно изучаются процессы модификации гемоглобинов, в том числе под действием окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов [19], которые могут происходить как при многих заболеваниях, так и при старении. Образующиеся в этих случаях модифицированные гемоглобины (гликозилированный, нитро- и нитрозо-Hb, а также Hb в состоянии гемихрома) по-другому подвергаются процессам окисления и восстановления, однако и этот факт изучен крайне слабо.

**Выводы**

Для функционирования всех Hb необходимы редуктазные системы, поддерживающие их в физиологически активном состоянии. По некоторым свойствам ферменты-восстановители Hb проявляют большое сходство, что представляет интерес с эволюционной точки зрения, так как ферменты функционируют в организмах, далеко разошедшихся в процессе эволюции. Вопрос о происхождении систем ферментативного восстановления кислородпереносящих гемопротеидов, их сходстве и различиях, требует дальнейших исследований.

**Заключение**

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

Большинство из описанных к настоящему времени метгемоглобинредуктаз являются FAD-содержащими NADH-зависимыми оксидоредуктазами. В то же время для некоторых гемоглобинов пока неизвестны восстанавливающие их редуктазы. К таковым относятся многие «экзотические» Hb: пентакоординированные и усеченные. Поиск таких систем ферментативного восстановления является важной задачей для исследователей.

**Литература**

1. Топунов А.Ф., Голубева Л.И. Редуктазы, восстанавливающие кислородпереносящие гемопротеиды: гемоглобин, миоглобин и легоглобин. // Успехи биологической химии. 1989. Т.30. С.239-252.
2. Scott E.M., Griffith I.V. The enzymatic defect of hereditary methemoglobineinia: diaphorase. // Biochim. Biophys. Acta. 1959. V. 34. № 2. P. 584-586.
3. Hagler L., Coppes R.L., Herman R.H. Identification and purification of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent ensyme from bovine heart which reduces metmyoglobin. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 14. P. 6505-6514.
4. Топунов А.Ф., Мелик-Саркисян С.С., Лысенко Л.А., Карпиленко Г.П., Кретович В.Л. Метлегоглобинредуктаза клубеньков люпина. Некоторые свойства. // Биохимия. 1980. Т. 45. № 11. С. 2053-2058.
5. Kuma F., Prough R.A., Masters B.S.S. Studies on methemoglobin reductase. Immunochemical similarity of soluble methemoglobin reductase and cytochrome $b_5$ of human erythrocytes

with NADH-cytochrome $b_5$ reductase and cytochrome $b_5$ of rat liver microsomes. // Arch. Biochem. Biophys. 1976. V. 172. № 2. P. 600-607.
6. Hultquist D.E., Passon P.G. Catalysis of methemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome $b_5$ and cytochrome b5 reductase. // Nature New Biology. 1971. V. 229. № 8. P. 252-254.
7. Livingston D.J., McLachlan S.J., La Mar G.M., Brown W.D. Myoglobin: cytochrome $b_5$ interactions and the kinetic mechanism of metmyoglobin reductase. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 29. P. 15699-15707.
8. Kretovich W.L., Melik-Sarkissyan S.S., Bashirova N.F., Topunov A.F. Enzymatic reduction of leghemoglobin in lupin nodules. // J. Appl. Biochem. 1982. V.4. № 2. P.209-217.
9. Ji L., Becana M., Sarath G., Klucas R.V. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding ferric leghemoglobin reductase from soybean nodules. // Plant Physiol. 1994. V. 104. P. 453-459.
10. Moran J. F., Sun Z., Sarath G., Arredondo-Peter R., James E.K., Becana M.,Klucas R.V. Molecular cloning, functional characterization, and subcellular localization of soybean nodule dihydrolipoamide reductase. // Plant Physiol. 2002. V. 128. P. 300-313.
11. Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Hill R.D. Scavenging of nitric oxide by barley hemoglobin is facilitated by a monodehydroascorbate reductase mediated ascorbate reduction of methemoglobin. // Planta. 2006. V. 223. № 5. P. 1033-1040.
12. Gopalasubramaniam S.K., Kondapalli K.C., Millán-Pacheco C., Pastor N., Stemmler T.L., Moran J.F., Arredondo-Peter R. Soybean dihydrolipoamide dehydrogenase (ferric leghemoglobin reductase 2) interacts with and reduces ferric rice non-symbiotic hemoglobin 1. // ScienceJet. 2013. V. 2. e33.
13. Топунов А.Ф., Талызин В.В., Чекасина Е.В., Кретович В.Л. Метлегоглобинредуктазная активность бактерий Rhizobium, выращенных в свободной культуре. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 296. № 6. С. 1501-1504.
14. Talyzin V.V., Bashirova N. F., Kosmachevskaya O.V., Punina N.V., Arabova L.I., Tikhomirova N.V., Topunov A.F. Methemoglobin reductase of bacteria and bacteroids Bradyrhizobium lupini: purification and properties. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 1. P. 26-33.
15. Jakob W., Webster D.A., Kroneck P.M. NADH-dependent methemoglobin reductase from the obligate aerobe Vitreoscilla: improved method of purification and examination of prostetic groups.// Arch. Biochem. Biophys. 1992. V. 292. № 1. P. 29-33.
16. Oshino R., Asakura T., Tamura M., Oshino N., Chance B. Yeast hernoglobin-reductase complex. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1972. V. 46. № 3. P. 1055-1060.
17. Ermler U., Siddiqui R.A., Cramm R., Friedrich B. Crystal structure of the flavohemoglobin from Alcaligenes eutrophus at 1.75 Å resolution. // EMBO J. 1995. V. 14. № 24. P. 6067-6077.
18. Gardner P.R. Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases. // J. Inorg. Biochem. 2005. V. 99. № 1. P. 247-266.
19. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. // Clin. Chem. Lab. Med. 2014. V. 52. № 1. P. 161-168.

**Сведения об авторах**
***Алексей Федорович Топунов***
*д-р биол. наук, профессор,*
*зав. лабораторией*
*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*
*Эл. почта*: aftopunov@yandex.ru

**Information about authors**
***Alexey Fedorovich Topunov***
*Doctor of Science (Biol.), Professor,*
*Head of Laboratory,*
*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Moscow, Russia*
*E-mail:* aftopunov@yandex.ru

***Ольга Владимировна Космачевская***
*канд. биол. наук, ст. науч. сотр.*
*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: rizobium@yandex.ru*
***Ольга Евгеньевна Багрова***
*мл. науч. сотр.*
*Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия;*
*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: o-bagrova@mail.ru*

***Olga Vladimirovna Kosmachevskaya***
*PhD (Biol.), Senior Research Scientist*
*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology,*
*Moscow, Russia*
*E-mail: rizobium@yandex.ru*
***Olga Evgenievna Bagrova***,
*Junior Research Scientist*
*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Moscow, Russia;*
*Lomonosov Moscow State University,*
*Moscow, Russia*
*E-mail:o-bagrova@mail.ru*

УДК 577.121:577.112.3
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.77-81

**Э.И. Насыбуллина**[1], **Хвесько К.В.**[1,2], **О.В. Космачевская**[1],
**К.Б. Шумаев**[1], **А.Ф. Топунов**[1]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
[2]Московский политехнический университет,

## АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРНОЗИНА И ЕГО ЖЕЛЕЗОНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В СИСТЕМАХ ОКИСЛЕНИЯ МИОГЛОБИНА И АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ

*Карнозин и карнозиновые динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) эффективно ингибируют образование свободнорадикальных интермедиатов, образующихся при окислении миоглобина, а также снижают образование диеновых конъюгатов, возникающих в ходе перекисного окисления арахидоновой кислоты. Карнозиновые ДНКЖ являются более эффективными антиоксидантами, чем карнозин.*
***Ключевые слова:*** *карнозин, динитрозильные комплексы железа, миоглобин, арахидоновая кислота, перекисное окисление, окислительная модификация, гидропероксид трет-бутила*

**E.I. Nasybullina**[1], **K.V. Khvesko**[1,2], **O.V. Kosmachevskaya**[1],
**K.B. Shumaev**[1], **A.F. Topunov**[1]
[1]Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[2]Moscow Polytechnic University, Moscow, Russia

## ANTIOXIDANT EFFECT OF CARNOSINE AND ITS NITROSYL IRON COMPLEXES IN MYOGLOBIN AND ARACHIDONIC ACID OXIDATION SYSTEMS

*Carnosine and carnosine dinitrosyl iron complexes (DNICs) effectively inhibit the formation of free radical intermediates formed during myoglobin oxidation, and also reduced the formation of diene conjugates arising during peroxidation of arachidonic acid. At the same time, antioxidant effect of carnosine DNICs was higher than that of carnosine.*
***Keywords:*** *carnosine, dinitrosyl iron complexes, myoglobin, arachidonic acid, peroxidation, oxidative modification, tert-butyl hydroperoxide*

### Введение

Карнозин (β-аланил-L-гистидин) – наиболее хорошо изученный гистидиновый дипептид, который синтезируется у многих позвоночных организмов. Карнозин в высоких концентрациях содержится в сердечных и скелетных мышцах. Этот дипептид является хорошим хелатором ионов железа, меди и цинка, удаляет активные формы кислорода и азота, образует

аддукты с токсичными электрофильными α,β-ненасыщенными альдегидами [1-3]. Благодаря этим свойствам карнозин может защищать клетки от окислительного повреждения и замедлять их старение [4]. В настоящее время на основе карнозина производят биологически активные добавки для повышения работоспособности при физических нагрузках, замедления старения, иммуномодуляции, а также для лечения/профилактики диабета и неврологических расстройств [2, 4, 5].

В настоящее время ведутся исследования по созданию на основе карнозина соединений, которые совмещают полезную функцию пептида и конъюгирующего фрагмента. К таким соединениям относят аналоги карнозина, содержащие NO-донорные субструктуры. В качестве примера можно привести NO-донорные карнозинамиды, полученные введением одной или двух NO-донорных нитрооксигрупп в боковую цепь амидного азота [6]. Эти соединения продемонстрировали антиоксидантную активность *in vitro* и защиту от ишемии/реперфузии *in vivo*, а также вазодилатационное действие на фрагментах аорты крысы [6].

К NO-донорным производным карнозина можно отнести динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), в которых дипептид является лигандом. Карнозиновые ДНКЖ ранее были получены нами [7, 8].

**Цель работы**

Изучить антиоксидантное и антирадикальное действие карнозиновых ДНКЖ в системах, моделирующих окисление миоглобина (Mb) и ненасыщенной жирной кислоты.

**Материалы и методы**

Образование свободнорадикальных интермедиатов в реакции миоглобина с гидропероксидом трет-бутила (t-BOOH) оценивали методом хемилюминесценции, используя в качестве активатора люминол. Регистрацию хемилюминесценции осуществляли на хемилюминесцентном анализаторе Lum-5773 (Россия) при постоянном перемешивании и термостатировании при 37 °C.

Диеновые конъюгаты – первичные продукты окисления арахидоновой кислоты, индуцированного реакцией Mb с t-BOOH, измеряли по величине оптического поглощения при 234 нм на спектрофотометре Cary 300 Bio (США).

**Полученные результаты**

Антирадикальное действие карнозина и карнозиновых ДНКЖ изучали в системе окисления миоглобина гидропероксидом трет-бутила (metMb − t-BOOH). Карнозин добавляли к реакционной смеси в двух концентрациях 0,1 и 1 мМ, карнозиновые ДНКЖ − 0,05 и 0,5 мМ, поскольку в состав ДНКЖ входит две молекулы карнозина. Оба соединения в значительной степени снижали продукцию свободных радикалов в исследуемой системе. Причем антирадикальный эффект ДНКЖ превосходил таковой карнозина. На это указывает снижение максимума выхода хемилюминесценции в присутствии комплексов и смещение кинетической кривой вправо. При концентрации 0,5 мМ карнозиновые ДНКЖ полностью подавляли хемилюминесценцию. Карнозин, добавленный в концентрации 0,1 мМ, совместно с $Fe^{2+}$ ингибировал светосумму хемилюминесценции на 55%, в отличие от 80% в случае карнозина и карнозиновых ДНКЖ.

Способность карнозина ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) была ранее показана в различных модельных системах. Основываясь на этих фактах, мы решили провести сравнительное изучение действия карнозина и карнозиновых ДНКЖ на окисление арахидоновой кислоты (омега-6 ненасыщенная жирная кислота), индуцированное свободнорадикальными продуктами, образующимися в реакции metMb с t-BOOH. Регистрировали диеновые конъюгаты, образующиеся на начальных стадиях окисления арахидоновой кислоты. Поскольку карнозиновые ДНКЖ содержат ионы $Fe^{2+}$, являющиеся инициатором ПОЛ, в качестве контроля были поставлены эксперименты с карнозином и $Fe^{2+}$, добавленным в концентрации, эквивалентной его содержанию в ДНКЖ.

ДНКЖ в концентрации 0,05 мМ практически полностью (на 95%) подавляли

образование диеновых конъюгатов, в то время как ингибирующий эффект карнозина (0,1 мМ) составлял 65%, а в сочетании с железом – 55 %. Карнозин (1 мМ) и карнозиновые ДНКЖ (0,5 мМ) снижали окисление арахидоновой кислоты примерно на 80 %.

Наименьшая начальная скорость образования диеновых конъюгатов была в образцах, содержащих карнозиновые ДНКЖ (примерно в 10 раз меньше, чем в контроле), наибольшая (такая же как в контроле) при сочетании карнозина с Fe2+. Эти данные коррелируют с количеством диеновых конъюгатов, образованных к 80 минуте реакции. Добавка Fe2+ к контрольному образцу увеличивала скорость реакции окисления арахидоновой кислоты на 30 %, что подтверждает участие ионов железа в качестве инициатора ПОЛ в исследуемой системе. Таким образом, было показано, что сочетание Fe2+ с карнозином или включение его в состав ДНКЖ снижает его прооксидантный эффект.

Антиоксидантные свойства гистидиновых дипептидов помимо улавливания свободных радикалов, также могут быть обусловлены способностью имидазольного кольца дипептида связывать ионы редокс-активных металлов. Однако механизмы антиоксидантного действия гистидиновых дипептидов до конца не выяснены.

Ранее мы показали, что карнозин может существовать в виде лигандов ДНКЖ [7, 8]. Предварительное изучение антиоксидантной активности карнозиновых ДНКЖ выявило, что они снижают уровень свободных радикалов пиперазина в реакционной системе, содержащей t-BOOH [8]. Это действие мы объяснили способностью комплексов перехватывать органические свободные радикалы, продуцирующиеся при распаде t-BOOH. Кроме этого, карнозиновые ДНКЖ взаимодействуют с супероксидными анион-радикалами ($O2^{\bullet-}$), образующимися в ферментативной системе ксантин-ксантиноксидаза [8]. Также они восстанавливают оксоферрильную форму гемовой группы, образующуюся в реакции metMb с t-BOOH [8].

Антиоксидантные свойства карнозиновых ДНКЖ могут быть обусловлены комплексным действием трех составляющих: 1) карнозиновыми лигандами, 2) оксидом азота, 3) ионами Fe2+. Антиоксидантное действие карнозина хорошо известно [1, 9]. Есть данные, что активным элементом дипептида является имидазольное кольцо гистидина [10]. Также существенный вклад в антиоксидантную активность вносит способность карнозина хелатировать Fe2+ и Cu2+. Антиоксидантное действие NO в реакциях перекисного окисления липидов показано в различных системах in vitro и in vivo [11, 12]. В наших работах мы неоднократно описывали возможные механизмы антиоксидантного и антирадикального действия ДНКЖ с различными физиологическими лигандами [13, 14]. Однако в случае карнозиновых ДНКЖ можно предположить еще один дополнительный механизм, связанный с окислением имидазольного кольца гистидина ионами Fe2+, входящими в состав комплексов. В ходе такого окисления образуется 2-оксогистидин, обладающий высокой антиоксидантной активностью [15].

**Выводы**

Изученное в работе антиоксидантное действие карнозиновых ДНКЖ показывает еще один возможный механизм, посредством которого карнозин и другие гистидиновые дипептиды могут осуществлять антиоксидантную функцию в живых системах. Наличие антиоксидантной функции у гистидиновых дипептидов является предпосылкой для их использования в лечении и профилактике различных заболеваний, связанных с окислительным стрессом (нейродегенеративные и онкологические заболевания, диабет, катаракта).

**Заключение**

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

1) Карнозин и карнозиновые динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) перехватывают свободные радикалы, образующиеся при катализируемом гемовым и негемовым железом распаде гидропероксида *трет*-бутила.
2) Карнозин и карнозиновые ДНКЖ ингибируют образование диеновых конъюгатов, возникающих в ходе окисления арахидоновой кислоты в системе миоглобин–гидропероксид *трет*-бутила.

3) Во всех исследованных системах карнозиновые ДНКЖ оказались более эффективными антиоксидантами, чем карнозин. Включение карнозина в качестве лигандов в железонитрозильные комплексы усиливает его антиоксидантные свойства.

***Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Russian Science Foundation) № 24-24-00210.***

**Литература**

1. Boldyrev A.A. Does carnosine possess direct antioxidant activity? // Int. J. Biochem. 1993. V. 25. N 8. P. 1101-1107.
2. Jukić I., Kolobarić N., Stupin A., Matić A., Kozina N., Mihaljević Z., Mihalj M., Šušnjara P., Stupin M., Ćurić Ž.B., Selthofer-Relatić K., Kibel A., Lukinac A., Kolar L., Kralik G., Kralik Z., Széchenyi A., Jozanović M., Galović O., Medvidović-Kosanović M., Drenjančević I. Carnosine, small but mighty-prospect of use as functional ingredient for functional food formulation. // Antioxidants (Basel). 2021. V. 10. N 7. P. 1037.
3. Malathy D., Anusha D., Karthika K., Punnagai K. Evaluation of antidiabetic and antioxidant activities of L-carnosine using enzyme inhibition and free radical scavenging assays: an in-vitro study. // J. Clin. Diagn. Res. 2023. V. 17. N 7. FC01-FC05.
4. Babizhayev M.A., Yegorov Y.E. An "enigmatic" L-carnosine (β-alanyl-L-histidine)? Cell proliferative activity as a fundamental property of a natural dipeptide inherent to traditional antioxidant, anti-aging biological activities: balancing and a hormonally correct agent, novel patented oral therapy dosage formulation for mobility, skeletal muscle power and functional performance, hypothalamic-pituitary- brain relationship in health, aging and stress studies. // Recent. Pat. Drug. Deliv. Formul. 2015. V. 9. N 1. P. 1-64
5. Berezhnoy D.S., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Devyatov A.A., Lopacheva O.M., Kulikova O.I., Abaimov D.A., Fedorova T.N. Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions. // Amino Acids. 2019. V. 51. N 1. P. 139-150.
6. Bertinaria M., Rolando B., Giorgis M., Montanaro G., Marini E., Collino M., Benetti E., Daniele P.G., Fruttero R., Gasco A. Carnosine analogues containing NO-donor substructures: Synthesis, physico-chemical characterization and preliminary pharmacological profile. // Eur. J. Med. Chem. 2012. V. 54. P. 103-112.
7. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Gromov S.V., Novikov A.A., Topunov A.F. New dinitrosyl iron complexes bound with physiologically active dipeptide carnosine. // J. Biol. Inorg. Chem. 2017. V. 22. N 1. P. 153-160.
8. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Ruuge E.K., Kalenikova E.I., Topunov A.F. Antioxidant and antiradical properties of histidine-bound dinitrosyl iron complexes. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. N 24. P. 17236. DOI: 10.3390/ijms242417236.
9. Malathy D., Anusha D., Karthika K., Punnagai K. Evaluation of antidiabetic and antioxidant activities of L-carnosine using enzyme inhibition and free radical scavenging assays: an in-vitro study. // J. Clin. Diagn. Res. 2023. V. 17. N 7. FC01-FC05.
10. Peiretti G., Medana C., Visentin S., Giancotti V., Zunino V., Meineri G. Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid. // Food Chemistry. 2011. V. 126. N 4. P. 1939-1947.
11. 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. V. 34. P. 6689-6699.
12. Hummel S.G., Fischer A.J., Martin S.M., Schafer F.Q., Buettner G.R. Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. // Free Radic. Biol. Med. 2006. V. 40. N 3. P. 501-506.
13. Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Грачев Д.И., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных

комплексов железа. // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67. № 2. С. 162-168.
14. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. Protective effect of dinitrosyl iron complexes bound with hemoglobin on oxidative modification by peroxynitrite. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. N 24. e13649.
15. Uchida K. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. // Amino Acids. 2003. V. 25. P. 249-257.

**Сведения об авторах**
***Эльвира Ильгизовна Насыбуллина***
*канд. биол. наук, науч. сотр.*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: lvirus198709@rambler.ru*
***Ксения Владимировна Хвесько***
*мл. науч. сотр.*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Московский политехнический университет,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: ksenia.nikitich@gmail.com*
***Ольга Владимировна Космачевская***
*канд. биол. наук, ст. науч. сотр.*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта*: *rizobium@yandex.ru*
***Константин Борисович Шумаев***
*д-р биол. наук, ст. науч. сотр.*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта*: *tomorov@mail.ru*

***Алексей Федорович Топунов***
*д-р биол. наук, профессор,*
*зав. лабораторией*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта*: *aftopunov@yandex.ru*

**Information about authors**
***Elvira Ilgizovna Nasybullina***
*PhD (Biol.), Research Scientist,*
*Federal Research Center of Biotechnology,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: lvirus198709@rambler.ru*
***Kseniya Vladimirovna Khvesko***
*Junior Research Scientist*
*Federal Research Center of Biotechnology,*
*Moscow Polytechnic University*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: ksenia.nikitich@gmail.com*
***Olga Vladimirovna Kosmachevskaya***
*PhD (Biol.), Senior Research Scientist*
*Federal Research Center of Biotechnology*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: rizobium@yandex.ru*
***Konstantin Borisovich Shumaev***
*Doctor of Science (Biol.),*
*Senior Research Scientist,*
*Federal Research Center of Biotechnology,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: tomorov@mail.ru*
***Alexey Fedorovich Topunov***
*Doctor of Science (Biol.), Professor,*
*Head of Laboratory,*
*Federal Research Center of Biotechnology,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: aftopunov@yandex.ru*

УДК 661.98:547.963.4
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.81-87

**О.В. Космачевская**[1], **Э.И. Насыбуллина**[1], **И.С. Пугаченко**[1], **О.В. Покидова**[2], **Н.А. Санина**[2], **К.Б. Шумаев**[1], **А.Ф. Топунов**[1]
[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
[2]Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН,

## ДЕЙСТВИЕ ЖЕЛЕЗОНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ В СИСТЕМАХ, СОДЕРЖАЩИХ ГЕМОГЛОБИН

*Железонитрозильные комплексы с глутатионовыми, фосфатными и тиосульфатными лигандами снижали продукцию свободно-радикальных интермедиатов в реакции окисления гемоглобина гидропероксидом трет-бутила, а также препятствовали окислительной модификации гемоглобина. Тетранитрозильный комплекс железа (ТНКЖ) оказался более эффективным антиоксидантом по сравнению с другими исследованными комплексами.*

***Ключевые слова:*** *нитрозильные комплексы железа, оксид азота, гемоглобин, окислительная модификация, перекисное окисление, гидропероксид трет-бутила*

**O.V. Kosmachevskaya**[1], **E.I. Nasybullina**[1],
**I.S. Pugachenko**[1], **O.V. Pokidova**[2], **N.A. Sanina**[2]
**K.B. Chumaev**[1], **A.F. Topunov**[1]
[1]Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
[2]Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

## EFFECT OF NITROSYL IRON COMPLEXES IN HEMOGLOBIN-CONTAINING SYSTEMS

*Nitrosyl iron complexes with glutathione, phosphate and thiosulfate ligands inhibited the production of free radical intermediates in the oxidation of hemoglobin with tert-butyl hydroperoxide, and also prevented the oxidative modification of hemoglobin. Tetranitrosyl iron complex (TNIC) was a more effective antioxidant compared to other studied complexes.*

***Keywords:*** *nitrosyl iron complexes, nitric oxide, hemoglobin, oxidative modification, peroxidation, tert-butyl hydroperoxide*

### Введение

Оксид азота ($NO^{\bullet}$) − липофильная радикальная молекула, образующаяся во всех живых организмах в ферментативных и неферментативных реакциях. В настоящее время $NO^{\bullet}$ используют для регулирования артериального давления и как кардиопротекторный медиатор при ишемии, гипертонии, инсульте, а также для лечения рака. Поскольку молекула $NO^{\bullet}$ имеет короткое время жизни, в медицинской практике используют доноры оксида азота, к которым относятся нитрозильные комплексы переходных металлов. Наиболее изучены кардиопротекторные свойства динитрозильных комплексов железа с тиолсодержащими лигандами (RS-ДНКЖ), в качестве которых выступает глутатион и цистеин.

Помимо физиологических ДНКЖ с глутатионовыми и цистеиновыми лигандами в настоящее время активно ведутся разработки и исследование их синтетических аналогов. Наиболее хорошо изучен анионный биядерный тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатом натрия $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]\cdot 4H_2O$ (ТНКЖ). Этот комплекс является эффективным донором $NO^{\bullet}$ [1, 2] и оказывает терапевтическое действие на миокард крыс при моделировании ишемического и реперфузионного повреждения. Он также обладает сосудорасширяющим действием, которое проявляется в эффективном восстановлении коронарного кровотока и уменьшении систолического артериального давления, а также обладает противоопухолевым действием [1].

Известно, что оксид азота в биологических системах может функционировать еще и как антиоксидантная молекула [3-7]. Причем антиоксидантное действие $NO^{\bullet}$ обусловлено как прямым взаимодействием со свободнорадикальными молекулами, так и с активацией путей передачи сигнала, которые приводят к усилению синтеза эндогенных антиоксидантов или подавлению ответов на провоспалительные стимулы [8, 9].

Антиоксидантные свойства железонитрозильных комплексов до сих пор ставятся под сомнение из-за входящего в их состав железа, катализирующего перекисное окисление липидов (ПОЛ). К тому же, $NO^{\bullet}$, высвобождающийся из комплексов, также может проявлять прооксидантное действие, образуя пероксинитрит.

### Цель работы

Сравнить антиоксидантное/прооксидантное действие железонитрозильных комплексов с глутатионовыми, фосфатными и тиосульфатными лигандами в системах, моделирующих перекисное окисление гемоглобина.

### Материалы и методы

ДНКЖ с фосфатными лигандами синтезировали в сосуде Тунберга, пропуская газообразный NO через смесь, содержащую $FeSO_4$ и 100 мМ Na,K-фосфатный буфер (pH 6,8) в качестве источника фосфатного лиганда, как описано в работе [4]. GS-ДНКЖ получали добавлением восстановленного глутатиона (GSH) к менее стабильным ДНКЖ с фосфатом в

молярном соотношении 2 : 1. Препараты ДНКЖ хранили при температуре жидкого азота. Комплекс $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]\bullet 4H_2O$ синтезировали согласно методике, описанной в работе [10] пропусканием газообразного NO через анаэробный водный раствор смеси $FeSO_4\bullet 7H_2O$ и $Na_2S_2O_3\bullet 5H_2O$ при комнатной температуре и последующей кристаллизацией при температуре +4-8 ˚C.

Образование свободнорадикальных интермедиатов в реакции гемоглобина (metHb) с гидропероксидом *трет*-бутила (*t*-BOOH) оценивали методом хемилюминесценции, используя в качестве активатора люминол. Регистрацию осуществляли на хемилюминесцентном анализаторе Lum-5773 (Россия) при постоянном перемешивании. Для описания экспериментальных кривых использовали светосумму хемилюминесценции за 300 секунд.

Влияние железонитрозильных комплексов на образование оксоферрилHb (Hb-Fe(IV)=O) исследовали в системе с *t*-BOOH. Комплексы вносили одновременно с *t*-BOOH в соотношении 3 : 1 в расчете на субъединицы белка. За накоплением Hb-Fe(IV)=O следили по разности поглощения при 582 нм и 617 нм (ближайшая изобестическая точка по отношению к максимуму поглощения 582 нм).

Продукцию активных форм кислорода в реакции metHb с *t*-BOOH измеряли в присутствии TMPD. Оценку генерации окислителей производили по величине площади под кривой окисления TMPD, зарегистрированной при 610 нм. в течение пяти минут.

Антиоксидантную активность измеряли с помощью ABTS. В реакционной системе, содержащей metHb и *t*-BOOH, образуется радикал ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) сине-зеленого цвета. Восстановление $ABTS^{\bullet+}$ сопровождается обесцвечиванием раствора. За ходом реакции следили при 734 нм.

Диеновые конъюгаты − продукты ранней стадии окисления линолевой кислоты, образующиеся в ходе окисления гемоглобина гидропероксидом трет-бутила, измеряли по величине оптического поглощения при 234 нм.

Содержание гема в растворе Hb регистрировали с помощью пиридигемохромного метода. К 15 мкл раствора Hb добавляли 135 мкл воды и 450 мкл 30% щелочного раствора пиридина. Непосредственно перед измерением раствор восстанавливали дитионитом натрия. Оптическое поглощение восстановленного комплекса гема с пиридином измеряли при 556 и 539 нм.

SDS-электрофорез проводили в блоках 12% ПААГ по методу Лэммли. К растворам белка добавляли буфер для образцов в соотношении 1 : 1, прогревали в течение 5 минут при 95 оС и наносили на гель.

**Полученные результаты**

**Образование свободнорадикальных продуктов при окислении гемоглобина**

В системе, моделирующей перекисное окисление Hb гидропероксидом трет-бутила, было изучено влияние железонитрозильных комплексов с глутатионовыми (GS-ДНКЖ), фосфатными (ДНКЖ-PO4−) и тиосульфатными (ТНКЖ) лигандами на образование свободнорадикальных интермедиатов. Реакция metHb с органической гидроперекисью приводит к образованию оксоферрилHb с радикалом на порфирине или на белковой части, а также алкоксильных (RO•) и алкилпероксильных (ROO•) радикалов [11, 12]. По данным работы [11] основным свободным радикалом, образующимся в исследуемой реакционной системе, является алкоксильный радикал (tert-butoxy radical, t-BO•).

Регистрацию свободных радикалов производили с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции. При взаимодействии пероксильных радикалов с люминолом образуется радикал люминола, из которого затем образуется аминофталевая кислота в возбужденном электронном состоянии (P*), которая переходит в основное с испускание кванта света:

$$ROO^{\bullet} + LH_2 \longrightarrow ROOH + LH^{\bullet} \quad (1)$$

$$P^* \longrightarrow P + h\nu \quad (2)$$

ТНКЖ, взаимодействуя с радикалами, дозозависимо ингибировал интенсивность хемилюминесценции. При концентрации комплекса 0,5 мМ, он полностью подавлял

хемилюминесценцию. ДНКЖ-$PO_4^-$ также оказывал ингибирующее действие на продукцию радикалов, однако был менее эффективным. При концентрации 0,5 мМ ингибирующий эффект составлял 60%. GS-ДНКЖ, напротив, проявлял прооксидантное действие, которое, вероятно, обусловлено образованием тиильных радикалов в ходе окисления глутатиона [13]. Эти радикалы при взаимодействии с кислородом могут образовывать глутатиондисульфид (GSSG) или тиопероксильный радикал (GSOO$^\bullet$). Тиильные радикалы возникают, вероятно, при окислении несвязанного глутатиона, присутствующего в препаратах GS-ДНКЖ.

Железонитрозильные комплексы могут нейтрализовать перекисные радикалы благодаря тому, что являются хорошими донорами NO$^\bullet$, который, как известно, действует как антиоксидант в системе ПОЛ [3, 6, 14]. Оксид азота способен обрывать цепные реакции ПОЛ, взаимодействуя с радикалами гидроперекисей ($k = 1–3 \times 10^9$ $M^{-1}c^{-1}$) [6] с образованием интермедиата − органического пероксинитрита (реакция 3):

$$ROO^\bullet + NO^\bullet \longrightarrow ROONO \longrightarrow RO^\bullet + NO_2^\bullet \quad (3)$$

Антиоксидантное и антирадикальное действие железонитрозильных комплексов также было изучено в системе окисления TMPD свободнорадикальными продуктами, образующимися в реакции metHb с *t*-BOOH. Как и в предыдущей экспериментальной системе, антиоксидантное действие ДНКЖ-$PO_4^-$ было менее выражено по сравнению с ТНКЖ. GS-ДНКЖ оказывал незначительное антиоксидантное действие, 10-15 % ингибирования окисления TMPD.

Антиоксидантное действие железонитрозильных комплексов изучали с помощью широко используемого методического подхода – образование катион-радикала ABTS (ABTS$^{\bullet+}$). Добавление комплексов приводило к торможению образования ABTS$^{\bullet+}$, генерируемого в реакции metHb с *t*-BOOH. На кинетических кривых, зарегистрированных в присутствии комплексов, отчетливо прослеживается лаг-период. Наиболее продолжительный лаг-период и наименьшая скорость образования ABTS$^{\bullet+}$ наблюдались при добавлении в систему ТНКЖ.

**Окислительная модификация гемоглобина**

Реакция Hb с гидропероксидами приводит к двухэлектронному окислению белка с образованием оксоферрильного интермедиата с катион-радикалом на порфириновом кольце (порфирин$^{+\bullet}$–Fe(IV)=O), который приводит либо к разрушению гемовой группы, либо к окислению аминокислотных остатков в белке [12, 15]. Учитывая данный факт, было изучено действие железонитрозильных комплексов на эти процессы.

Железонитрозильные комплексы в разной степени влияли на образование оксоферрилHb. Наибольшее ингибирующее действие оказывал GS-ДНКЖ, что может быть связано не только с действием NO$^\bullet$, но и GSH, входящим в состав комплекса. Как известно, NO может восстанавливать оксоферрильный интермедиат до met-формы (реакция 4) с последующим восстановительным нитрозилированием (реакция 5) [14], которое практически полностью ингибирует образование свободных радикалов [15]:

$$\text{порфирин-Fe(IV)=O} + NO^\bullet \rightarrow \underset{OH^-}{\text{порфирин-Fe(III)-ONO}} \rightarrow \text{порфирин-Fe(III)} + NO_2^- \quad (4)$$

$$\text{порфирин-Fe(III)} + 2NO^\bullet \rightarrow \text{порфирин-Fe(II)-NO} + NO_2^- + H^+ \quad (5)$$

Образование оксоферрилHb приводит к окислительной модификации Hb, сопровождающейся деградацией гемовой группы, высвобождением ионов железа, катализирующих генерацию свободных радикалов в реакциях Фентона и Хабера-Вайса. Поэтому было исследовано действие железонитрозильных комплексов на разрушение гемовой группы под действием различных концентраций *t*-BOOH. GS-ДНКЖ практически не влиял на распад гемовой группы, в то время как ТНКЖ полностью подавлял разрушение гема.

В результате внутримолекулярного восстановления порфирина образуются радикалы аминокислот, что приводит к межсубъединичным сшивкам и формированию димерных и высокомолекулярных форм белка. Количество димеров Hb снижалось по мере увеличения

концентрации *t*-BOOH, за исключением вариантов, содержащих ТНКЖ. Напротив, количество высокомолекулярных форм дозозависимо возрастало с увеличением концентрации прооксиданта во всех исследованных вариантах. Однако при добавлении ТНКЖ доля Hb, образовавшего мультимеры, была существенно ниже при всех концентрациях *t*-BOOH.

**Окисление линолевой кислоты в присутствии гемоглобина**

Известно, что оксоферрилHb, образующийся при взаимодействии Hb с гидропероксидами, инициирует окисление липидов [12]. Также известно, что NO• подавляет процессы свободнорадикального окисления липидов [3, 6, 14]. Принимая во внимание эти факты, было проведено исследование влияния нитрозильных комплексов железа на окисление линолевой кислоты в системе metHb−*t*-BOOH. Степень окисления жирной кислоты регистрировали по образованию в реакционной среде диеновых конъюгатов – продуктов начальной стадии окисления. Исследуемые нитрозильные комплексы железа в разной степени подавляли образование диеновых конъюгатов. Наибольшее антиоксидантное действие оказывали GS-ДНКЖ, что, по-видимому, обусловлено действием GSH, присутствующего в комплексах.

**Выводы**

Во всех исследованных системах, содержащих гемоглобин, ТНКЖ оказывал выраженное антиоксидантное действие, в то время как GS-ДНКЖ в одних условиях проявлял себя как антиоксидант, а в других как прооксидант. На основании полученных результатов можно заключить, что GS-ДНКЖ и ТНКЖ могут успешно использоваться в качестве сосудорасширяющих и кардиопротекторных препаратов.

**Заключение**

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

1) Проведена оценка общей антиоксидантной активности ДНКЖ с фосфатными и глутатионовыми лигандами в сравнении с ТНКЖ с тиосульфатными лигандами на продукцию свободно-радикальных интермедиатов в реакции окисления Hb гидропероксидом *трет*-бутила и на окислительную модификацию Hb. Было показано, что тетранитрозильный комплекс обладает более выраженным антиоксидантным действием по сравнению с динитрозильными комплексами.
2) Выраженные антиоксидантные свойства ТНКЖ по сравнению с ДНКЖ можно объяснить высокой способностью генерировать NO•, более низким содержанием железа на 1 моль NO•, а также отсутствием прооксидантного действия у продуктов распада этого комплекса.

***Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Russian Science Foundation) № 24-24-00210.***

**Литература**

1. Sanina N.A., Rudneva T.N., Sulimenkov I.V., Konovalova N.P., Sashenkova T.E., Aldoshin S.M. Antitumor activity of iron nitrosyl complexes: New donors of nitrogen monoxide. // Rossiiskii Khimicheskii Zhurnal. 2009. V. 53. P. 164.
2. Pokidova O.V., Emel'yanova N.S., Psikha B.L., Kulikov A.V. Decomposition of the binuclear nitrosyl iron complex with thiosulfato ligands in aqueous solutions: Experimental and theoretical study. // Inorganica Chimica Acta. 2020. V. 502. P. 119369.
3. Hogg N., Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. // Biochim. BiophysActa (BBA) - Bioenergetics. 1999. V. 1411. N 2–3. P. 378-384.
4. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. // Methods in Enzymology. 2008. V. 436. P. 445-461.
5. 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. V. 2019. P. 2798154.
6. Hummel S.G., Fischer A.J., Martin S.M., Schafer F.Q., Buettner G.R. Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. // Free Radic Biol Med. 2006. V. 40. N 3. P. 501-506.
7. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. Protective effect of dinitrosyl iron complexes bound with hemoglobin on oxidative modification by peroxynitrite. // Int J Mol Sci. 2021. V. 22. 24. P. 13649.
8. Tegeder I. Nitric oxide mediated redox regulation of protein homeostasis. // Cell Signal. 2019. V. 53. P. 348-356.
9. Lundberg J.O., Weitzberg E. Nitric oxide signaling in health and disease. // Cell. 2022. V. 185. P. 2853-2878.
10. Sanina N.A., Aldoshin S.M., Rudneva T.N., Golovina N.I., Shilov G.N., Shulrga Yu.M., Martynenko V.M., Ovanesyan N.S. Synthesis, structure, and solidphase transformations of the nitrosyl iron complex $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]\cdot 4H_2O$. // Koordinatsionnaya Khimiya, 2005. V. 31. P. 323
11. Karoui H., Chalier F., Finet J. P., Tordo P. DEPMPO: an efficient tool for the coupled ESR-spin trapping of alkylperoxyl radicals in water. // Org Biomol Chem. 2011. V. 9. N 7. P. 2473-2480.
12. Svistunenko D.A. Reaction of haem containing proteins and enzymes with hydroperoxides: the radical view. // Biochim Biophys Acta. 2005. 1707. N 1. P. 127-155.
13. Karoui H., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. Effect of superoxide dismutase mimics on radical adduct formation during the reaction between peroxynitrite and thiols-- an ESR-spin trapping study // Arch Biochem Biophys. 1996. V. 330. N 1. P. 115-124.
14. 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. V. 34. P. 6689-6699.
15. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Pugachenko I.S., Novikova N.N., Topunov A.F. Antiglycation and antioxidant effect of nitroxyl towards hemoglobin. // Antioxidants. 2022. V. 11. DOI: 10.3390/antiox11102007

**Сведения об авторах**

***Ольга Владимировна Космачевская***
*канд. биол. наук, ст. науч. сотр.*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: rizobium@yandex.ru*

***Эльвира Ильгизовна Насыбуллина***
*канд. биол. наук, науч. сотр.*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: lvirus198709@rambler.ru*

***Игорь Сергеевич Пугаченко***
*мл. науч. сотр.*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: gewalthaber-igor@mail.ru*

***Олеся Викторовна Покидова***
*канд. хим. наук, ст. науч. сотр.*
*Институт проблем химической физики РАН,*
*Черноголовка, Московская область, Россия*
*Эл. почта: pov@icp.ac.ru*

**Information about authors**

***Olga Vladimirovna Kosmachevskaya***
*PhD (Biol.), Senior Research Scientist*
*Federal Research Center of Biotechnology*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: rizobium@yandex.ru*

***Elvira Ilgizovna Nasybullina***
*PhD (Biol.), Research Scientist,*
*Federal Research Center of Biotechnology,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: lvirus198709@rambler.ru*

***Igor Sergeevich Pugachenko***
*Junior Research Scientist,*
*Federal Research Center of Biotechnology*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: gewalthaber-igor@mail.ru*

***Olesya Viktorovna Pokidova***
*PhD (Chem.), Senior Research Scientist*
*Institute of Problems of Chemical Physics,*
*Russian Academy of Sciences,*
*Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation*
*E-mail: pov@icp.ac.ru*

***Наталия Алексеевна Санина***
*д-р хим. наук, зав. отд.*
*Институт проблем химической физики РА,*
*Черноголовка, Московская область, Россия*
*Эл. почта: sanina@icp.ac.ru*

***Константин Борисович Шумаев***
*д-р биол. наук., ст. науч. сотр.*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта*: *tomorov@mail.ru*
***Алексей Федорович Топунов***
*д-р биол. наук, профессор,*
*зав. лабораторией*
*ФИЦ Биотехнологии РАН,*
*Москва, Россия*
*Эл. почта*: *aftopunov@yandex.ru*

***Natalia Alekseevna Sanina***
*Doctor of Science (Chem.), Head of Department*
*Institute of Problems of Chemical Physic,*
*Russian Academy of Sciences,*
*Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation*
*E-mail: sanina@icp.ac.ru*
***Konstantin Borisovich Shumaev***
*Doctor of Science (Biol.), Senior Research Scientist,*
*Federal Research Center of Biotechnology,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: tomorov@mail.ru*
***Alexey Fedorovich Topunov***
*Doctor of Science (Biol.), Professor,*
*Head of Laboratory,*
*Federal Research Center of Biotechnology,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: aftopunov@yandex.ru*

УДК 547-68
ГРНТИ 31.21.29
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.87-91

**И.С. Рябоконь, В.П. Седов, П.Л. Молканов,**
**Д.Н. Орлова, М.В. Суясова, М.Е. Взнуздаев**
Петербургский институт ядерной физики
им. Б. П. Константинова Национального
исследовательского центра «Курчатовский институт»

## СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЭНДОЭДРАЛЬНЫХ ФУЛЛЕРЕНОВ ТЕЛЛУРА

*В статье обсуждается возможность синтеза эндоэдральных фуллеренов (эндофуллеренов) теллура и перевода их в водорастворимую форму с целью последующего получения эндофуллеренолов йода при облучении тепловыми нейтронами. Описан экспериментальный метод получения эндофуллерена теллура, перевода его в водорастворимую форму и исследование свойств полученного продукта спектроскопическими методами.*
***Ключевые слова:*** *фуллерен, фуллеренол, теллур, йод, радиофармпрепараты.*

**I.S. Ryabokon, V.P. Sedov, P.L. Molkanov,**
**D.N. Orlova, M.V. Suyasova, M. E. Vznuzdaev**
Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of
National Research Centre «Kurchatov Institute»

## STUDY OF THE POSSIBILITY OF SYNTHESIS OF ENDOHEDRAL TELLURIUM FULLERENES

*The article discuss the possibility of synthesizing endohedral fullerens (endofullerens) of tellurium and converting them into a water-soluble form with the aim of subsequently obtaining endohedral fullerenols of iodine by irradiation with thermal neutrons. An experimental method for producing tellurium endofullerene, converting it into a water-soluble form, and studying the properties of the resulting product using spectroscopic methods is described.*
***Keywords****: fullerene, fullerenol, tellurium, iodine, radiopharmaceuticals.*

### Введение

Одна из основных проблем, возникающих при радиотерапии онкологических заболеваний – осложнения, возникающие вследствие воздействия ионизирующего излучения на клетки нормальных тканей [1]. Для снижения этого побочного эффекта необходимо найти

способы доставки радиофармпрепаратов (РФП) непосредственно в опухоль. Одним из способов решения этой задачи может быть применение эндоэдральных фуллеренов (эндофуллеренов), содержащих атом радиоактивного элемента внутри углеродного каркаса.

Использование молекулы эндофуллерена как наноконтейнера для адресной доставки радиоизотопа, входящего в состав РФП, представляется весьма перспективным, поскольку, находясь внутри каркаса фуллерена, атом радиоактивного изотопа изолирован от химического взаимодействия со здоровыми клетками и, таким образом, не оказывает на них токсического действия. Радиоактивное действие изотопа при этом остается неизменным. Таким образом, появляется возможность применения более высоких доз РФП с меньшим негативным воздействием на организм. Проблема плохой биосовместимости эндофуллеренов, связанная с их низкой растворимостью в воде, решается путем синтеза аддуктов с различными функциональными группами: гидроксильными [2], карбоксильными [3] или молекулами биосовместимых полимеров. Модифицированные таким образом молекулы эндофуллеренов приобретают хорошую водорастворимость и липофильные свойства, благодаря которым они легко преодолевают клеточные мембраны. Снабжение переведенных в биосовместимую форму эндофуллеренов адресными молекулами (например, фолиевой кислотой) превращает их в эффективные векторы для доставки радиоактивных изотопов непосредственно к злокачественному новообразованию [4].

Препараты на основе изотопов йода (123I, 124I, 125I, 131I) широко применяются для диагностики и радиотерапии заболеваний щитовидной железы. Йод обладает высокой химической активностью и токсичностью, поэтому заключение его атомов в наноконтейнер молекулы фуллеренола (водорастворимой формы фуллерена, модифицированного гидроксильными группами) является перспективным методом снижения его вредного побочного воздействия на организм.

Особенности технологии производства фуллеренов и их производных делают синтез эндофуллеренов с использованием готовых радиоактивных изотопов йода практически неосуществимым. Однако, широко распространен реакторный способ получения изотопов йода облучением теллуровых мишеней тепловыми нейтронами: $^{130}Te(n,\gamma)^{131}Te(\beta)^{131}I$. Очевидная идея состоит в том, чтобы попытаться применить реакторный метод к теллуру, уже инкапсулированному в молекулу фуллерена или фуллеренола. Возникает гипотетическая последовательность получения эндофуллеренолов 131I: синтез эндофуллерена Te, перевод его в водорастворимую форму и, наконец, облучение этого промежуточного продукта пучком тепловых нейтронов. Установленная ранее высокая выживаемость фуллеренолов под воздействием нейтронов [5] указывает на потенциально высокую эффективность предлагаемого метода получения.

**Цель работы**

Целью данной работы является изучение возможности синтеза водорастворимых эндоэдральных фуллеренолов теллура, пригодных для последующего получения эндофуллеренолов 131I при облучении на пучке тепловых нейтронов.

**Материалы и методы**

В данной работе использовали метод, основанный на электродуговом испарении композитных теллурсодержащих графитовых электродов в среде гелия. Метод ранее успешно применяли для синтеза эндометаллофуллеренов 3d- и 4f-элементов [6,7].

В рамках метода получали фталоцианин теллура, проводили его пиролиз в среде инертного газа – гелия. Далее теллуросодержащий пиролизат использовали для приготовления композитных электродов, последние применяли для синтеза фуллеренов электродуговым способом. Полученный углеродный конденсат промывали о-ксилолом для удаления пустотелых фуллеренов. Затем экстрагировали эндофуллерены теллура в виде комплекса с растворителем N,N - диметилформамидом (ДМФА) с добавкой гидразин-гидрата. Смесь разделяли центрифугированием и раствор упаривали досуха. Далее полученный продукт гидроксилировали раствором перекиси водорода для перевода в водорастворимую форму – фуллеренол.

Эндофуллерен и эндофуллеренол теллура идентифицировали с помощью ИК-Фурье-

спектроскопии на приборе ФСМ-1201 с помощью приставки многократного нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) [8].

Масс-спектр эндофуллерена теллура был измерен на приборе MALDI-TOF, Bruker.

**Полученные результаты**

В результате проведенных исследований были получены эндоэдральные фуллерен и фуллеронол теллура. С помощью ИК-спектроскопии установлены характерные для фуллерена и фуллеренола полосы колебания связей: C-C, C=C, C-O, C-O-H. ИК-спектры представлены на Рис. 1.

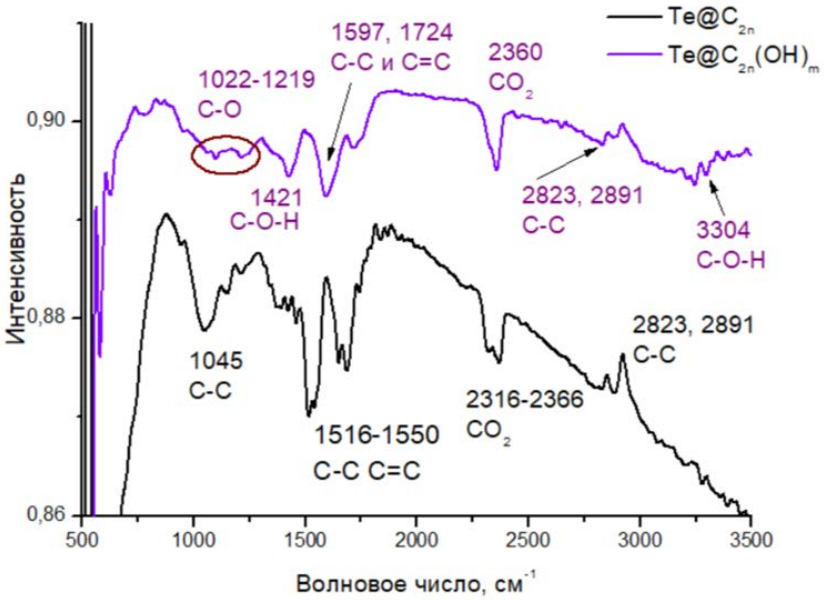



***Рис. 1. ИК-спектры эндофуллерена и эндофуллеренола теллура.***

В ИК-спектре присутствуют полосы, характеризующие наличие гидроксильных групп, присоединенных к фуллереновому каркасу. Присутствуют полосы 1022-1219 см-1, характерные для связи C-O. Слабая полоса 1421 см-1 отвечает деформационным колебаниям связанной группы C-O-H. Полосы 1597 и 1724 см-1 относятся к колебаниям связей C-C и C=C, соответственно, в молекулах фуллерена и фуллеренола. Группа полос при 2823 и 2891 см-1 относится к колебаниям связи C-C в молекуле фуллеренола, а интенсивная полоса при 3304 см-1 соответствует колебаниям гидроксильной группы, связанной с фуллереном.

Методом масс-спектроскопии установлено наличие эндофуллеренов теллура вида Te@Cn, где n=86, 90, 92, 94, 96. (Рис. 2).

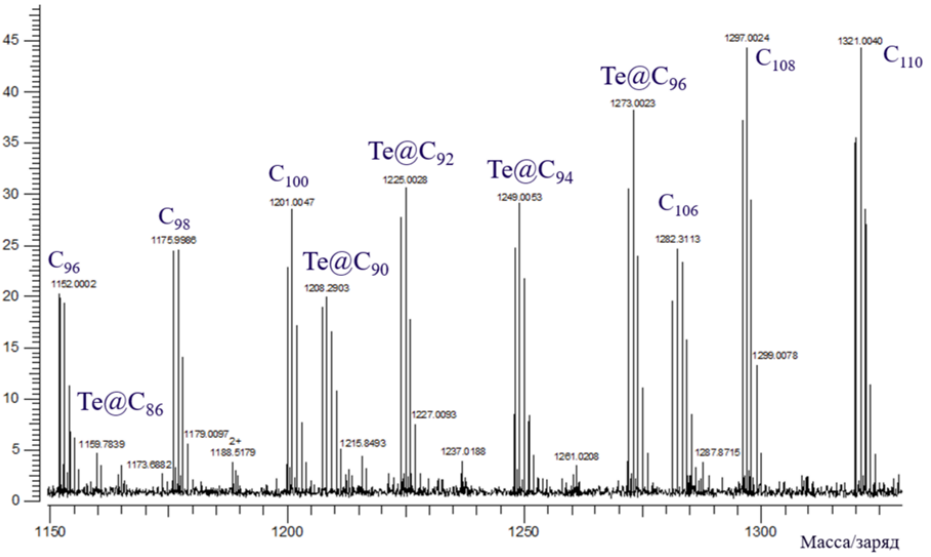



***Рис. 2. Масс-спектр эндофуллерена теллура.***

**Выводы**

Полученные методами ИК- и масс-спектроскопии данные позволяют сделать вывод, что в результате проведенных процедур получены и переведены в водорастворимую форму теллур-содержащие продукты электродугового синтеза, которые можно охарактеризовать как эндоэдральные фуллеренолы теллура.

**Заключение**

Авторы считают, что новизной данного исследования является установление возможности синтеза эндоэдральных водорастворимых фуллеренов теллура - важных промежуточных продуктов для получения эндофуллеренолов йода как основы радиофармпрепаратов.

***Авторы выражают благодарность за содействие в масс-спектрометрических исследованиях Виктору Ивановичу Герасимову.***

**Литература**

1. Противоопухолевые препараты: [Электронный ресурс]. М., 2024. URL: https://www.euroonco.ru/preparations-from-a-z/protivoopuholevye-preparaty.
2. Bolshakova O. I. et al. Fullerenols Prevent Neuron Death and Reduce Oxidative Stress in Drosophila Huntington's Disease Model //Cells. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 170.
3. Timoshen K. A. et al. Dynamic surface properties of carboxyfullerene solutions //Journal of Molecular Liquids. – 2023. – Т. 372. – С. 121174.
4. Barry AS, Farrokh Dehdashti, Mutch DG, et al. Evaluation of $^{111}$In-DTPA-folate as a receptor- targeted diagnostic agent for ovarian cancer: initial clinical results. J. Nucl. Med. 2003; 44:700-707.
5. Дубовский И. М. и др. Исследование радиационной стойкости эндоэдральных фуллеренов редкоземельных элементов и их водорастворимых производных //Кристаллография. – 2018. – Т. 63. – №. 1. – С. 144-151.
6. Седов В. П. и др. Способ получения эндофуллеренов 3d-металлов. Патент РФ № 2664133 С1, 2018.
7. Седов В. П. и др. Способ получения водорастворимых гидроксилированных производных эндометаллофуллеренов лантаноидов. – 2018.
8. ООО «Мониторинг»: [Электронный ресурс]. М., 2024. URL: https://www.ooo-monitoring.ru/

**Сведения об авторах**

***Ирина Сергеевна Рябоконь***
*Младший научный сотрудник*
Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
*Гатчина, Россия*
*Эл. почта:* neferirina@yandex.ru

***Виктор Петрович Седов***
*Старший научный сотрудник*
Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
*Гатчина, Россия*
*Эл. почта:* victorsedov61@gmail.com

**Information about author**

***Irine Sergeevna Ryabokon***
*junior research scientist*
Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»
*Gatchina, Russian Federation*
*E-mail:* neferirina@yandex.ru

***Victor Petrovich Sedov***
*Senior research scientist*
Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»
*Gatchina, Russian Federation*
*E-mail:* victorsedov61@gmail.com

***Павел Леонидович Молканов***
*Научный сотрудник*
Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
*Гатчина, Россия*
*Эл. почта:* molkanov_pl@pnpi.nrcki.ru

***Диана Николаевна Орлова***
*Научный сотрудник*
Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
*Гатчина, Россия*
*Эл. почта:* orlova_dn@pnpi.nrcki.ru

***Марина Вадимовна Суясова***
*к.ф-м.н., с.н.с., зав.лаб.*
Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
*Гатчина, Россия*
*Эл. почта:* marina.suyasova@mail.ru

***Марат Евгеньевич Взнуздаев***
*К.х.н., зав.отделом*
Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
*Гатчина, Россия*
*Эл. почта:* vznuzdaev_me@pnpi.nrcki.ru

***Pavel Leonidovich Molkanov***
*scientist*
Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»
*Gatchina, Russian Federation*
*E-mail:* molkanov_pl@pnpi.nrcki.ru

***Diana Nikolaevna Orlova***
*scientist*
Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»
*Gatchina, Russian Federation*
*E-mail:* orlova_dn@pnpi.nrcki.ru

***Marina Vadimovna Suyasova***
*Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Head of the laboratory*
Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»
*Gatchina, Russian Federation*
*E-mail:* marina.suyasova@mail.ru

***Marat Evgenievich Vznuzdaev***
*Candidate of Chemical Sciences, Head of the Department*
Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»
*Gatchina, Russian Federation*
*E-mail:* vznuzdaev_me@pnpi.nrcki.ru

УДК 577.352.+ 616.006.085: 001.891.573
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.91-98

**Г.И. Морозова, К.З. Аскарова**

Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы

## МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАРЯЖЕННЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТКАХ С УЧЁТОМ СОПРЯЖЁННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГРАДИЕНТОВ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОЛЕЙ В МИТОХОНДРИЯХ И ЯДРАХ.

*В статье обсуждается роль трёх типов электрических трансмембранных потенциалов (ТМП) в аккумуляции хлориновых фотосенсибилизаторов (ФС) и флуоресцентного зонда-катиона ДСМ в опухолевых клетках для эффективности фотодинамической терапии. Представлена кинетическая модель распределения заряженных ФС в лимфоидных клетках в виде системы 4-х нелинейных дифференциальных уравнений с переменными противоположно направленными электрическими потенциалами на внутренних мембранах митохондрий и ядра. Вычислительный компьютерный эксперимент на базе этой модели позволяет получать решения в виде кинетических кривых, на основе которых можно прогнозировать терапевтическую эффективность выбранных ФС.*

***Ключевые слова:*** *кинетическая модель, нелинейные дифференциальные уравнения,*

*фотосенсибилизаторы-хлорины, флуоресцентный зонд ДСМ, переменные трансмембранные потенциалы, митохондрии, ядерные эритроциты, опухолевые лимфоидные клетки.*

**G.I. Morozova, K.Z. Askarova**
Patrice Lumumba Russian Peoples' Friendship University

**MODELING THE DISTRIBUTION KINETICS OF CHARGED PHOTOSENSITIZERS IN LIMPHOID CELLS WITH ASSOCIATED CHANGES IN ELECTRIC FILD GRADIENTS ON THE NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL MEMBRANES.**

*The article discusses the role of three types of electrical transmembrane potentials (TMP) in the accumulation of the chlorine photosensitizers (PS) and fluorescent cation- probe DSM in tumor cells for the photodynamic therapy effectiveness. An kinetic model of the charged PS-chlorins distribution in active lymphoid cells is presented in the form of nonlinear differential equations, including oppositely directed alternating electrical potentials on the internal mitochondria and nuclei membranes. A computational experiment based on the proposed model makes it possible to obtain fairly solutions - kinetic curves, with the help of which one can predict the effectiveness of selected PS.*

***Keywords**: kinetic model, nonlinear differential equations, photosensitizers-chlorins, fluorescent cation probe DSM, alternating membrane potentials, mitochondria, nuclear erythrocytes, tumor lymphoid cells.*

**Введение.**

Эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) существенно определяется накоплением фотосенсибилизаторов (ФС) в опухолевых клетках, прежде всего в митохондриях, где под воздействием облучения лазером и активных форм кислорода молекулы ФС превращаются в фототоксичные вещества, убивающие опухолевые клетки [1,2]. Поэтому актуально исследование кинетики аккумуляции ФС внутри клеток в терапевтически допустимый интервал времени. В серии экспериментов установлено, что электроотрицательные трансмембранные потенциалы (ТМП) на плазматической и митохондриальной мембранах способствуют аккумуляции катионных и препятствуют накоплению анионных молекул в различных клетках [3-11].

С другой стороны, ранее полученные результаты в экспериментах с катионным флуорохромом ДСМ на ядерных эритроцитах крови (лягушек) [10] и на культуре лимфобластоидных клеток [11], позволили выдвинуть гипотезу о существовании на внутренней ядерной мембране энергозависимого положительного градиента электрического поля, который препятствует проникновению катионов в ядро, однако, этот ТМП в ядре снижается при изменении метаболического статуса клеток, например, под влиянием протонофоров или при переходе клеток к фазе деления.

Исходя из экспериментальных и теоретических данных, можно полагать, что результат накопления и распределения молекул ФС в клетках определяется не только физико-химическими свойствами их молекул (зарядом, гидрофобностью), но и уровнями трёх ТМП, сопряжённых с энергетикой клеток и их митотической активностью [8,11,12,14], а именно: *отрицательными электрическими* ТМП на плазматической и митохондриальных мембранах и *положительным электрическим* ТМП на внутренней ядерной мембране. Исходя из этого, кинетические процессы для заряженных ФС целесообразно моделировать на основе электродиффузной теории Нернста-Планка [4].

В предыдущей работе [13] для описания взаимодействия хлориновых ФС и флуорохрома ДСМ с клетками была использована *линейная* модель в виде системы 4-х дифференциальных уравнений первого порядка с сохраняющимися постоянными значениями ТМП на всех мембранах во время диффузии анионного хлорина Е6 или катионов ДСМ в клетку. Для такой системы были получены аналитические решения для концентраций этих веществ во внутренних мембранных отсеках при различных энергетических состояниях клеток.

**Цель работы.**

Целью данной работы является математическое моделирование кинетики поступления заряженных ФС в мембранные отсеки лимфоидных клеток (ЛК) для заданных переменных ТМП-ов на мембранах митохондрий и ядра и получение решений для этой модели (системы нелинейных дифференциальных уравнений) на основе вычислительного компьютерного эксперимента.

**Методы, объекты и материалы.**

В работе моделировали кинетику распределения хлорина Е6 (анионного типа) [2] и его производного диметилового эфира (ДМЭ) (с катионными свойствами) [12] в клетках лимфоидного типа на основе электродиффузной теории Нернста-Планка [4]. Кинетическую задачу решали в рамках модельной системы из четырех параллельно-последовательных ячеек: внешняя среда (0), цитоплазма (1), митохондрии (2), ядро (3), разделенных полупроницаемыми мембранами с определёнными начальными ТМП на плазматической и внутренних мембранах митохондрий и ядра. При этом в модели не учитываются обратные потоки выхода хлориновых ФС из мембранных ячеек в среду или в цитоплазму, поскольку процесс далёк от стационарного состояния в первые минуты.

Для растворимых амфифильных ФС считаем, что в клетку и внутрь органелл переносятся только молекулы, занявшие центры связывания на поверхностях соответствующих мембран. Проницаемость мембраны P=DK/d, где D – коэффициент диффузии молекул ФС через мембрану, K – константа распределения ФС между мембраной и средой (отражает их гидрофобные свойства), d– толщина мембранного слоя.

В данной работе за основу взята наша предыдущая линейная модель в виде системы 4-х дифференциальных уравнений с постоянным потоком ФС (b) через внешнюю мембрану, и с постоянными ТМП на мембранах митохондрий и ядра, представленная в [16]. Однако, в новом варианте модели уравнения *нелинейные* (1), так как задали снижение градиентов электрических полей на мембранах митохондрий и ядра во время проникновения ФС через мембраны:

$$\frac{dx_0}{dt} = a_{01}x_1 - b$$
$$\frac{dx_1}{dt} = b + a_{11}x_1 - a_{22}x_2 - a_{33}x_3$$
$$\frac{dx_2}{dt} = a_{21}x_1 + a_{22}x_2$$
$$\frac{dx_3}{dt} = a_{31}x_1 + a_{33}x_3 \ , \qquad (1)$$

где $x_i$ - количество ФС в i-й ячейке, $dx_i/dt$ - потоки вещества, $\boldsymbol{a}_{ij}$- константы скоростей переноса ФС через мембраны (при b = 1 мкМ/сек).

Таким образом, коэффициенты $a_{ij}$ отражают скорости переноса ФС через разные мембраны в системе уравнений (1) и зависят от изменения величины и направления ТМП (Δφ), проницаемости (P) мембран, а также от величины и знака заряда (z):

$$\boldsymbol{a} \approx P\boldsymbol{f}(zF_{\phi}) \qquad (2)$$

В нашей модели считаем, что начальные значения ТМП в митохондриях и ядре ($\Delta\varphi_2$ и $\Delta\varphi_3$) снижаются *экспоненциально* с заданными модулирующими параметрами α и β скорости изменения поля в митохондриях и ядре соответственно.

Для решения уравнений на базе вычислительного эксперимента необходимо введение в модель реальных переменных коэффициентов $\boldsymbol{a}_{ij}$. С этой целью использовали экспериментальные данные роста средней интенсивности флуоресценции ФС в лимфоидных клетках

культуры RAJI [12], инкубированных с хлорином Е6 или с ДМЭ. Начальные значения $a_{11}$ перехода ФС через плазматическую мембрану в цитоплазму определяли по наклонам линейной части экспериментальных кривых для ФС по аналогии с кинетической задачей для отдельной мембранной везикулы [4]. Тогда константа скорости переноса $a$ однозарядной молекулы через мембрану везикулы определяется так:

$$a_{12} = P\frac{zF}{RT}\cdot\frac{(\varphi_1-\varphi_2)}{1-\exp\left[\frac{zF}{RT}(\varphi_2-\varphi_1)\right]} \qquad (3)$$

Используя экспериментальные данные $a_{11}$ для каждого ФС, определяли Р внешней мембраны для них по формуле (3) при условии постоянного внешнего $\Delta\varphi_1$, затем получали математические выражения для $a_{ij}$ в мембранах митохондрий и ядра с переменными $\Delta\varphi_2(t)$ и $\Delta\varphi_3(t)$ соответственно. Для упрощения в модели полагали Р постоянной во всех мембранных отсеках клеток. Далее, подставляя в уравнения (1) формулы для всех $a_{ij}$ при разных заданных параметрах $\alpha$ и $\beta$, проводили вычислительный эксперимент на компьютере с помощью специальной программы [14] и получали решения уравнений для x(t) в виде кинетических кривых изменения количества каждого ФС в трёх мембранных ячейках клеток.

С целью демонстрации свойств и возможностей флуоресцентного зонда – катиона ДСМ (4-(n-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний) [5] для моделирования и оценки состояния клеток в работе получены микрофотографии лимфобластоидных клеток линии МТ4 (лаб. клеточных культур НИИ им. Н. Ф. Гамалеи), окрашенных ДСМ (10 мкМ) в течении 20-30 минут при 37°С до и после их инкубации с протонофором 2.4-ДНФ (1мМ). Приготовление витальных препаратов этих клеток, исследование их под микроскопом (Люмам И2) и микрофотографирование производили в режимах, описанных ранее в нашей работе [11].

**Результаты и обсуждение.**

В работе получена математическая кинетическая модель в виде системы 4-х нелинейных дифференциальных уравнений (1), описывающих изменение количества заряженных ФС-хлоринов в мембранных отсеках (цитоплазме, митохондриях, ядре) лимфоидных клеток (ЛК) при переменных ТМП в митохондриях и ядрах. Как правило, опухолевые клетки обладают повышенной пролиферативной активностью в условиях нормальной оксигенации, но имеют сниженные ТМП на внешней и ядерной мембранах согласно экспериментальным данным [9,11].

Исходя из этого, для нашей модели были заданы следующие исходные значения ТМП на внутренних мембранах митохондрий ($\Delta\varphi_2$) и ядра ($\Delta\varphi_3$) в ЛК:

$\Delta\varphi_2(t) = A_2(0)\exp(-\alpha t)$, $A_2(0) = -120$мВ
$\Delta\varphi_3(t) = A_3(0)\exp(-\beta t)$, $A_3(0) = +20$мВ (4)

Внешний ТМП для таких клеток считаем постоянным в пределах времени эксперимента: $\Delta\varphi_1(t) = A_1 = -20$ мВ.

В таблице 1 представлены расчётные константы $a_{ij}$ для ДМЭ и Е6, которые отражают начальные скорости проникновения заряженных ФС из среды в цитоплазму, в митохондрии и ядро клеток.

***Таблица 1. Константы скоростей переноса ($a_{ij}$) для двух ФС через внешнюю ($a_1$), митохондриальную ($a_2$) и ядерную ($a_3$) мембраны в ЛК с учётом заряда ФС и направления ТМП электрического поля в мембранах.***

| ***ФС*** | $a_{01} = a_{33}$ | $a_{11} = a_{21} = a_{31}$ | $a_{22}$ |
|---|---|---|---|
| *Хлорин Е6*$^-$ | *0,30* (по полю) | 0, 20 *(против поля)* | *0,04* (против поля) |
| *ДМЭ*$^+$ | *0,25 (против поля)* | *0.60* (по полю) | *6.25* (по полю) |

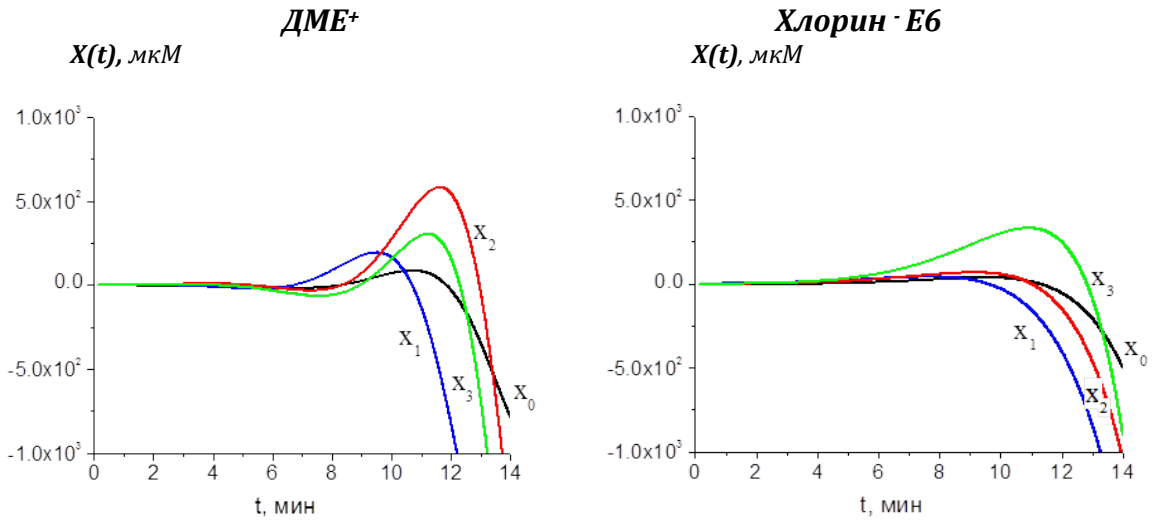


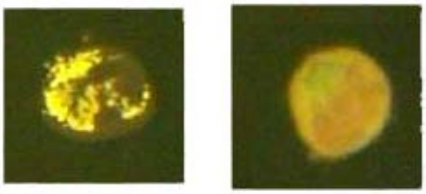

***Рисунок 1. Результаты вычислительного эксперимента: изменение количества X(t) хлориновых ФС в среде (0), цитоплазме - 1, митохондриях - 2 и ядре - 3 лимфоидных клеток с переменными ТМП.***

На основе построенной модели провели вычислительный эксперимент на компьютере и получили численные решения системы уравнений в виде кинетических кривых x(t) -изменения количества каждого ФС в цитоплазме, митохондриях и ядре клеток. Из сопоставления полученных результатов выяснили, что решения наиболее корректны при параметрах модуляции **α = 0,3 и β = 0,1**, отражающих скорости снижения ТМП в митохондриях и ядре соответственно. На Рисунке 1 представлены результаты этого вычислительного эксперимента.

Как можно видеть, при длительном времени эксперимента, когда мембраны уже деполяризованы, получаются некорректные решения (в отрицательной зоне). Это связано и с некоторыми ограничениями, заданными нашей моделью (1). Тем не менее, характер полученных кинетических функций свидетельствует о значимости электрических свойств молекул ФС (распределения в них зарядов) и о влиянии ТМП на распределение этих ФС между митохондриями и ядром. На рисунке 1 можно видеть, что различия проявляются в противоположном характере изменения X(t) при взаимодействии ФС с мембранами в митохондриях ($x_2$) и в ядрах ($x_3$) в первые минуты

Из сравнения полученных результатов следует, что диффузия хлорина Е6 происходит весьма медленно в цитоплазму и митохондрии, но быстрее через ядерную мембрану с исходно положительным ТМП, напротив, ДМЕ быстрее проникает в цитоплазму и в митохондрии с отрицательными ТМП. Таким образом, согласно результатам нашего моделирования, можно полагать, что повышение скорости поступления ДМЕ в ЛК по сравнению с кинетикой Е6 в экспериментах обусловлено не только повышением гирофобности ДМЕ за счёт дополнительной группы CH, но и положительным зарядом на азоте в его молекулах [12].

Наблюдаемая медленная кинетика хлорина Е6 в клетках *in vitro* [2,12] согласуется с предыдущими нашими исследованиями красной флуоресценции хлорина Е6 в опухолевых клетках, циркулирующих в крови, которая проявляется только спустя 1 час и более после введения Е6 *in vivo* больному [15]. При этом выявление опухолевых клеток и гистофрагментов с красной флуоресценцией хлоринов в нативной крови возможно только при совместной инкубации этой крови с катионным ДСМ *in vitro*, который замедляет фотодинамическое тушение хлорина Е6, контрастируя зоны его накопления и дополнительно выявляя клетки с активными митохондриями по желтой флуоресценции.



***а*** ***б***

***Рисунок 2 Лимфобластные клетки в свете флуоресценции зонда -катиона ДСМ (10 мкМ): а ) видны яркие желтые активные митохондрии, б) после инкубация с 2.4 –ДНФ, бледно-зелёные митохондрии почти не видны, яркая оранжевая флуоресценция в ядре. Об. $90^X$ МИ.***

В связи с нашей задачей и полученными результатами важно отметить информативность потенциал-чувствительного ДСМ как молекулярной модели для визуализации распределения катионных молекул в клетках и как инструмента-зонда для оценки ТМП клеток в разных состояниях [6,7,10,15].

На Рисунке 2 представлены флуоресцентные изображения лимфобластных клеток линии МТ4 в свете флуоресценции ДСМ в разных энергетических состояниях. После инкубации клеток в среде с протонофором 2,4-ДНФ [8] происходит деполяризация мембран в митохондриях и ядрах. При этом катионы ДСМ уже не накапливаются в деэнергизированных митохондриях, но проникают в ядра, утратившие положительный ТМП, где возникает ярко-оранжевая флуоресценция ДСМ, связанного с отрицательными фосфатами нуклеотидов [10]. По насыщению катионов ДСМ в митохондриях клеток можно оценить исходные ТМП с помощью методики [5,8] и использовать эти данные для моделирования и прогноза эффективности аккумуляции заряженных ФС и других противоопухолевых препаратов в клетках.

Таким образом, на основе разработанного нами биофизического подхода гетерогенные состояния клеток (в культуре, опухоли или крови) можно охарактеризовать с помощью трёх электрических ТМП-ов. Сравнительный анализ наших данных позволяет предположить, что сумма этих ТМП в перспективе может быть фундаментальным инвариантом нормы клеток, а его изменения энергетическим критерием перехода клеток в разные состояния, включая их злокачественную трансформацию при разных воздействиях.

**Выводы.**

Представлена модель кинетики поступления хлориновых ФС в мембранные отсеки в лимфоидных клетках в виде 4-х нелинейных дифференциальных уравнений с переменными градиентами электрических полей на мембранах митохондрий и ядра, которая оказалась информативной и достаточно корректной в первые 10-14 минут вычислительного эксперимента.

Решения этой системы уравнений, полученные с помощью компьютерной программы, указывают на значимость электрических свойств ФС и влияния ТМП на распределение ФС между цитоплазмой, митохондриями и ядром, которое проявляется в противоположном характере накопления хлориновых Е6 и ДМЕ в этих органеллах.

Предполагается, что сумма трёх ТМП-ов, которую можно оценивать по флуоресценции зонда ДСМ в клетках, значима как фундаментальный инвариант для характеристики нормы и патологии различных клеток.

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

Получена оригинальная модель распределения хлориновых ФС в лимфоидных клетках в виде нелинейных дифференциальных уравнений с переменными ТМП на внутренних мембранах, в которой использована концепция о существовании положительного градиента электрического поля на ядерной мембране. Впервые с помощью вычислительного эксперимента

получены численные решения кинетических уравнений для ФС в виде графиков функций, демонстрирующих тенденцию в распределении хлориновых ФС между митохондриями и ядром при переменных ТМП.

Применение таких моделей в сочетании с потенциал-чувствительным флуоресцентным зондом ДСМ перспективно для прогноза эффективности флуорохромов, используемых в онкологии в качестве красителей и терапевтических средств.

**Литература.**


1. Гельфанд М.Л. Фотодинамическая терапия в онкологии // Практическая онкология. 2007. Т.8. №4. С. 204-210.
2. Wei Luo, Rong-Sen Liu,Jian-Guo Zhu, Ying-Chao Li, Hong-Chen Liu. Subcellular location and photodynamic therapeutic effect of chlorin e6 in the human tongue squamous cell cancer Tca 8113 cell line // Oncology Letters.2014. November 20. P. 551-556.
3. Хайруллин Р.М., Михеева Н.А. , Семенова М.А., Терентюк Г.С., Михеев В.А., Столбовская О.В., Гальчин А.В. Влияние наночастиц золота на митохондриальный потенциал и на концентрацию активных форм кислорода опухолевых клеток в различные периоды клеточного цикла in vitro // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 4. С. 56-59.
4. Веренинов А.А., Малахова И.И. Транспорт ионов у клеток в культуре. Л.: Наука, 1986.
5. Добрецов Г.Е., Косников В.В., Морозова Г.И., Лихачева Л.М., Айдыралиев Р.К., Владимиров Ю.А. Измерение градиента концентрации флуоресцентного зонда - катиона ДСМ на цитоплазматической и митохондриальной мембранах// Биологические мембраны. 1986. Т. 3. № 3. С. 266-273.
6. Морозова Г.И., Онищенко Н.А., Оржеховская И.Г., Коробкова Е. Н., Полосина О.В., Базиева Ф.Х., Баукина О.В. Микрофлуориметрический метод идентификации и оценки физиологического состояния лимфоцитов и нейтрофилов в цельной нативной крови с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ: клиника и эксперимент // Гематология и трансфузиология. 1997. Т. 42. № 3. С. 43-47.
7. Morozova G.I., ParkhomenkoT.V., Klitsenko O.E., Tomson V.V. Stimulating. Effect of Erythropoietin on Thymocyte Energetics Established in vitro with Potential sensitive Fluorescent Probe // Biochemistry Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. Moscow. 2007. V.1. No 4. P. 325-330.
8. Морозова Г.И. Трансмембранные потенциалы и митохондриальная активность клеток // Практикум по курсу «Введение в биофизику». РУДН: 2013. 21 с.
9. Тарнопольская О. В., Непомнящая Е. М., Бирбраер В. М., Тюрбеева М. Л., Макарова Е. И. Средний мембранный потенциал клеток опухолей пяти гистотипов. //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 10. С.108-109.
10. Морозова Г.И., Полетаев А.И., Борщевская Т.А. Инвертированный электрохимический потенциал на ядерной мембране клеток и его связь с клеточной энергетикой // Труды 2-го съезда биофизиков России. 1999. С. 256-257.
11. Морозова Г.И., Корнилаева Г.В., Подчерняева Р.Я., Куленич Т.М., Боженко В.К. Исследование влияния КВЧ-излучения миллиметрового диапазона на мембранные структуры в культуре Т-лимфобластоидных клеток с помощью флуоресцентного зонда-катиона ДСМ //Биомедицинская радиоэлектроника. 2014. № 11. С. 31-38.
12. Зорина Т.Е., Янковский И.В., Зорин В.П. Внутриклеточная локализация и накопление этерифицированных производных Е6 // Медико-биологические основы жизнедеятельности. Минск: 2012. С.153-155.
13. Askarova K.Z., Morozova G.I., Anoshin A.A. Modeling the Accumulation Kinetics of Anionic Photo-sensitizers in Tumor Cells with Different Trans-membrane Potentials // J. Mech.Cont.& Math. Sci., Special Issue-1, March. 2019. P. 483-490.

14. http://www.softwizard.ru/redirect-url.aspx?redirect_url=http://www.originlab.com/index.aspx?go=PRODUCTS/OriginPro
15. Морозова Г.И., Борисов В.А. Сопряжённые флуоресцентные эффекты фотосенсибилизатора хлорина и катионного зонда ДСМ в нативной крови онкобольных до и в процессе ФДТ. Труды V съезда биофизиков России, 2015: Ростов-на-Дону. С. 25

**Сведения об авторах**

***Галина Ивановна Морозова***
*Кандидат биологических наук, доцент, зав. лабораторией цитофизических тестов*
*Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: gimorozova@mail.ru*

***Камила Зуфаровна Аскарова***
*аспирант,*
*Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: kamilaska24@gmail.com*

**Information about author**

***Galina Ivanovna Morozova***
PhD (*Biolog), associate professor,*
*Head laboratory of cytophysical tests*
*Lumumba Russian Peoples' Friendship University*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: gimorozova@mail.ru*

***Kamila Zupharovna Askarova***
*graduate student*
*Lumumba Russian Peoples' Friendship University*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: kamilaska24@gmail.com*

УДК 577.112
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.98-101

**М.А. Семенова[1], О.М. Смирнова[1], Д.Л. Какуев[1], А.А. Пахомов[1], Д.А. Долгих[1,2], Р.В. Черткова[1]**
[1]Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН
[2]Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

## ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ НЕЙРОГЛОБИН

*Данная статья посвящена получению и исследованию модельной клеточной линии, экспрессирующей нейроглобин. Получены данные, свидетельствующие в пользу проявления антиапоптотических свойств нейроглобином в условиях запуска апоптоза по цитохром С-зависимому пути.*

***Ключевые слова:*** *нейроглобин, цитохром С, апоптоз, HEK293T*

**M.A. Semenova[1], O.M. Smirnova[1], D.L. Kakuev[1], A.A. Pakhomov[1], D.A. Dolgikh[1,2], R.V. Chertkova[1]**
[1]Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS
[2]Biological faculty, Lomonosov Moscow State University

## DEVELOPMENT OF MODEL CELL LINE EXPRESSING NEUROGLOBIN

*This article is devoted to the construction and study of a model cell line expressing neuroglobin. The obtained data show the manifestation of anti-apoptotic properties by neuroglobin under conditions of apoptosis via the cytochrome C-dependent pathway.*

***Keywords****: neuroglobin, cytochrome C, apoptosis, HEK293T*

### Введение

Нейроглобин (Ngb) – гемсодержащий белок из семейства глобинов, обладающий

нейропротекторной функцией [1, с. 520]. Предполагается, что Ngb способен взаимодействовать с цитохромом С (Cyt C) после транслокации последнего через митохондриальную мембрану в цитозоль и тем самым предотвращать участие Cyt C в сборке апоптосомы и, следовательно, запуск апоптоза по внутреннему пути [2, с. 2306; 3, с. 4884]. Однако ни механизмы взаимодействия Ngb и Cyt C, ни структура реакционного комплекса Ngb/Cyt C доподлинно не известны [4, с. 3]. В рамках исследования механизмов реализации нейропротекторного действия Ngb нами получена модельная линия транзиентных клеток HEK293T, продуцирующих Ngb дикого типа (WT) и позволяющая исследовать антиапоптотические свойства Ngb (и в дальнейшем – его мутантных вариантов) в условиях окислительного/нитрозативного стресса.

**Цель работы** – получить модельную клеточную линию, экспрессирующую Ngb и показать антиапоптотическое действие Ngb в условиях запуска апоптоза по внутреннему пути.

**Материалы и методы.** Ген Ngb человека был синтезирован из олигонуклеотидных праймеров (Евроген, Россия) и клонирован в вектор pcDNA-Zeo-IRES2-EGFP по сайтам рестрикции *Nhe* I и *Bam*H I.

В качестве линии эукариотических клеток для трансфекции вектором pcDNA-Zeo-Ngb-IRES2-EGFP мы выбрали линию клеток почек эмбриона человека HEK293T (Human Embryonic Kidney 293). Клетки HEK293T высевали в 96-луночный планшет ($10^4$ клеток/лунку) в 100 мкл среды ДМЕМ и выращивали в течение ночи. При приготовлении комплекса ДНК и трансфицирующего агента использовали бессывороточную среду ДМЕМ/F12. Трансфекционный комплекс (10 мкл), содержащий 100 нг/лунку ДНК и трехкратный избыток трансфицирующего агента (по протоколам производителей), прикапывали к клеткам на планшете и инкубировали в течение 4 ч при 37°C и 5% $CO_2$. Далее меняли ростовую среду и инкубировали клетки в течение ночи.

Для индукции стресса в трансфицированных клетках HEK293T использовали следующие вещества: трет-бутилгидропероксид (t-BOOH) (Sigma, США) и бензилвиологен дихлорид (Bv) (Sigma, США). Индукторы окислительного и нитрозативного стресса добавляли к трансфицированным клеточным культурам на планшетах в свежую питательную среду ДМЕМ (50 мкл) в диапазоне концентраций от 0,01 до 1 мМ для t-BOOH и от 0,005 до 0,5 мМ для Bv. Далее инкубировали планшеты с клеточными культурами в интервале времени от 30 мин до 18 ч во влажной атмосфере с 5% CO2 при 37°C. Детекцию апоптотических и некротических клеток в культурах, обработанных индукторами окислительного и нитрозативного стресса осуществляли с помощью флуоресцентной микроскопии после окрашивания прижизненными красителями-репортерами аннексином V и йодистым пропидием. Для конъюгации с аннексином V (Люмипроб, Россия) использовали производное Кумарина 343, активированное N-гидроксисукцинимидом (NHS-эфир, AF343, Люмипроб, Россия), реакционноспособное по отношению к аминогруппам белка.

По окончании инкубации с индукторами окислительного и/или нитрозативного стресса Bv и t-BOOH адгезированные клетки промывали охлаждённым PBS, добавляли в лунки буфер для связывания (10 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, 2.5 мМ CaCl2, pH 7,4). Затем в каждую лунку добавляли 2-5 мкл раствора (0,8 мг/мл) аннексина V-AF343 и инкубировали в течение 10-15 мин. После этого добавляли 400 мкл буфера для связывания и 5 мкл йодистого пропидия (100 мкМ), после чего вновь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.

**Полученные результаты**.

Экспрессия в эукариотических клетках гена Ngb совместно с геном подходящего флуоресцентного белка-репортера (например, с геном EGFP) существенно упрощает детекцию и отбор трансфицированных клеток, т.е., в конечном счете, детекцию клеток, экспрессирующих Ngb. Поэтому в качестве векторной конструкции для осуществления трансфекции линии эукариотических клеток было решено использовать бицистронный вектор (в частности, pcDNA-Zeo-IRES2), несущий гены нескольких белков и обеспечивающий коэкспрессию генов в относительно постоянных стехиометрических соотношениях. В качестве белка-

репортера экспрессии Ngb в трансфицированных клетках, нами был выбран ген зеленого флуоресцентного белка EGFP, клонированный в бицистронный вектор pcDNA-Zeo-IRES2 в качестве второго цистрона по сайтам рестрикции EcoR I и Not I. Нами была выбрана клеточная линия HEK293T, которая отличается простотой культивирования, надежным ростом культуры и высокой эффективностью трансфекции (может достигать до 100 %). Перед трансфекцией клеток HEK293T целевой конструкцией была выполнена оптимизация протокола с использованием бицистронного вектора pcDNA-Zeo-IRES2-EGFP (до клонирования в него нейроглобина), несущего ген флуоресцентного белка-репортера EGFP. В качестве трансфицирующих агентов использовали FuGENE (Promega, США), PEI 40K (Servicebio, Китай), GenJect-U (Россия). По итогам эксперимента PEI 40K был выбран как наиболее эффективный трансфицирующий агент.

Известно, что программируемая клеточная гибель клеток по цитохром С-зависимому (внутреннему) пути может быть активирована в условиях окислительного и/или нитрозативного стресса, поэтому для индукции стресса в трансфицированных клетках HEK293T использовали такие реагенты, как трет-бутилгидропероксид (t-BOOH) и дихлорид бензилвиологен (Bv) в различных концентрациях.

Для детекции апоптотических клеток, после обработки клеточной культуры индукторами окислительного и нитрозативного стресса нами подобран подходящий флуоресцентный краситель-репортер кумарин 343, конъюгированный с аннексином V. Разработана и оптимизирована методика конъюгирования, и аннексин V, меченый красителем кумарином 343, получен в количествах, достаточных для проведения исследований. Подобраны оптимальные условия связывания полученного конъюгата, а также йодистого пропидия с клеточными культурами, обработанными индуктором апоптоза Bv.

С помощью флуоресцентной микроскопии окрашенных аннексином V-AF343 и йодистого пропидия клеток показано, что при обработке клеточных культур t-BOOH в низких концентрациях (от 0,01 до 0,05 мМ) не наблюдалось никакого эффекта даже в течение 18-20 ч, тогда как увеличение концентраций до 0,1 и 0,5-1 мМ приводило к появлению большого количества мертвых клеток (до 100 %) уже через 30 мин инкубации. При обработке клеточных культур Bv в концентрациях от 0,1 до 0,5 мМ также наблюдалось массовая гибель клеток, однако при снижении концентраций на порядок (от 0,05 до 0, 01 мМ) уже в течение 30 мин появлялись апоптотические клетки.

Таким образом, оптимальными условиями индукции апоптоза в транзиентной клеточной культуре HEK293T, экспрессирующей нейроглобин, является обработка Bv в концентрациях от 0,01 до 0,05 мМ, в течение 30 мин при комнатной температуре. Анализ микрофотографий и их наложений позволил нам заключить, что клетки, экспрессирующие Ngb (WT), практически не окрашиваются ни аннексином V, конъюгированным с кумарином 343, ни йодистым пропидием. В то же время, среди интактных клеток присутствуют как находящиеся в стадиях апоптоза, так и некротические клетки. Это позволяет нам утверждать, что как минимум в подобранных условиях оксидативного/нитрозативного стресса Ngb обладает антиапоптотическими свойствами и оказывает на клетки протекторное действие

**Выводы.**

Таким образом, нами был сконструирован бицистронный вектор pcDNA-Zeo-Ngb-IRES2-EGFP для трансфекции эукариотических клеток. Подобраны оптимальные условия трансфекции клеток линии HEK293T с помощью полученного вектора. Также подобраны оптимальные условия индукции апоптоза в клеточной линии и проведен качественный анализ антиапоптотических свойств Ngb (WT) в условиях индуцированного по Cyt C-зависимому (внутреннему) пути апоптоза. Показано, что Ngb, экспрессирующийся в клетках транзиентной культуры HEK293T, эффективно предотвращает апоптоз в условиях оксидативного/нитрозативного стресса.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: получена модельная клеточная линия, экспрессирующая Ngb (WT), подобраны

условия для индукции апоптоза по внутреннему пути, показана антиапоптотическая активность Ngb в данных условиях.

**Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00985).**

**Литература.**

1. Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain // Nature. 2000. V. 407. P. 520–523.
2. Brittain T., kommer J., aychaudhuri S., Birch N. An Antiapoptotic Neuroprotective Role for Neuroglobin / I nt. J. Mol. Sci. 2010. V. 11. P. 2306–2321.
3. Fago A., Mathews A.J., Moens L., Dewilde S., Brittain T. The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome *b5* and cytochrome *c* // FEBS Let. 2006. V. 580. P. 4884–4888.
4. Semenova M.A., Chertkova R.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A. Molecular interactions between neuroglobin and cytochrome *c*: possible mechanisms of antiapoptotic defence in neuronal cells // Biomolecules. 2023. V. 13. P. 1233.

**Сведения об авторах**

***Марина Андреевна Семенова***
*Аспирант, м.н.с.*
*Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН Москва, Россия*
*Эл. почта:marinaapbch@mail.ru*

***Ольга Михайловна Смирнова***
*Студент магистратуры, инженер-исследователь*
*Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:olyasmirnova00@mail.ru*

***Дмитрий Леонидович Какуев***
*Инженер-исследователь*
*Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:dkakuev@mail.ru*

***Алексей Александрович Пахомов***
*К.х.н.,с.н.с.*
*Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: alpah@mail.ru*

***Дмитрий Александрович Долгих***
*Д.б.н., профессор, г.н.с.*
*Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:dolgikh@nmr.ru*

***Рита Валерьевна Черткова***
*К.б.н., с.н.с.*
*Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН*
*Москва, Россия,Эл. почта:cherita@inbox.ru*

**Information about authors**

***Marina Andreevna Semenova***
*PhD student, Junior researcher*
*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: marinaapbch@mail.ru*

***Olga Mikhailovna Smirnova***
*Master student, Research engineer*
*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: olyasmirnova00@mail.ru*

***Dmitry Leonidovich Kakuev***
*Research engineer*
*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: dkakuev@mail.ru*

***Alexey Alexandrovich Pakhomov***
*PhD(Chem.), Senior researcher*
*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: alpah@mail.ru*

***Dmitry Aleksandrovich Dolgikh***
*Doctor of Science(Biol.), Professor, Chief researcher*
*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: dolgikh@nmr.ru*

***Rita Valerevna Chertkova***
*PhD (Biol.), Senior researcher*
*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: cherita@inbox.ru*

УДК [597.552.511:639.33]: 577.115 + 577.15
ГРНТИ 69.25
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.102-106

**С.Н. Хуртина, С.А. Мурзина, М.В. Кузнецова, Н.Н. Немова**
Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук"

# АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДЕСАТУРАЗ И ЭЛОНГАЗ У МОЛОДИ (0+) АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ *SALMO SALAR* L., ВЫРАЩИВАЕМОГО В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ ЮЖНОГО РЕГИОНА

*Проведен анализ относительного уровня экспрессии генов десатураз и элонгаз (fadsd5, fadsd6, elovl2, elovl5a), участвующих в биосинтезе длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот, в печени молоди атлантического лосося Salmo salar Linnaeus, 1758, содержащегося при разных режимах освещения и кормления в условиях аквакультуры южного региона.*

***Ключевые слова:*** *относительный уровень экспрессии генов, атлантический лосось, Salmo salar L, десатуразы, элонгазы, аквакультура*

**S.N. Khurtina, S.A. Murzina, M.V. Kuznetsova, N.N. Nemova**
Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS)

# ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN ATLANTIC SALMON FINGERLINGS (0+) *SALMO SALAR* L. REARED IN THE AQUACULTURE IN THE SOUTHEN REGION

*The analysis of the relative level of expression of the genes of desaturases and elongases (fadsd5, fadsd6, elovl2, elovl5a), involved in the biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids, was carried out in the liver of juvenile Atlantic salmon Salmo salar Linnaeus 1758, reared under different photoperiod and feeding regimes in aquaculture of the southern region.*

***Key words:*** *relative gene expression level, Atlantic salmon, Salmo salar L, desaturases, elongases, aquaculture*

## Введение

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) играют важную роль в организме любого позвоночного животного, в том числе рыб, особенно в процессе их раннего развития [1]. ПНЖК важны не только как структурные компоненты биомембран, но и как универсальные эндогенные биорегуляторы, например, посредством их производных эйкозаноидов, в качестве лигандов транскрипционных факторов и др. [1,2]. Способность к биосинтезу этих ЖК, содержащих две и более двойные связи, существенно варьирует у разных видов рыб и во многом зависит не только от состава и функций генов ферментов, участвующих в этом процессе, но и дополнительно определяется транскрипционными, посттранскрипционными и эпигенетическими регуляторными механизмами, которые в свою очередь модулируются факторами окружающей среды [3].

Известно, что в отличие от большинства морских рыб, представители пресноводных и анадромные рыбы из сем. Лососевые способны к биосинтезу длинноцепочечных ПНЖК [1,4]. Последовательные реакции добавления двойной связи и удлинения цепи незаменимых линолевой 18:2(n-6) и линоленовой 18:3(n-3) ЖК проходят в организме рыб за счет согласованного действия ферментов десатураз и элонгаз, обладающих различной активностью и субстратной специфичностью [5]. Среди лососевых рыб биосинтез ПНЖК наиболее изучен у атлантического лосося *Salmo salar* L. и форели *Oncorynchus mykiss*, которые являются важными промысловыми объектами ввиду высокого содержания эссенциальных 20:5(n-3) (ЭПК) и 22:6(n-3) (ДГК) ЖК [3]. Однако большая часть исследований посвящена изучению экспрессии генов элонгаз и десатураз в ответ на изменение состава корма лососевых рыб [6-8], тогда

как практически отсутствуют данные по влиянию фотопериода и суточного режима питания на разных этапах их роста и развития.

Целью данной работы являлся анализ относительного уровня экспрессии ключевых генов (*fadsd5, fadsd6, elovl2, elovl5a*) элонгаз и десатураз в печени сеголеток атлантического лосося, содержащегося при разных режимах освещения и кормления в условиях аквакультуры в ноябре, в период до т.н. "зимнего окна" (воздействие короткого фотопериода с последующим увеличением его продолжительности для соблюдения сезонного фотопериодизма).

**Материалы и методы**

Исследовали сеголеток (0+) атлантического лосося *S. salar* L., выращиваемого в условиях южного региона на рыбоводном хозяйстве ООО «Остров Аквакультура» (Республика Северная Осетия-Алания, Россия). После перехода на экзогенное питание сеголетки были помещены в бассейны с непрерывным освещением (24LD) для стимуляции эндогенных механизмов, влияющих на ростовые процессы. В августе рыб средней массой 2,3 г пересадили в выростные лотки размером 4х1,2 м, объемом 2,5-2,7 м3, в количестве 4900 особей/лоток. С начала сентября их, разделили на три группы по 2 лотка и стали содержать в следующих условиях:

1. «24LD+КК»: режим освещения постоянный (24LD), кормление круглосуточное (КК);
2. «ЕстLD+КД»: естественное освещение (ЕстLD), кормление в светлое время суток (с 06:00 до 18:00 в сентябре, с 08:00 до 18:00 в октябре, с 08:00 до 17:00 в ноябре), через каждые два часа (КД);
3. «24LD+КД»: режим освещения постоянный (24LD), кормление только в светлое время суток как у рыб из группы «ЕстLD+КД».

Для молекулярно-генетического анализа в ноябре были отобраны по 5 особей рыб из каждой экспериментальной группы («24LD+КК», «ЕстLD+КД», «24LD+КД»). Средняя длина для сеголеток экспериментальных групп варьировала в пределах от 11 до 13,3 см, а вес от 14,6 до 16,2 г. Образцы печени взвешивали и фиксировали в жидкий азот, хранили при температуре -80 оС до начала анализа. С декабря по март дополнительное освещение в экспериментальных лотках не применялось ("зимнее окно").

Выделение РНК из печени лосося проводили с использованием набора "Extract RNA" (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя, обратную транскрипцию – с применением набора "MMLV RT kit" (Евроген, Россия). Анализ кДНК как матрицу для ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием системы CFX96 Touch system (BioRad, США). Праймеры к исследуемым генам ферментов десатурации и элонгации *fadsd5, fadsd6, elovl2, elovl5a* подобраны на основе данных литературы [9,10], а также с применением программы nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Амплификацию 3 мкл кДНК проводили с использованием 5 мкл набора "5х Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I" (Евроген, Россия). Инкубация проводилась при температуре 95 ºС в течение 5 минут и далее 35 циклов: денатурация при 95 ºС в течение 20 секунд, отжиг при 60 ºС в течение 30 секунд и элонгация при 72 ºС в течение 30 секунд. Ген фактора элонгации 1 (*ef1a*) был выбран в качестве референсного за счет стабильности экспрессии, в том числе в тканях печени и по образцу предыдущих исследований [4,9]. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов был подсчитан с использованием метода 2-ΔCt [11], где ΔCT – разница между средними значениями пороговых циклов для референсного (*ef1a*) и таргетного генов. Данные выражали в единицах относительной экспрессии исследуемого гена (у.ед.). Статистическая обработка данных проведена в открытой программируемой среде R. Достоверность различий данных определяли с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна-Уитни. Различия между значениями исследуемых показателей считали достоверными при $p \leq 0,05$. Биохимический анализ выполнен на базе лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН с использованием оборудования ЦКП Федерального исследовательского центра «КарНЦ РАН».

**Результаты и обсуждение**

Установлен более высокий относительный уровень экспрессии fadsd6 у рыб из групп «EctLD+КД» (2,0, p=0,012) и «24LD+КД» (2,1, p=0,012), которых кормили в светлое время суток, по сравнению со значениями для рыб группы «24LD+КК» (0,2) (Рисунок 1).

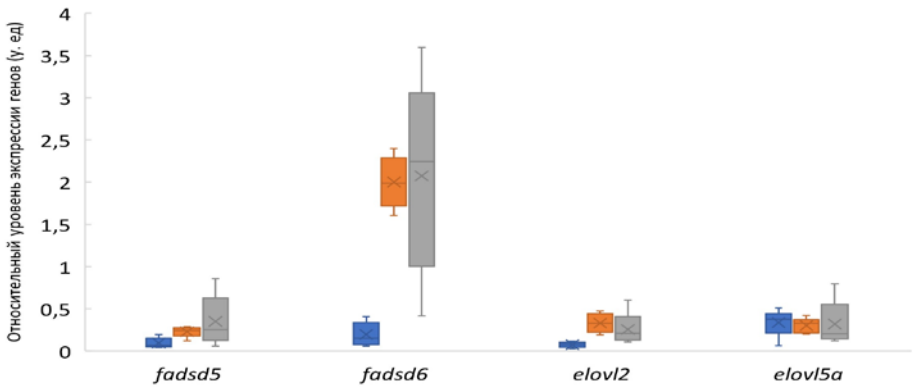



***Рисунок 1. Относительный уровень экспрессии (у.ед.) генов fadsd5, fadsd6, elovl2, elovl5a у сеголеток (0+) Salmo salar L, выращиваемого при разных режимах освещения и кормления. Цветовое обозначение разных экспериментальных режимов: синий – «24LD+КК»: режим освещения постоянный, кормление круглосуточное; оранжевый – «EctLD+КД»: естественное освещение, кормление проводилось в светлое время суток (с 08:00 до 17:00 в ноябре, через каждые два часа); серый – «24LD+КД»: режим освещения постоянный (24LD), кормление проводилось только в светлое время суток как у рыб из группы «EctLD+КД» (КД).***

Относительный уровень экспрессии elovl2 у сеголеток лосося из групп «EctLD+КД» (0,33, p=0,012), так и «24LD+КД» (0,26, p=0,021) был также достоверно выше в сравнении со значениями для рыб из группы «24LD+КК» (0,07). Известно, что фермент Δ6 десатураза способствует биосинтезу 18:4(n-3) ЖК из 18:2(n-6) ЖК, а также длинноцепочечных 24С ЖК, являющихся предшественниками в биосинтезе ДГК по пути Шпрехера, тогда как десатураза Δ5 важна на этапе биосинтеза ЭПК из 20:4(n-3) ЖК [3]. Субстратная специфичность элонгазы Elovl2 к ПНЖК с длиной цепи С20 и С22 определяет ее роль в биосинтезе 22:5(n-3) из ЭПК и также предшественников биосинтеза ДГК по пути Шпрехера [4]. Полученные по уровню экспрессии fadsd6, elovl2 данные согласуются с результатами по ЖК составу триацилглицеринов (ТАГ) в печени сеголеток лосося в ноябре, которые показали достоверно более высокий уровень ПНЖК, в том числе за счет 18:4(n-3) и 22:6(n-3), у рыб из группы «EctLD+КД» по сравнению с «24LD+КК» (21 vs 17% суммы ЖК ТАГ). При этом в сравнении с группой «24LD+КД» тенденция сохранялась, но значения достоверно не различались. По значениям ЖК ФЛ между экспериментальными группами достоверных различий установлено не было [12]. На основе вышеизложенного, а также того, что по размерно-весовым показателям у рыб разных групп различий не установлено, можно предположить, что кормление в светлое время суток может оказывать влияние на ЖК состав ТАГ, повышая содержание ПНЖК у сеголеток лосося в период «до зимнего окна».

Относительный уровень экспрессии генов fadsd5 у сеголеток лосося из группы «24LD+КК» был ниже, чем таковой у рыб из группы «EctLD+КД» (0,09 vs 0,23 p=0,02), однако при этом более высокого содержания ЭПК у рыб из «EctLD+КД» группы установлено не было. Известно, что процесс биосинтеза ПНЖК определяется не только уровнем экспрессии генов, но и активностью самого фермента, что зависит, в том числе, от посттранскрипционных и эпигенетических регуляторных механизмов.

У лосося разных экспериментальных групп не наблюдалось достоверных вариаций по уровню экспрессии elovl5a. Следует отметить, что различий по относительному уровню экспрессии исследованных генов у лосося между группами «EctLD+КД» и «24LD+КД» также не было установлено.

**Заключение**

Таким образом, исследован относительный уровень экспрессии ключевых генов (*fadsd5, fadsd6, elovl2, elovl5a*) ферментов биосинтеза ПНЖК, элонгаз и десатураз, в печени сеголеток атлантического лосося, содержащегося при разных режимах освещения и кормления в условиях аквакультуры в ноябре, в период до т.н. "зимнего окна". Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты:

1. Относительный уровень экспрессии *fadsd6* у рыб из групп «ЕстLD+КД» и «24LD+КД» был выше по сравнению со значениями для рыб группы «24LD+КК» и может быть связан с влиянием кормления в светлое время суток сеголеток лосося в течение 3-х месяцев от начала эксперимента.
2. Более высокий уровень экспрессии генов *fadsd5* и *elovl2* у сеголеток лосося, которых кормили в светлое время суток, соотносится с повышением ПНЖК за счет 18:4(n-3) и 22:6(n-3) ЖК в ТАГ в печени у рыб из этих групп.
3. Относительный уровень экспрессии *elovl5a* в печени сеголеток лосося не показал достоверных различий между экспериментальными группами.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о различиях в относительном уровне экспрессии генов десатураз и элонгаз (fadsd5, fadsd6, elovl2) у сеголеток атлантического лосося из разных экспериментальных групп. Полученные данные позволяют глубже понять адаптивные процессы на уровне липидного обмена в организме молоди атлантического лосося в процессе его роста и развития при действии разных факторов окружающей среды. Кроме того, результаты исследования могут быть использованы для разработки модификаций протоколов технологии выращивания S. salar в условиях аквакультуры с целью получения высококачественной товарной продукции.

***Работа проведена в рамках проекта Российского научного фонда № 19-14-00081-П "Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлантического лосося Salmo salar: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика", а также частично в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.***

**Литература:**

1. Tocher D.R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish // Aquaculture research. 2010. V. 41(5). P. 717–732.
2. Назаров П. Е., Мягкова Г. И., Гроза Н. В. Полиненасыщенные жирные кислоты как универсальные эндогенные биорегуляторы // Вестник МИТХТ. 2009. 4(5), 3-19.
3. Monroig Ó., Shu-Chien A.C., Kabeya N., Tocher D.R., Castro L.F.C. Desaturases and elongases involved in long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic animals: From genes to functions // Progress in Lipid Research. 2022. V. 86, Article ID 101157.
4. Morais S., Monroig Ó., Zheng X., Leaver M.J., Tocher D.R. Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of Elovl5- and Elovl2-like elongases // Mar. Biotechnol. 2009. V. 11. P. 627–639.
5. Guillou H., Zadravec D., Martin P.G., Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice // Progress in lipid research. 2010. V. 49(2). P. 186–199.
6. Leaver M.J., Villeneuve L.A.N., Obach A., Jensen L., Bron J.E., Tocher D.R., Taggart J.B. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*) // BMC Genomics. 2008. V. 9, 299. doi:10.1186/1471-2164-9-299.
7. Zheng X., Tocher D.R., Dickson C.A., Bell J.G., Teale A.J. Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Aquaculture 2004. V. 236. P. 467–483.

8. Zheng X., Torstensen B.E., Tocher D.R., Dick J.R., Henderson R.J., Bell J.G. Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturases and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // Biochim Biophys Acta. 2005b. V. 1734. P. 13–24.
9. Vestergren A.S. Regulation of Genes related to Lipid Metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) // Vitro and In Vivo Studies. Licentiate Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, 2012.
10. Norambuena F., Morais S., Emery J.A., Turchini G.M. Arachidonic acid and eicosapentaenoic acid metabolism in juvenile Atlantic salmon as affected by water temperature // PLoS One. 2015. V. 10(11), e0143622.
11. Livak K.J., Schmittgen T.D. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the* $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *method* // Methods 2001. V. 25(4). P. 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
12. Khurtina S.N., Murzina S.A., Provotorov D.S., Voronin V.P., Kuritsyn A.E., Nemova N.N. Fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L: grown under different and feeding conditions in aquaculture conditions (North Ossetia-Alania) // Russian Journal of Developmental Biology. 2024. В печати.

**Сведения об авторах**
***Хуртина Светлана Николаевна***
*Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия*
*Эл. почта: pek-svetlana@mail.ru*
***Мурзина Светлана Александровна***
*Доктор биологических наук, заведующий лабораторией экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия*
*Эл. почта: murzina.svetlana@gmail.com*
***Кузнецова Мария Викторовна***
*Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия*
*Эл. почта: kuznetsovamvi@yandex.ru*
***Немова Нина Николаевна,***
*Доктор биологических наук, академик, Главный научный сотрудник лабораторией экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия*
*Эл. почта: nnnemova@gmail.com*

**Information about author**
***Khurtina Svetlana Nikolaevna***
*Candidate of biological sciences (Ph.D.), Senior Researcher, Environmental Biochemistry Laboratory of Institute of Biology, KarRC RAS, Petrozavodsk, Russia*
*E-mail: pek-svetlana@mail.ru*

***Murzina Svetlana Alexandrovna***
*Doctor of Biological Sciences, Ph.D., Head of Environmental Biochemistry Laboratory of Institute of Biology, KarRC RAS, Petrozavodsk, Russia*
*E-mail: murzina.svetlana@gmail.com*

***Kuznetsova Maria Viktorovna***
*Candidate of biological sciences (Ph.D.), Senior Researcher, Environmental Biochemistry Laboratory of Institute of Biology, KarRC RAS, Petrozavodsk, Russia*
*E-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru*

***Nemova Nina Nikolaevna,***
*Doctor of Biological Sciences, Academician, Chief Researcher Environmental Biochemistry Laboratory of Institute of Biology, KarRC RAS, Petrozavodsk, Russia*
*E-mail: nnnemova@gmail.com*

УДК 54.066, 577.164.161
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.107-109

**Д. Д. Барцев, Я. В. Бородулин**
Институт тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова,
РТУ МИРЭА

# ИНГИБИРОВАНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ СЕЛЕНООРГАНИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТОМ ДАФС-25

*В статье обсуждаются процессы образования свободных радикалов и их влияние на биологические вещества и на селенорганическое соединение 1,5-дифенил-3-селенпентадион-1,5 (ДАФС-25). Представлены оригинальные спектрофотометрические исследования, которые показали эффективную работу ДАФС-25, как ингибитора свободных радикалов.*
***Ключевые слова:*** *биохимия, свободные радикалы, ингибитор, антиоксиданты, селен, спектрофотометрия.*

**D. D. Bartsev. Y. V. Borodulin**
Institute of Fine Chemical technologies
named after M.V. Lomonosov, RTU MIREA

# INHIBITION OF FREE RADICAL PROCESSES BY ORGANOSELENIUM PREPARATION DAFS-25

*The article are discussed the processes of free radical formation and their effect on biological substances and on the organic selenium compound 1,5-diphenyl-3-selenpentadion-1,5 (DAFS-25). The original spectrophotometric studies are presented, which have shown the effective work of DAFS-25 as a free radical inhibitor.*
***Keywords****: biochemistry, free radicals, inhibitor, antioxidants, selenium, spectrophotometry.*

## Введение

В медицинской практике широкое применение в качестве средств профилактики и лечения злокачественных новообразований находят препараты, обладающие антиоксидантным действием. Среди современных антиоксидантов наибольший интерес представляют селенсодержащие препараты, к которым относится 1,5-дифенил-3-селенпентадион-1,5 (ДАФС-25) (рис.1). В научных источниках отмечается взаимосвязь между регионами с дефицитом селена и высоким уровнем развития онкологических заболеваний жителей этой местности. [1]

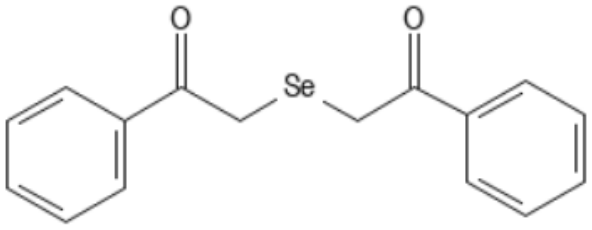



***Рис.1 – Структурная формула 1,5-дифенил-3-селенпентадиона-1,5 (ДАФС-25)***

Примерно 75 % повреждений ДНК происходят из-за взаимодействия с короткоживущими свободными радикалами. Они могут вызвать изменение генома, а также повышать экспрессию протоонкогенов, что впоследствии приведёт к развитию опухолевых процессов. [2]

В данной работе генерирование свободных радикалов осуществляется за счёт использования реакции Фентона. В ходе образуется сильный окислитель - OH• (гидроксильный радикал), вследствие взаимодействия перекиси водорода и катионов двухвалентного железа. Данная смесь получила название «реактив Фентона». [3]

Как известно, железо – это основа гемоглобина, а перекись водорода участвует во всех главных биоорганических процессах - метаболизме белков, углеводов и жиров, образовании

витаминов и минеральных солей и иммунной защите организма. Таким образом, данная реакция моделирует развитие окислительного стресса организма, что позволяет интерпретировать полученные результаты как опыты в реальных биологических системах. [4]

**Актуальность** данной работы состоит в установлении способности ДАФС-25 к ингибированию свободных радикалов, образующихся в ходе реакции Фентона, а также показать значимость дальнейших исследований в данной области в целях развития медицины и общей профилактики здоровья.

**Цель работы** – выявить ингибирующую способность ДАФС-25 по отношению к свободным радикалам, образующихся в ходе реакции Фентона.

**Материалы и методы**

Исследования проводились на спектрофотометр ПЭ-5400 УФ с использованием кварцевой кюветы с толщиной слоя 10 мм.

Условия измерений: диапазон длин волн – 250-600 нм (область отклика витамина В12); шаг измерений – 1 нм;фоновый раствор – смесь дистиллированной воды и ацетонитрила (в соотношении 50:50).

**Реактивы:** Раствор витамина В12. Рабочая концентрация в кювете – $5*10^{(-5)}$ моль/л; Раствор ДАФС-25. Рабочая концентрация в кювете – $5*10^{(-5)}$ моль/л; Вода дистиллированная. Смесь Фентона: - раствор сульфата железа (II) $FeSO_4$ (концентрация в кювете – $5*10^{(-4)}$ моль/л); - раствор пероксида водорода $H_2O_2$ (концентрация в кювете – $7,8*10^{(-4)}$ моль/л).

ДАФС-25 был приготовлен из навески 0,0792 г лекарственного препарата «Селенобел». Полученный раствор разбавили в 100 раз, из которого 40 мкл добавляли в кювету и проводили спектрофотометрические исследования.

**Экспериментальный протокол:** в кварцевую кювету добавляем по 40 мкл витамина В12 и ДАФС-25; затем делаем добавку раствора железа 20 мкл; вносим 40 мкл раствора пероксида водорода; оставляем раствор на 5 минут, чтобы реакция Фентона прошла до конца; доводим раствор фоновой смесью (вода и ацетонитрил) до рабочего объёма кюветы (4 мл).

**Полученные результаты**

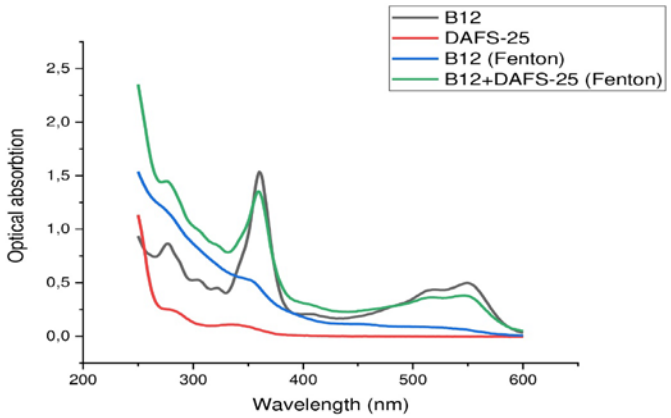



***Рис.2 – Результаты спектрофотометрического исследования: В12- спектр исходного витамина В12; ДАФС – 25 – спектр исходного препарата; В12 (Фентон) – спектральная картина после проведения реакции Фентона в среде, содержащей витамин В12; (В12 + ДАФС-25 + реактив Фентона) - спектральная картина после проведения реакции Фентона в среде, содержащей витамин В12 и препарат ДАФС-25.***

Обнаружены незначительные (около 15% от исходных максимумов поглощения) гипохромные сдвиги в полосах поглощения на максимумах длин волн 361 и 551 нм витамина В12 в растворе в присутствии ДАФС-25 в отличие от раствора, содержащего только витамин В12 в условиях проведения реакции Фентона (рис.2).

При реакции Фентона происходило изменение ярко-розовой окраски раствора витамина В12 в оранжевую, что указывает на существенную перестройку структуры молекулы. В то же время, при добавлении ДАФС-25 и последующего проведения реакции Фентона изменения окраски не наблюдалось.

**Выводы**

ДАФС-25 обладает антиоксидантными свойствами, вероятно, из-за присутствия селена, входящего в состав данного соединения.

**Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые в модельном эксперименте показано защитное действие селенорганического препарата от повреждения свободными гидроксильными радикалами, образующимися при реакции Фентона, витамина В12. Эти данные имеют существенное значение для дальнейших исследований в области радиобиологии и медицины, а также для разработки новых соединений, обладающих радиопротекторным и антиоксидантным действием.

**Литература**

1. Физико-химические свойства и аналитические методы контроля диацетофенонилселенида – субстанции для производства препарата Селенобел® / Н.И. Атрахимович [и др.] // Рецепт. — 2012.
2. Свободные радикалы, пролиферация и канцерогенез / Р.Р. Фархутдинов // Обзор литературы. – 2011.
3. Oxidation of tartaric acid in presence of iron / Fenton H. J. H. // Journal of the Chemical Society. – 1894.
4. Хемилюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, - математическое моделирование процесса; особенности, параметры и условия применения для биомедицинских исследований / И.Л. Иванова // Статья. – 2014.

**Сведения об авторах**

***Дмитрий Дмитриевич Барцев***
*Студент кафедры аналитической химии имени И.П. Алимарина, РТУ МИРЭА*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: bartsev_03@mail.ru*

***Ярослав Владимирович Бородулин***
*научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения*
*«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» (ФГБНУ «МГНЦ»)*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: borodulinyv@mail.ru*

**Information about author**

***Dmitrii Dmitrievich Bartsev***
*Student of Department of Analytical Chemistry named after I.P. Alimarin, RTU MIREA*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: bartsev_03@mail.ru*

***Yaroslav Vladimirovich Borodulin***
*researcher at the Federal State Budgetary Scientific Institution «Medical and Genetic Research Center named after Academician N.P. Bochkov» (FSBI "MGNC")*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: borodulinyv@mail.ru*

УДК 54.066, 577.164.161
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.110-113

**П. И. Гусельников, Н. А. Донценко, Я. В. Бородулин**
*«МИРЭА*—Российский технологический университет», Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова

# ИЗУЧЕНИЕ КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ 1,5-ДИФЕНИЛ-3-СЕЛЕН-ПЕНТАНДИОНА-1,5 (ДАФС-25)

*В водном растворе «ДАФС – хлорид кальция», вероятнее всего, образуются, как минимум, два типа комплексов при наличии одной изобестической точки: происходит димеризация молекул ДАФС и одновременное комплексообразование ДАФС с кальцием через карбонильные группы.*

***Ключевые слова**: селен, ДАФС-25, кальций-связывающее действие.*

**P. I. Guselnikov, N. A. Dontsenko, Y. V. Borodulin**
«MIREA—Russian Technological University»,
Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies

# STUDY OF THE CALCIUM-BINDING EFFECT OF THE 1,5-DIPHENYL-3-SELENPENTANDION-1,5 (DAPS-25)

*In an aqueous solution of "DAPS – calcium chloride", at least two types of complexes are most likely formed in the presence of one isosbestic point: dimerization of DAPS molecules occurs and simultaneous complexation of DAPS with calcium through carbonyl groups occurs.*

***Keywords**: selenium, DAPS-25, calcium-binding effect.*

## Введение

Нарушения в свертывающей системе крови и повышенное тромбообразование являются наиболее частыми причинами инфаркта миокарда (ИМ) и внезапной коронарной смерти [1]. Важным фактором риска сердечно-сосудистой патологии является артериальная гипертензия (АГ). В этой связи для лечения и профилактики АГ и ИМ применяют прямые и непрямые антикоагулянты, антагонисты кальциевых каналов [2, 3]. Прямые антикоагулянты, получившие название «антагонистов кальция», способны блокировать медленные кальциевые каналы, препятствуя транспорту ионов кальция в гладкомышечные клетки (ГМК), благодаря чему они обладают гипотензивным эффектом и снижают частоту сердечно–сосудистых осложнений – ИМ, ишемической болезни сердца (ИБС), мозгового инсульта и сердечно–сосудистой смертности [4].

Антагонисты кальция обладают такими клинически значимыми эффектами, как гипотензивный, антиангинальный и антиаритмический эффекты. Более того, для некоторых антагонистов кальция установлены антиоксидантные и антисклеротические свойства, усиливающие их действие при сердечно-сосудистых заболеваниях. В совокупности все описанные свойства определяют применение антагонистов кальция при АГ и различных формах ИБС [3,4].

Однако наряду с противоишемическими препаратами пациентам, страдающим ССЗ, следует рекомендовать поливитаминные комплексы и микроэлементы. Чрезвычайно важным микроэлементом в рационе человека является селен [5]. Учитывая, что большинство регионов России являются селенодефицитными, большую актуальность приобретает поиск эффективных и нетоксичных форм селена, способных сбалансировать процессы свободнорадикального окисления и функционирование антиоксидантной системы в тканях.

Одним из перспективных селенорганических соединений в России является арилалифатический дикетон ДАФС (1,5-дифенил-3-селенапентандион-1,5), который имеет черты сходства с верапамилом и нифепидином и, вероятно, также способно взаимодействовать с ионами кальция. На рис. 1 представлена структура ДАФС.

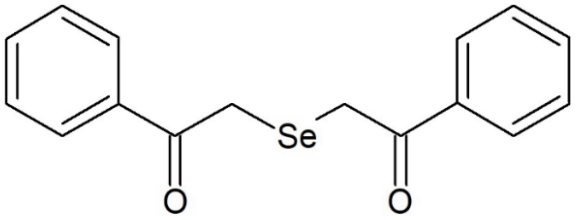



***Рис. 1. Структурная формула диацетофенонилселенида.***

**Цель работы**

Изучение взаимодействия селенорганического соединения ДАФС с ионами кальция.

**Материалы и методы**

Спектры поглощения были записаны на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ в области длин волн от 190 нм до 340 нм с шагом 1 нм с использованием кварцевой кюветы с длиной 10 мм на фоне дистиллированной воды.

Источником ДАФС служил лекарственный препарат «Селенобел» (РУП «Белмедпрепараты»). Навеска этого вещества массой 0,01 г была растворена в 10 мл ацетонитрила (ХЧ, Экос-1), после чего было взято 0,04 мл этого раствора и добавлено в кювету с 5 мл дистиллированной воды и измерен спектр поглощения.

Для взаимодействия ионов кальция с ДАФС был выбран 0,1 М раствор $CaCl_2$, приготовленный путем растворения 0,0555 г в 5 мл дистиллированной воды.

Изменение спектров поглощения исследовалось при последовательном добавлении 0,1 М $CaCl_2$ в кювету с раствором, приготовленным ранее, следующих объемов: первый – 0,12 мл, второй – 0,12 мл, третий – 0,24 мл, четвертый – 0,48 мл.

Квантовохимические расчёты были проведены в программе Gaussian 09 [6] на уровне PBE0/6-31+G(d,p). Визуализация структур была осуществлена в программе Avogadro [7].

**Полученные результаты**

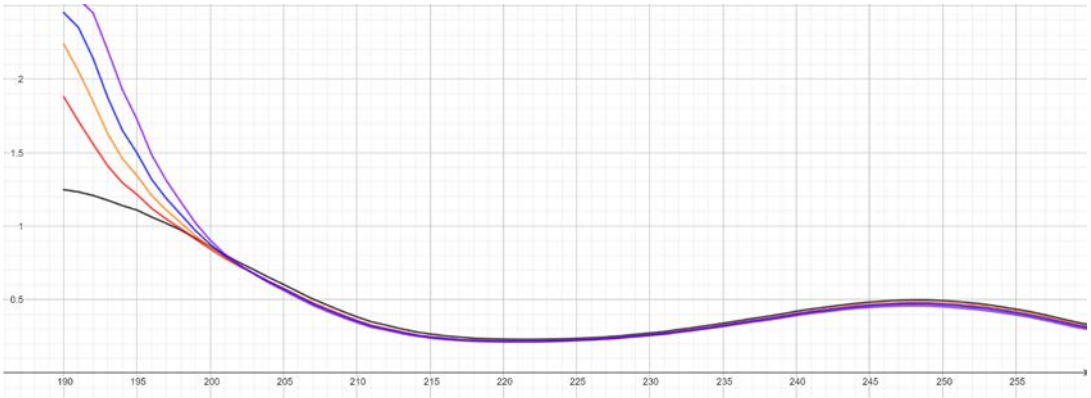



***Рис. 2. Изменение спектров поглощения ДАФС при взаимодействии с $CaCl_2$, черный – без $CaCl_2$, красный – 0,12 мл 0,1 М $CaCl_2$, оранжевый – 0,24 мл 0,1 М $CaCl_2$, синий – 0,48 мл 0,1 М $CaCl_2$, фиолетовый – 0,96 мл 0,1 М $CaCl_2$.***

На спектрах поглощения растворов ДАФС и растворов ДАФС с различным содержанием хлорида кальция присутствует максимум полосы поглощения с длиной волны 248 нм, соответствующий $\pi \rightarrow \pi^*$ переходу. Его интенсивность уменьшается с добавлением раствора хлорида кальция.

Вид спектра диацетофенонилселенида сохраняется, что указывает на сохранение в целом структуры этого вещества. В то же время наблюдается изобестическая точка на 203 нм.

Изобестические точки – это точки равной амплитуды при данной длине волны, которые появляются при наложении двух или большего числа спектров системы, полученных при разных концентрациях.

Квантовохимические расчеты указывают на возможность существования ДАФС-25 в виде димера. Для упрощения брался серный аналог диацетофенонилселенида – диацетофенонилсульфид (далее DAPS').

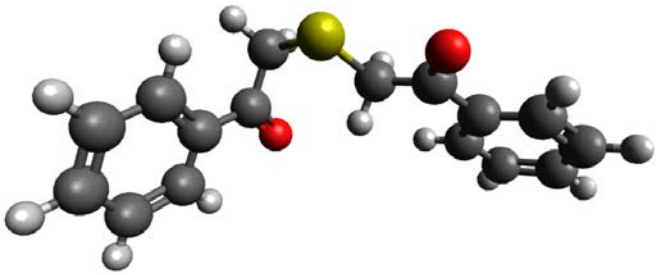


***Рис. 3. Структура DAPS'.***

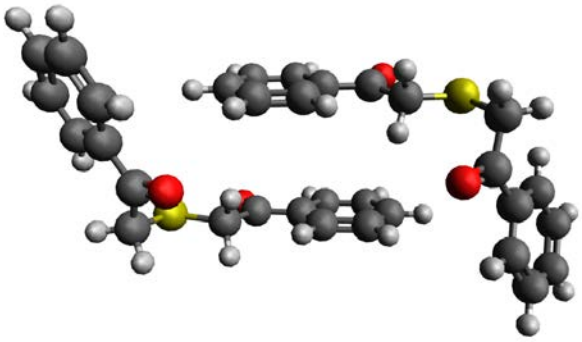


***Рис. 4. Структура $(DAPS')_2$.***

***Табл. 1. Электронные энергии компонентов реакции 2DAPS' = $(DAPS')_2$.***

| Компонент | $E°_{298}$, хартри | $\Delta E°_{298}$, кДж/моль |
|---|---|---|
| DAPS' | -1165.7706574 | -18.9 |
| $(DAPS')_2$ | -2331.5485141 | |

**Выводы**

В водном растворе «ДАФС – хлорид кальция», вероятнее всего, образуются, как минимум, два типа комплексов при наличии одной изобестической точки: происходит димеризация молекул ДАФС и одновременное комплексообразование ДАФС с кальцием через карбонильные группы.

**Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: сохранение вида спектра свидетельствует о сохранении в целом структуры ДАФС, изобестическая точка вероятнее всего указывает на равновесия между двумя или более формами вещества, в том числе с участием ионов кальция.

Следует отметить, что изобестическая точка, как правило, указывает на равновесное состояние как минимум двух форм вещества в растворе. К подобным формам можно отнести мономерную и димерную конформацию соединения в растворе или мономерную конфигурацию соединения, находящуюся в равновесии с комплексом, образованным мономерной формой и ионами кальция, которые координируются по карбонильным группам ДАФС.

Следует обратить внимание на следующие факты: во-первых, квантовохимические расчеты указывают на возможность существования ДАФС-25 в виде гидрофобного димера, что подтверждается выигрышем по энергии, вероятно, за счет ван-дер-вальсовых контактов, во-вторых, присутствие в структуре молекулы бензольных колец будет способствовать формированию димерных структур при добавлении в раствор избыточного количества хлорида кальция, участвующего в формировании водных кластеров.

**Литература**


1. Шальнова С.А., Деев А.Д. Тенденции смертности в России в начале XXI века (по данным официальной статистики). Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2011;10(6):5-10. https://doi.org/10.15829/1728-8800-2011-6-5-10.
2. Киреев К.А., Краснопеев А.В., Киреева Т.С. Клинический пример использования эптифибатида во время коронарной интервенции при острой коронарной патологии. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. 2015;11(2):159-164. https://doi.org/10.20996/1819-6446-2015-11-2-159-164.
3. Julius S., Kjeldsen S., Weber M. et al. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with Valsartan- or Amlodipine-based regimens: VALUE, a randomized trial Lancet. 2004 Jun 19;363(9426):2022-31. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16451-9.
4. Дворецкий Л.И., Желнов В.В., Петровская Н.В., Комарова И.С. Современные пролонгированные антагонисты кальция в клинической практике. РМЖ. Кардиология.2008; 16(7): 481-487.
5. Тутельян В.А., Княжев В.А., Хотимченко С.А., Голубкина Н.А., Кушлинский Н.Е., Соколов Я.А. Селен в организме человека: метаболизм, антиоксидантные свойства, роль в канцерогенезе. М., издательство РАМН, 2002. – 224 с.
6. Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman et al.
7. Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.2.0. http://avogadro.cc/


**Сведения об авторах**


**Павел Ильич Гусельников**
*студент 4 курса*
*«МИРЭА—Российский технологический университет», Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова*
*Москва, Россия*
*https://www.mirea.ru/*
*Эл. почта: pavel.guselnikov.2002@bk.ru*

**Николай Андреевич Донценко**
*студент 4 курса*
*«МИРЭА—Российский технологический университет», Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова*
*Москва, Россия*
*https://www.mirea.ru/*
*Эл. почта: mr.super.airton@gmail.com*

**Ярослав Владимирович Бородулин**
*научный сотрудник*
*Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова»*
*Москва, Россия*
*https://med-gen.ru/*
*Эл. почта: borodulinyv@mail.ru*


**Information about authors**


**Pavel Ilyich Guselnikov**
*student*
*«MIREA—Russian Technological University», Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies*
*Moscow, Russian Federation*
*https://www.mirea.ru/*
*E-mail: pavel.guselnikov.2002@bk.ru*

**Nikolai Andreevich Dontsenko**
*student*
«*MIREA—Russian Technological University», Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies*
*Moscow, Russian Federation*
*https://www.mirea.ru/*
*E-mail: mr.super.airton@gmail.com*

**Yaroslav Vladimirovich Borodulin**
*researcher*
*Medico-Genetic Scientific Center named after Academician N.P. Bochkov*
*Moscow, Russian Federation*
*https://med-gen.ru/*
*E-mail: borodulinyv@mail.ru*

УДК 615.849.12; 616.831-006
ГРНТИ 76.13.19
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.114-120

**Л.Г. Ваганян, Ф.А. Пак, В.Н. Вербенко, А.А. Васильев, Н.А. Кузора, Д.Л. Карлин, А.И. Халиков**
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт»,

## ОБЕСПЕЧЕНИЕ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КОМПЛЕКСА ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ НА БАЗЕ СЦ-1000

*В статье представлены выполняемые в НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ ключевые мероприятия, направленные на обеспечение качества физико-технической подготовки к стереотаксической лучевой терапии протонами ускорителя СЦ-1000.*
***Ключевые слова:*** *физико-технические мероприятия в лучевой терапии, протонная терапия, стереотаксическое облучение.*

**L.G. Vaganyan, F.A. Pak, V.N. Verbenko, A.A. Васильев, N.A. Kuzora, D.L. Karlin, A.I. Khalikov**
Petersburg nuclear physics institute of the NRC "Kurchatov institute",

## ENSURING OF PHYSICAL AND TECHNICAL PARAMETERS OF A PROTON THERAPY COMPLEX BASED ON SC-1000

*The article presents the key measures carried out at the NRC "Kurchatov Institute"– PNPI aimed at ensuring the quality of physical and technical preparation for stereotactic radiation therapy with protons of the SC-1000 accelerator.*
***Keywords****: physical and technical measures in radiation therapy, proton radiotherapy, stereotactic irradiation.*

**Введение.**

В протонной терапии, как правило, используемые энергии варьируются от 60 до 250 МэВ. Протоны обладают максимальной поражающей способностью только в конце своего пробега: энергия выделяется при попадании пучка в целевую область и не выходит за её пределы.

Медицинский протонный комплекс, который находится на территории НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ (г. Гатчина), настроен на стереотаксическое облучение одной фракцией заболеваний внутри головы узким пучком протонов (от 5 до 10 мм в диаметре в зависимости от облучаемой области) с фиксированной энергией 1000 МэВ (массовая тормозная способность воды на столкновения для протонов составляет 2,222 МэВ·см2·г-1 [1]) методом напролёт (пучок проходит, не останавливаясь в теле пациента). Метод лечения особенно эффективен при доброкачественных или злокачественных опухолях и артериовенозных мальформациях головного мозга. При этом, как в случае с гамма-ножом, стереотаксическая рама не применяется. Используется жёстко фиксирующая голову индивидуальная термопластичная маска.

Идея методики облучения основана на слабом рассеянии высокоэнергетического пучка и одинаковых энергетических потерях на входе и выходе из объекта облучения. Дозовое распределение имеет высокие краевые градиенты [2]. Пучок излучения направляется в изоцентр – фиксированную точку дозового максимума, в которой размещён патологический очаг, под разными углами (двухосевые вращения установки), и радиационные поля уничтожают целевой объём, не повреждая критические структуры. Риск осложнений при такой протонной терапии минимален [3]. Для случая облучения гипофиза организм плавно адаптируется к изменениям гормонального фона; детородная функция сохраняется.

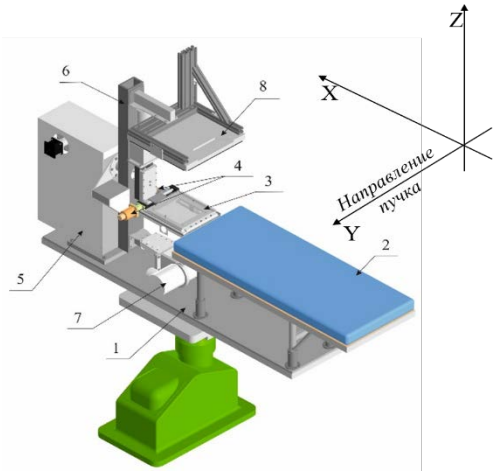
На сегодняшний день в России протонная терапия проводится в Центре МИБС (г. Санкт-Петербург; оборудование Varian Systems), в ФНКЦРиО ФМБА (г. Димитровград; циклотрон С235 фирмы IBA с привлечением технологий ОИЯИ) и в Центре протонной терапии на базе комплекса «Прометеус» в МРНЦ им. Цыба – филиале НМИЦ

радиологии (г. Обнинск; разработка ФИАН, производство АО «Протом»). Лечение на протонном комплексе, расположенном в ПИЯФ (синхроциклотрон СЦ-1000), которое с 1975 по 2013 год проводилось в сотрудничестве с РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова, было приостановлено в 2013 году в соответствии с новыми положениями, предписывающими использование только зарегистрированных медицинских изделий. В 2024 году клинические испытания установки завершились; регистрационное удостоверение Росздравнадзора получено в марте.

Необходимо обеспечивать качественное облучение патологического объёма с минимальным повреждением здоровых структур. Точность и правильность лечения радиацией важны для обеспечения терапевтической эффективности. Сложность технологии лечения требует проведения специализированных систематических проверок и рабочих процедур для обеспечения качества. Гарантия качества заключается в реализации структурированных действий для поддержания высокого качества лечения. К основным задачам программы мероприятий контроля качества относятся: обеспечение безопасного и качественного облучения «мишеней», повышение точности корреляции дозы, подведение необходимой тумороцидной дозы; формирование необходимого размера пучка в зависимости от параметров мишени; сведение к возможному минимуму дозовой нагрузки на нормальные структуры; обеспечение надёжности; повышение терапевтической эффективности.

**Цель работы.**

Цель данной работы – описать рабочий цикл подготовки оборудования и проверки систем протонного комплекса, поскольку особенности ускорителя СЦ-1000 и установки
(рис. 1), нестандартной методики ротационного облучения уникальны [4]. Информацию из опубликованных рекомендаций для медицинских физиков, в которых даётся достаточно подробная информация для стандартных установок и традиционных пучков классических энергий, необходимо адаптировать для конкретного данного случая.




1 – лечебный стол (ЛС); 2 – дека ЛС; 3 – прибор-фиксатор головы (ПФГ); 4 – приводы перемещения ПФГ по осям *X* и *Y*; 5 – стойка привода ПФГ; 6 – коромысло для вращения рентгеновского центратора; 7 – рентгеновская трубка; 8 – детектор рентгеновского излучения.

ПФГ может совершать маятниковые движения вокруг оси *X* на угол до ±36° либо одновременно, либо поочерёдно с движениями лечебного стола. ЛС может вращаться вокруг оси *Z* в диапазоне до ±40°. При выборе параметров движения опираются на протокол дозиметрического планирования и клинический план лечения. При любых поворотах ЛС и ПФГ объект, расположенный в изоцентре, остаётся неподвижным.

***Рис. 1. Терапевтическая установка***

**Материалы и методы.**

Основу протонного комплекса составляют: стереотаксическая система пространственного позиционирования, автоматизированное рабочее место (АРМ) врача с программным обеспечением системы верификации пациента, АРМ оператора с программой управления установкой, пульт ручного управления установкой, устройства для фиксации головы, аппаратно-программный комплекс системы планирования терапии с программным обеспечением ProtoPlan, фантом-имитатор изоцентра, дозиметрические фантомы и технологическое устройство. Комплекс представлен системами вывода, фокусировки,

пространственной регистрации и детектирования пучка, системами мониторирования и контроля дозы, системами управления (магнитными элементами и параметрами пучка, перемещениями терапевтической установки), системами рентгеновской центрации (рентгеновская трубка и плоскопанельный детектор) и системами обеспечения безопасности (аварийная защита, блокировка пучка, голосовая связь и видеонаблюдение за пациентом).

**Описание процесса и получаемые результаты**.

В результатах приводятся ключевые физико-технические мероприятия от подготовки оборудования до протоколирования облучения. Их условно можно разделить на шесть этапов: 1) диагностика оборудования и систем протонного комплекса, 2) контроль качества пучка, 3) юстировка терапевтической установки (контроль позиционирования), 4) дозиметрическое обеспечение (мониторирование и контроль дозы), 5) планирование лечения и верификация плана, 6) контроль и протоколирование процесса облучения.

На первом этапе проводится диагностика оборудования и проверка работы аппаратуры и всех систем протонного комплекса: в частности, проверяется, что высокое напряжение поступает к детектирующим пучок системам, сигналы поступают на управляющий компьютер, обеспечивается работоспособность всех перемещений элементов установки, проверяется соединение и работоспособность блоков преобразователей цифровых сигналов, систем блокировки пучка.

После оценивается форма и распределение плотности пучка по сечению, определяются размеры пучка. Процедуры осуществляются по двум независимым каналам: двум профилометрам, которые определяют положение пучка в пространстве, и двум ионизационным камерам-мониторам, которые помогают контролировать интенсивность пучка, поток ионизирующих частиц, распределение плотности. Вместе с тем для работ используется фотобумага. Для проверки на сходимость пучок сканируется полупроводниковым сканером. Окончательная настройка режимов магнитных элементов выполняется, когда пучок симметричный, подчиняется закону распределения Гаусса, размер пучка в месте облучения определен согласно предписаниям врача с точностью ± 0,5 мм.

На третьем этапе проводится проверка положения изоцентра установки и выставление оси пучка на изоцентр. Инструменты при юстировочных работах – это рентгеновский центратор, который работает в режиме рентгенографии и рентгеноскопии (используется, когда запущены движения деки ЛС и ПФГ) в прямой и боковой проекциях и специальный фантом с рентгеноконтрастной меткой (рис. 2), нивелир и лазерная система, с помощью которых сперва определяется изоцентр, а затем перепроверяется и подтверждается стабильность положения метки фантома, соответственно, стабильность изоцентра. Для выставления траектории протонного пучка на изоцентр на установку крепится технологическое устройство со спаренными рентгеноконтрастными перекрестиями (рис. 3). По окончании юстировки (когда положение изоцентра настроено, перекрестия рентгеновского детектора совпадают с меткой фантома в обоих проекциях, при ротации установки при рентгеноскопии точка никуда не сдвигается, с помощью технологического устройства подтверждено, что траектория протонного пучка выставлена на изоцентр) положения стола и ПФГ устанавливаются как исходные. В центре облучения делается контрольный снимок. Проводится сканирование пучка (рис. 5) в изоцентре и со сдвигом на 15 см влево и вправо вдоль центральной оси пучка. Выполняется окончательная подстройка токов в магнитных элементах, формирующих пучок. Пучок сканируется после каждой подстройки.

Затем осуществляется привязка мониторных единиц (числа импульсов камеры-монитора дозы) и единиц поглощённой дозы, для которой используются 2 ионизационные камеры-мониторы дозы, дозиметрический фантом с отверстием для шланговой камеры (рис. 4) и клинический дозиметр с набором шланговых ионизационных камер. Это основные инструменты, обеспечивающие дозиметрический контроль. Для проверки привязки к дозе используется капсула с термолюминесцентными дозиметрами (ТЛД) из

фтористого лития (плотность 2,3 г/см3, средневзвешенное номеров компонентов материала 8,14, что близко к эффективному атомному номеру у биологической ткани – 7,4). Детекторы обладают высокой чувствительностью, не зависящей от интенсивности излучения. Методика работы следующая. Фантом центрируется и в отверстие, находящееся в изоцентре, вводится шланговая ионизационная камера. Задаётся интенсивность пучка, по клиническому дозиметру пять раз отпускается 2 Гр. По программе управления каждый раз определяется соответствующее отпущенной дозе число протонов, прошедших через ионизационные камеры-мониторы в единицу времени. Вычисляется среднее число импульсов дозы на 1 Гр. Для проверки в отверстие фантома вместе со шланговой камерой помещается капсула с шестью термолюминесцентными дозиметрами и по рассчитанным мониторным единицам отпускается 2 Гр. Усреднённые результаты ТЛД сопоставляют с отпущенной дозой. В результате процесса число импульсов камеры-монитора дозы соотносится с единицами поглощённой дозы, и относительная погрешность измерения не превышает 5%.

Рис. 2. Фантом – имитатор изоцентра

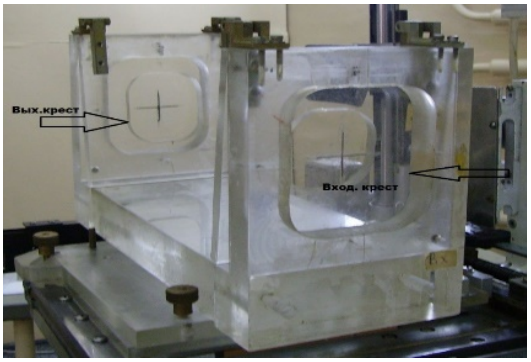



Рис. 3. Технологическое устройство для проверки траектории пучка

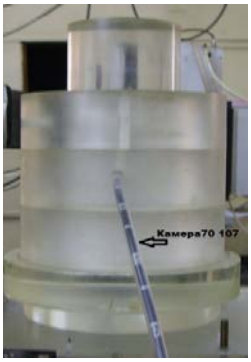



Рис. 4. Дозиметрический фантом со шланговой ионизационной камерой

На этапе дозно-анатомического планирования в программу загружают изображения медицинской интроскопии, устанавливают соответствие между системами координат диагностического аппарата и терапевтической установки. Зарегистрированная в 2021 году система планирования ProtoPlan [5] поддерживает DICOM-файлы с контурным отображением анатомических структур, созданных сторонними программами, но также имеет инструменты для обработки диагностических изображений и поддержки сегментации структур, редактирования созданных контуров, добавления маркеров интереса. Поэтому если не загружали изображения с завершённой клинической топометрией, сперва оконтуривают целевые объёмы и сегментируют структуры зоны интереса. Следующий шаг – дозиметрическое планирование, во время которого обозначают изоцентр (как правило, в центре объёма или центре масс облучаемой зоны), вводят предписанные условия облучения, получают дозное распределение, средние, медианные и предельные дозы на целевые объёмы, анализируют, выбирают лучшую конфигурацию технических параметров, чтобы достигались все поставленные цели лучевой терапии. Дозиметрическое планирование лечения и верификация планов до ProtoPlan не являлись компьютеризированными и для предлучевой подготовки выполнялись вручную. Цифровая система планирования разработана на этапе модернизации протонного комплекса. Программа апробирована, но это инновация, и клинический опыт пока предстоит получить.

В результате дозно-анатомического планирования получается прогнозируемое дозное распределение (рис. 6), определяются оптимальные параметры пучка (размер, интенсивность) и наилучшая конфигурация технических параметров установки (скорость ротации, углы) для достижения поставленных целей лучевой терапии, средние и предельные дозы облучения (абсолютная доза в изоцентре и минимальная на структуры области интереса), по гистограммам «доза-объём» проводится оценка распределения дозы и покрытия сегментированных структур изодозными кривыми. План утверждается

врачом, протоколируется и отправляется на управляющий компьютер. Для верификации плана выполняется симуляция терапии. В роли пациента выступает тканеэквивалентный фантом с матрицей дозиметрических детекторов (ТЛД). Данные реального облучения сравниваются с данными системы планирования. Если расхождение между экспериментальными и смоделированными данными находится в пределах предписаний врача на структуры зон интереса, можно приступать к облучению пациента, иначе необходимо проверить каждый шаг рабочего цикла и заново верифицировать план. Точность в центре целевого объёма с расстоянием до точки совпадения 3 мм не превышает 5%.

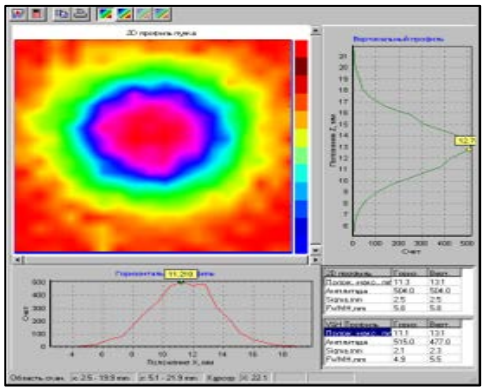


*Рис. 5. Результат сканирования пучка*

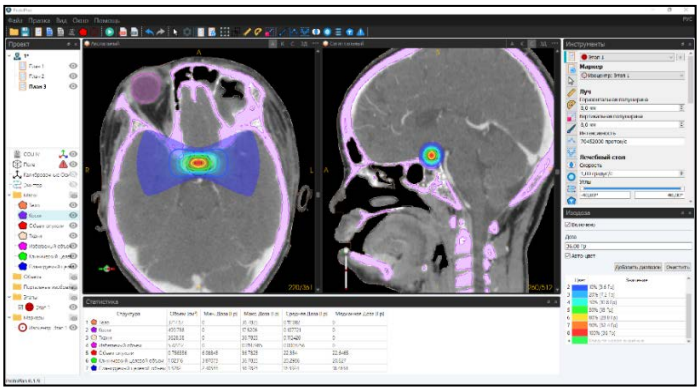


*Рис. 6. Окно системы планирования*

Контролируется процесс облучения в программе управления. В ней отображаются данные со всех детекторов, а также посредством неё осуществляется настройка параметров установки для протонной терапии, установление и контроль параметров пучка. Данные от ионизационных камер и профилометров отображаются в журнале действий программы. Имеется возможность автоматически или вручную прерывать облучение, например, если отклонились параметры пучка от заданных (размер, положение), или отказал хотя бы один из каналов измерения. По итогам облучения составляется протокол.

**Выводы.**

Таким образом, мероприятия по обеспечению качества физико-технических параметров протонного комплекса охватывают весь процесс лечения и помогают оптимизировать его, снизить побочные эффекты для пациентов, обеспечивают высокие результаты для точности измерений, качества пучка, точности позиционирования, точности отпуска дозы, дозно-анатомического планирования, симуляции лечения и проверки распределения прогнозируемой дозы, контроля процесса облучения.

Размер пучка в месте облучения определяется с точностью ± 0,5 мм. Число импульсов камеры-монитора дозы соотносится с единицами поглощённой дозы с погрешностью, не превышающей 5%. Точность в центре целевого объёма с расстоянием до точки совпадения 3 мм не превышает 5%, что не противоречит требованиям [6]. Таким образом, результаты проводимых процедур не противоречат международным рекомендациям [7]. Для обеспечения прецизионного наведения пучка на мишень мероприятия проводятся перед каждым сеансом, что впоследствии гарантирует эффективные результаты лечения, при этом безопасные и надёжные.

**Заключение.**

Метод стереотаксического облучения требует высокой ответственности, прецизионности и точности. Физико-техническая составляющая подразумевает освоение новой техники, ввод в эксплуатацию, контроль стабильности работы оборудования и аппаратуры, техническое обслуживание, калибровку и поверку дозиметрических приборов, клиническую дозиметрию, цифровое дозно-анатомическое планирование, верификацию плана лечения, контроль качества систем визуализации, позиционирования и иммобилизации, контроль отпуска дозы пациентам и реализации облучения, мероприятия по предупреждению аварий и их ликвидаций, радиационную безопасность, оценку реализации

облучения.

Проводимые мероприятия сформированы с учётом особенностей работы медицинского протонного комплекса и на основании накопленного клинического опыта, и не противоречат изложенным в публикациях Американской ассоциации медицинских физиков (https://www.aapm.org/pubs/reports/) и Международного агентства по атомной энергии (https://www.iaea.org/publications) рекомендациям, которые подходят для данного способа лечения. Набор процедур, осуществляющих диагностику и контроль качества устройств, компонентов и систем протонного комплекса, выполняется перед каждым сеансом, что обеспечивает высокую точность наведения пучка излучения на облучаемый целевой объём и надёжность, высокий терапевтический эффект.

**Литература.**

1. Взаимодействие ионизирующих излучений с веществом: учебное пособие/Беспалов В.И. – 4-е изд. – Томск: из-во Томского политехнического ун-та, Б 53. – 2008. – 369 с.
2. Васильев А.А., Голиков И.Г. Мамедова Н.И., Пак Ф.А., Халиков А.И., Гранин Д.И., Карлин Д.Л., Брожик Д.С., Василевская И.В., Жигалова М.В. Расчёт глубинных дозных распределений, создаваемых пучком протонов с энергией 1000 МэВ при ротационном облучении // Медицинская физика, № 4, 2020. – с. 5-12.
3. Гранов А.М., Шалек Р.А., Виноградов В.М., Карлин Д.Л. Сорокалетний опыт клинического применения пучка протонов с энергией 1 000 МэВ на базе синхроциклотрона Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова // Медицинская физика, Т. 70. № 2. – 2016. – С. 10–17.
4. Абросимов Н.К., Михеев Г.Ф. Радиотехнические системы синхроциклотрона Петербургского института ядерной физики / под науч. ред. Рябова Г.А. Гатчина: Изд-во ФГБУ «ПИЯФ», 2012. – 340 с.
5. Ваганян Л.Г., Вербенко В.Н., Кузора Н.А., Максимов В.И., Пак Ф.А., Халиков А.И. ProtoPlan: система дозиметрического планирования // Сборник трудов международной конференции NT+ME `2023, Гурзуф. – с. 169-173.
6. Серия изданий МАГАТЭ по здоровью человека № 31. Требования к точности и факторы неопределённости в лучевой терапии. – Вена, 2022. – 382 с.
7. Серия технических докладов МАГАТЭ № 398. Определение поглощённой дозы при дистанционной лучевой терапии: Международные практические рекомендации по дозиметрии, основанные на эталонах единицы поглощённой дозы в воде. При поддержке IAEA, WHO, PAHO и ESTRO. – Вена, 2004. – 269 с.

**Сведения об авторах:**

**Место работы:** НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ. Лаборатория медицинской физики Отдела медицинской радиологии. Гатчина, Россия

***Лилит Гайковна Ваганян***
*младший научный сотрудник*
*Эл. почта: vaganyan_lg@pnpi.nrcki.ru*

***Федор Александрович Пак***
*младший научный сотрудник*
*Эл. почта: pak_fa@pnpi.nrcki.ru*

***Валерий Николаевич Вербенко***
*ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, профессор*
*Эл. почта: verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru*

***Андрей Анатольевич Васильев***
*младший научный сотрудник*
*Эл. почта: vasilievaa1988@gmail.com*

**Information about authors:**

**Place of work:** NRC “Kurchatov Institute” – PNPI. Laboratory of Medical Physics of the Department of Medical Radiology. Gatchina, Russia

***Lilit Gaikovna Vaganyan***
*junior researcher*
*E-mail: vaganyan_lg@pnpi.nrcki.ru*

***Fedor Aleksandrovich Pak***
*junior researcher*
*E-mail: pak_fa@pnpi.nrcki.ru*

***Valeriy Nikolaevich Verbenko***
*leading researcher, doctor of biological sciences, professor*
*E-mail: verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru*

***Andrey Anatolevich Vasilev***
*junior researcher*
*E-mail: vasilievaa1988@gmail.com*

***Наталья Александровна Кузора***
*заместитель заведующего лабораторией*
*Эл. почта: kuzora_na@pnpi.nrcki.ru*
***Джан Леонидович Карлин***
*помощник заместителя директора по перспективным разработкам, старший научный сотрудник, кандидат биологических наук*
*Эл. почта: karlin_dl@pnpi.nrcki.ru*
***Александр Ифратович Халиков***
*заведующий лабораторией*
*Эл. почта: khalikov_ai@pnpi.nrcki.ru*

***Natalya Aleksandrovna Kuzora***
*deputy head of the laboratory*
*E-mail: kuzora_na@pnpi.nrcki.ru*
***Djan Leonidovich Karlin***
*assistant deputy director for advanced development, senior researcher, candidate of biological sciences*
*E-mail: karlin_dl@pnpi.nrcki.ru*

***Aleksandr Ifratovich Khalikov***
*head of the laboratory*
*E-mail: khalikov_ai@pnpi.nrcki.ru*

УДК 681.784
ГРНТИ 59.31.31
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.120-124

**Т.В. Гайворонская[1], А.В. Арутюнов[1], Ф.С. Аюпова[1], В.В. Волобуев[1], Ю.А. Васильев[1], Е.Ю. Плотникова[1], Т.И. Мурашкина[2], Е.А. Бадеева[2]**
[1]ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»
[2]ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

# КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО СКАНЕРА

*Обосновано применение безопасного волоконно-оптического сканера в системах диагностики челюстно-лицевых патологий для формирования пластиковой модели рельефа нёба пациента и зубного ряда.*
***Ключевые слова:*** *волоконно-оптический сканер, диагностическая система, рельеф нёба, зубной ряд, цифровая 3D-модель, челюстно-лицевая патология*

УДК 681.784
ГРНТИ 59.31.31

**T.V. Gaivoronskaya[1], A.V. Arutyunov[1], F.S. Ayupova[1], V.V. Volobuev[1], Yu.A. Vasiliev[1], E.Y. Plotnikova[1], T.I. Murashkin[2]a, E.A. Badeeva[2]**
[1]Penza State University
[2]Kuban State Medical University

# CLINICAL USE OF A FIBER OPTIC SCANNER

*The use of a safe fiber-optic scanner in diagnostic systems of maxillofacial pathologies for the formation of a plastic model of the relief of the patient's palate and dentition is justified.*
***Keywords:*** *fiber-optic scanner, diagnostic system, palate relief, dentition, digital 3D model, maxillofacial pathology*

## Введение

Получение модели зубного ряда считается стандартной, обыденной, но необходимой и достаточно важной процедурой в стоматологической практике. Манипуляция должна выполняться качественно, с особым вниманием к деталям для точного и надежного воспроизведения анатомических структур полости рта. Кроме того, не стоит забывать о соблюдении норм биологической безопасности при дезинфекции. Для хранения гипсовых моделей требуется определенное пространство (полки, шкафы, коробки) и благоприятные условия для длительного хранения и предотвращения поломки гипса, чтобы исключить искажение и/или потерю объективных данных обследования пациента [1].

Современные методики получения модели зубного ряда исключают применение классического оттиска и имеют ряд преимуществ перед обычными гипсовыми моделями [2].

Использование волоконно-оптических систем (ВОС) в медицине перспективно и

имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными электрическими системами [3]. Во-первых, это безопасность применения, которая обеспечивается отсутствием электрических измерительных приборов в контакте с пациентом. Во-вторых, есть возможность использовать несколько ВОС одновременно без ущерба их функциональности, ввиду отсутствия проблем с электромагнитной совместимостью в диапазоне оптического спектра.

Для получения цифровых моделей зубов разработаны внутриротовые сканеры, которые регистрируют изображение зубного ряда непосредственно в полости рта пациента, позволяют получать модели без снятия слепков, что сокращает время для диагностических приемов пациента [4,5].

Времени, необходимого для проведения внутриротового сканирования, требуется меньше, чем для обычного снятия слепков. Перенос слепка в зуботехническую лабораторию, заливка модели требуют определенного количества времени. Кроме того, в совокупности процесс прямого внутриротового сканирования более удобен и снижает временные затраты пациента. Кроме того, время сканирования и качество детализации постоянно улучшаются с появлением новых версий внутриротовых сканеров [6].

Авторами разработано устройство – волоконно-оптический сканер для определения размеров и конфигурации неба [7] (рисунок 1).

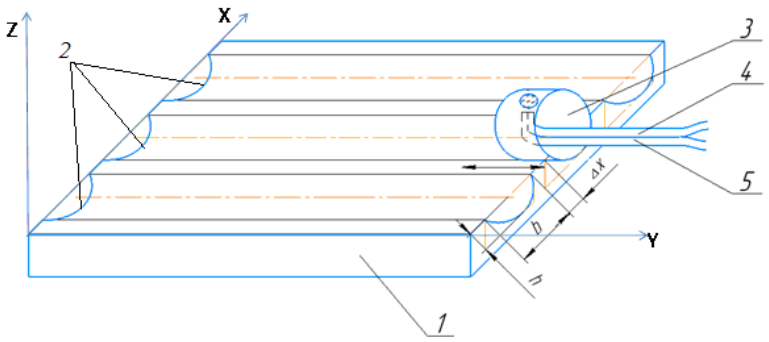



***Рисунок 1 – Упрощенное конструктивное исполнение волоконно-оптического сканера [6]***

Волоконно-оптический сканер содержит основание 1, в котором на расстоянии ΔX друг от друга выполнены n-направляющих в виде впадин 2 глубиной h и шириной b, в которых поочередно перемещается корпус 3, внутри которого расположена оптическая система в виде подводящего 4 и отводящего 5 оптических волокон. Первые торцы оптических волокон 4 и 5, расположенных в корпусе 3, параллельны направлению перемещения корпуса 3, а оптические оси оптических волокон перпендикулярны освещаемой поверхности (нёба).

Верхняя и нижняя поверхности основания могут быть выполнены плоскими, выпуклыми, вогнутыми.

При необходимости увеличения чувствительности преобразования оптического сигнала возможно применение фокусирующей линзы, которая формирует необходимое пространственное распределение светового потока с выхода излучающего торца подводящего оптического волокна 4. На торце как минимум одного оптического волокна может быть сформирована микролинза.

Данное изобретение может использоваться как в медицинских целях:

- определение физиологической нормы размеров и конфигурации неба;
- диагностика патологических состояний полости рта, в том числе врожденных (аномалии развития и пороки челюстно-лицевой области);

так и в учебных целях:

– для обучения студентов стоматологического факультета.

**Цель работы** – апробация разработанного сканера в медицинской практике.

**Материалы и методы**

В качестве апробации методики сканирования указанное волоконно-оптическое устройство использовали у 35 пациентов, имеющих диагноз «врожденная расщелина губы и/или неба» (диагноз по Международной классификации болезней: Q35; Q36; Q37). Возраст пациентов составил от 3 до 13 лет.

***Клиническое использование сканера***

Во время планового стоматологического осмотра после получения информированного согласия пациента на проведение исследования с помощью устройства был просканирован рельеф неба пациента. Далее, с использованием программы «3Shape 3D Viewer» («3Shape», Дания) были созданы цифровые 3D-модели (рисунок 2).

***Рисунок 2 - Цифровая 3D-модель рельеф неба пациента***

После этого, с помощью 3D-принтера «Phrozen Sonic Mighty 8K» («Phrozen», Тайвань) изготовили точные модели из пластика (рисунок 3).

В дальнейшем данные модели могут использоваться для диагностики, составления плана лечения и реабилитации пациентов, имеющих врожденные пороки развития челюстно-лицевой области у детей.

**Выводы**

Преимуществами волоконно-оптического сканера для использования в стоматологической практике, в том числе детской, являются:

1. более высокая точность передачи сложного анатомического рельефа нёба пациента и сохранность в памяти компьютера, по сравнению с традиционными неудобными для пациента оттисками стоматологической слепочной массы (возможность усадки и деформации материала) и гипсом (хрупкость материала);
2. малые размеры, что позволяет быстро и эффективно отобразить рельеф неба пациента, в том числе ребенка;
3. безопасность за счет использования оптического излучения мощностью не более 10 мкВт.

***Рисунок 3 - Модель рельефа нёба пациента из пластика***

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новым является:

- выведенная формула функции преобразования МОМС ВОДУП, позволяющая определить его конструктивно-технологические параметры.

**Благодарность**

***Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-15-20069, https://rscf.ru/project/22-15-20069/***

**Список литературы**

1. [1] Winkler J., Gkantidis N. Intraoral scanners for capturing the palate and its relation to the dentition. *Sci Rep.* 2021;11(1):15489. DOI: 10.1038/s41598-021-95103-6. PMID: 34326472.
2. [2] Aragón M.L.C., Pontes L.F., Bichara L.M., Flores-Mir C., Normando D., Validity and reliability of intraoral scanners compared to conventional gypsum models measurements: a systematic review. *European Journal of Orthodontics.* 2016; 38(4): 429–434. DOI:10.1093/ejo/cjw033
3. [3] Бадеева Е.А., Арутюнов А.В., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Аюпова Ф.С., Гуленко О.В. Перспективные возможности оптических методов измерения в диагностике герпетической инфекции полости рта/В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2021. Весенняя сессия . Москва, 2021. С. 44-47.
4. [4] aegisdentalnetwork.com
5. [5] theorthocosmos.com
6. [6] Cao Y., Chen J.K., Deng K.H., Wang Y., Sun Y.C., Zhao Y.J. [Accuracy of three intraoral scans for primary impressions of edentulous jaws]. [Article in Chinese]. Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2020; 52(1): 129-137. DOI: 10.19723/j.issn.1671-167X. 2020.01.021. PMID: 32071476
7. [7] Патент на изобретение 2803485 C1. Способ определения размеров и конфигурации нёба и волоконно-оптический сканер для его реализации/ Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А., Гайворонская Т.В., Серебряков Д.И., Кукушкин А.Н., Аюпова Ф.С., Васильев Ю.А., Плотникова Е.Ю., Паршикова Т.В., Арутюнов А.В.// Опубл. 14.09.2023

**Сведения об авторах**
**Т.В. Гайворонская,**
*д.м.н., профессор, зав. кафедрой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии*
***Эл. почта: gtv2021rnf@mail.ru***

**А.В. Арутюнов,**
*д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей стоматологии*
*Эл. почта: armenak@mail.ru*
**В.В. Волобуев,**
*к.м.н., доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии*
*Эл. почта: vladimir.volobueff@yandex.ru*

**Ю.А. Васильев,**
*ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины*
***Эл. почта: yurii-59@mail.ru***
**Ф.С.Аюпова,**
*к.м.н., доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии*
*Эл. почта: farida.sag@mail.ru*

**Е.Ю. Плотникова,**
*врач-неонатолог отделения новорожденных №1*
***Эл. почта: cat.roll@yandex.ru***
***Татьяна Ивановна Мурашкина***
*доктор техн. наук, профессор, профессор каф. «Приборостроение» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» Пенза, Россия*
*Эл. почта:* timurashkina@mail.ru

***Бадеева Елена Александровна***
*доктор техн. наук, профессор, профессор каф. «Радиотехника и радиоэлектронные системы» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» Пенза, Россия*
*Эл. почта:* badeeva_elena@mail.ru

**Information about author**
**T.V. Gayvoronskaya,**
*Ph. D. in medical science, full professor, head of the Departments of surgery dentistry and maxillofacial surgery*
*E-mail: gtv2021rnf@mail.ru*
**A.V. Arutyunov,**
*Ph. D. in medical science, full professor, head of the Departments of dentistry*
***E-mail: armenak@mail.ru***
**V.V. Volobuev,**
*Ph. D. in medical science, associate professor of the Departments of pediatric dentistry, orthodontics and maxillofacial surgery*
***E-mail: vladimir.volobueff@yandex.ru***
**Yu.A. Vasilev,**
*assistant of the Department of public health, healthcare and history of medicine*
*E-mail: yurii-59@mail.ru*
**F.S. Ayupova,**
*Ph. D. in medical science, associate professor of the Departments of pediatric dentistry, orthodontics and maxillofacial surgery*
*E-mail: farida.sag@mail.ru*
**E.Yu. Plotnikova,**
*Neonatologist of the department of newborns* ***No. 1***
***E-mail: cat.roll@yandex.ru***
***Tatiana Ivanovna Murashkina***
*Doctor of (Tech.) Sciences, Professor, Professor of the Department of Instrument Engineering Penza State University*
*Penza, Russian Federation*
*E-mail:* timurashkina@mail.ru
***Badeeva Elena Aleksandrovna***
*Doctor of Engineering, associate professor, professor of the Department of Radio Engineering and Radioelectronic Systems, Penza State University*
*Penza, Russian Federation*
*E-mail:* badeeva_elena@mail.ru

УДК 681.784

ГРНТИ 59.31.31
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.124-129

**Т.И. Мурашкина[1], Е.А. Бадеева[1], В.А. Бадеев[1], Ю.А. Васильев[2], А.В.Арутюнов[2], Ф.С. Аюпова[2,]**
[1]ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»
[2]ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

# ИЗМЕРЕНИЕ УГЛА ПОВОРОТА ГОЛОВЫ ПРИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВЫХ ПАТОЛОГИЯХ

*Обосновано применение волоконно-оптического микродатчика для измерения угла поворота головы пациента в системах диагностики челюстно-лицевых патологий, принцип действия которого основан на измерении изменения коэффициента отражения круглой пластины при изменении измеряемой физической величины.*

***Ключевые слова:*** *волоконно-оптический микродатчик, угол поворота, диагностическая система, коэффициент отражения, челюстно-лицевая патология, световой поток*

УДК 681.784
ГРНТИ 59.31.31

**T.I. Murashkina[1], E.A. Badeeva[1], V.A. Badeev[1],**
**Yu.A.Vasiliev[2], A.V.Arutyunov[2], F.S.Ayupova[2]**
[1]Penza State University
[2]Kuban State Medical University

# MEASURING THE ANGLE OF ROTATION OF THE HEAD IN MAXILLOFACIAL PATHOLOGIES

*The use of a fiber-optic micro sensor for measuring the angle of rotation of the patient's head in diagnostic systems for maxillofacial pathologies is justified, the principle of operation of which is based on measuring the change in the reflection coefficient of a round plate when the measured physical quantity changes.*

***Keywords:*** *fiber-optic micro sensor, rotation angle, diagnostic system, reflection coefficient, maxillofacial pathology, luminous flux*

## Введение

Развитие здравоохранения в нашей стране предполагает повышение уровня общего здоровья и качества жизни населения. Однако, в настоящее время оснащённость и финансовое обеспечение медицинских учреждений ограничивает доступность эффективного внедрения известных средств диагностики и высокотехнологичных методов лечения.

Одной из основных задач национального проекта «Здоровье» на 2019 - 2024 г.г. является внедрение инновационных медицинских технологий, включая систему ранней диагностики здоровья пациента [1].

Стоит задача разработки комплексного подхода к определению диагностических признаков челюстно-лицевых патологий (ЧЛП) и других заболеваний органов лица и шеи с помощью современных средств измерений, в частности, волоконно-оптических ИК-микросенсоров, для получения достоверной и своевременной информации и установления окончательного диагноза.

В известных методах диагностики ЧЛП используются датчики электрического типа [2,3].

Для выявления нарушений строения челюстно-лицевой и зубочелюстно-лицевой областей широко применяют рентгенологические методы исследований - ортопантомографию челюстей, телерентгенографию и компьютерную томографию головы [4,5,6,7].

Такие средства измерений небезопасны для жизни пациентов, так как в первом случае возможен электрический пробой электрической части измерительной системы, а во втором - непредсказуемые последствия от облучения. Кроме того, не исключается электромагнитное воздействие со стороны средства измерений на тело пациента, что снижает достоверность результатов измерений в процессе диагностирования.

Актуальной является необходимость в создании новых медицинских диагностических систем на основе современных безопасных средств измерений, использующих достижения волоконной оптики [8,9]. В состав таких систем будут входить волоконно-оптические микродатчики угла поворота (ВОМДУП), обеспечивающие повышение достоверности и безопасности процедур диагностирования различных патологических отклонений в области лица и шеи.

Диагностическая система, включающая в себя ВОМДУП, позволит проводить точные измерения отклонений положения антропометрических точек лица от нормального: как линейных, так и угловых, и систематизировать ЧЛП в зависимости от линейных и угловых отклонений конкретной точки лица (рисунок 1).

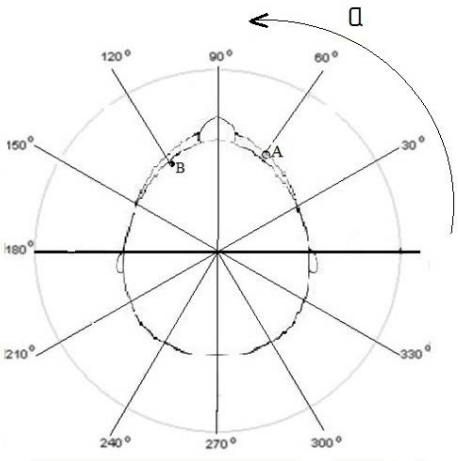



***Рисунок 1 – Положение антропометрических точек A и B на лице пациента***

Для разработки ВОМДУП, отвечающего требованиям волоконно-оптических систем диагностики ЧЛП, необходимо определить конструктивные параметры его микрооптико-механической системы (МОМС), обеспечивающей требуемый диапазон измерений, линейную функцию преобразования, высокую точность измерений. Это возможно на пути определения функции преобразования МОМС.

**Цель работы –** нахождением функции преобразования МОМС волоконно-оптического микродатчика угла поворота, одного из основных элементов системы диагностики ЧЛП.

**Материалы и методы**

Для достижения поставленной цели необходимо вывести функцию преобразования МОМС, связывающую интенсивность светового потока, поступающего на приемник излучения по отводящему оптическому волокну (ООВ), с начальным значением светового потока, поступающего от источника излучения в зону измерения по подводящему оптическому волокну (ПОВ). Затем на основе численного моделирования подобрать такие параметры МОМС (апертурный угол, диаметр сердцевины оптического волокна, конструктивные параметры оптического модулирующего элемента (ОМЭ), расстояние от торцов оптических волокон до ОМЭ, межосевое расстояние ПОВ и ООВ), которые обеспечивают достижение предъявляемых заказчиком требований.

**Полученные результаты**

ВОМДУП представляет собой конструктивную совокупность неподвижно закрепленных в несущей детали ПОВ и ООВ, относительно общего торца которых, расположенных в одной плоскости, вращается модулирующий элемент (МЭ) (рисунок 1). ОМЭ выполнен в виде пластины, поверхность которой разделена на две части: отражающую и поглощающую. Расстояния от центра торцов ПОВ и ООВ до точки начала координат равны. ОМЭ вращается по часовой стрелке вокруг оси *Z* на угол $\alpha$ .

Диапазон измерения угла поворота (0…180) град (рисунок 2).

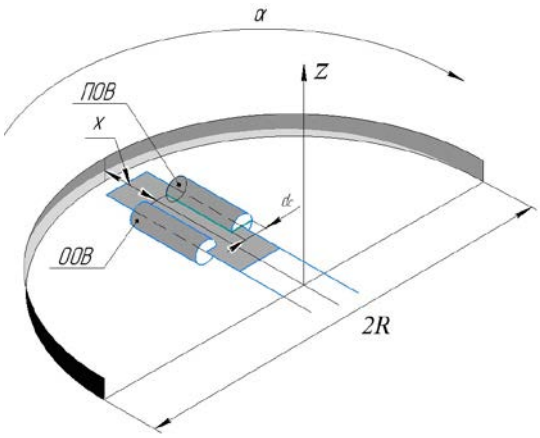



***Рисунок 2 – Ход луча от ПОВ до ООВ***

Лучи 1 и 2 светового потока (СП) Ф0 отражаются от нижней части ОМЭ и частично поглощаются верхней частью ОМЭ. Площадь поверхности ОМЭ $S_{отр}$, которая отражает поступающий световой поток Ф0 и определяющая вид функции преобразования МОМ датчика, определяется выражением

$$S_{отр}(\alpha)=\frac{(d_c)^2}{8}(\pi-2\arcsin(2\frac{\sqrt{(\frac{\pi R\alpha}{180})^2+(\frac{d_c}{2})^2}}{d_c}\sin(arctg(\frac{90d_c}{\pi R\alpha})-arctg(\frac{d_c}{\pi R}))) - \\ -\sin(\pi-2\arcsin(2\frac{\sqrt{(\frac{\pi R\alpha}{180})^2+(\frac{d_c}{2})^2}}{d_c}\sin(arctg(\frac{90d_c}{\pi R\alpha})-arctg(\frac{d_c}{\pi R})))). \quad (1)$$

где $d_c$ - диаметр сердцевины оптического волокна;

$R$ - радиус кривизны ОМЭ (пластины).

По результатам моделирования в программе Mathcad 15 построен график зависимости $S(\alpha)/S_0=f(\alpha)$ при следующих параметрах: диаметр сердцевины оптического волокна $d_c$=0,2 мкм, апертурный угол $\theta_{NA}$=12°, высота пластины $h=d_c$, радиус кривизны пластины $R$=31,1 мм (рисунок 3).

Анализ графика, приведенного на рисунке 3, показал, что при выбранных параметрах функция преобразования $S(\alpha)/S_0=f(\alpha)$ достаточно линейная, соответственно данный ВОМДУП может быть использован в системе диагностики ЧЛП.

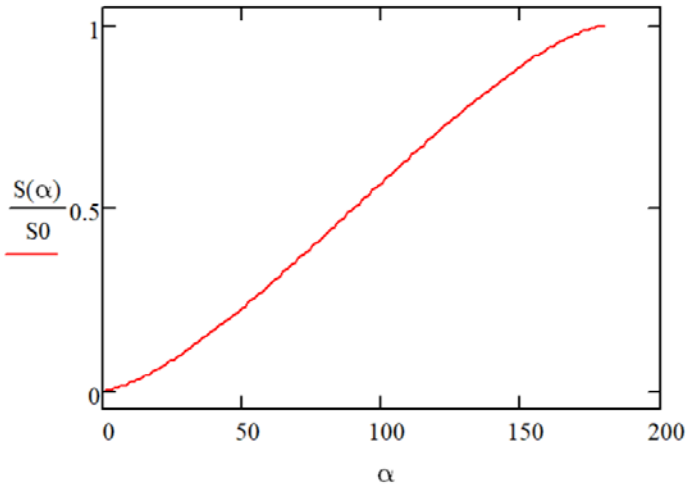



***Рисунок 3 – Функция преобразования $S(\alpha)/S_0=f(\alpha)$***

**Выводы**

Предлагаемый ВОМДУП позволит:

- повысить точность измерения угла поворота в диапазоне 0…180 градусов;
- сократить в 1,5…2 раза время проведения измерения морфометрических параметров при ЧЛП;
- обеспечить высокую воспроизводимость (до 98 %) результатов измерений;
- исключить любые негативные последствия от электромагнитного воздействия на пациента, а также на результаты измерения.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новым является:

- выведенная формула функции преобразования МОМС ВОДУП, позволяющая определить его конструктивно-технологические параметры.

***Благодарность***

***Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-15-20069, https://rscf.ru/project/22-15-20069/***

**Список литературы**

1. [1] Паспорт национального проекта №Здравоохранение» утв. указом Президента от 07.05.2018 г. № 204
2. https://www.zdrav.ru/articles/4293661137-nacionalnyj-proekt-zdravoohranenie-20-m10-12
3. [2] Патент RU 2623309 Способ измерения силы давления мышц языка на сегменты смежных анатомических образований полости рта/ Опубл. 23.06.2017 http://www.findpatent.ru/patent/262/2623309.html
4. [3] Ямашев И.Г., Матвеев Р.С. Язык: клинико-функциональные методы диагностики патологических состояний. - Чебоксары: АУ Чувашии ИУВ, 2012.
5. [4] Лучевая диагностика в стоматологии / А.Ю. Васильев, Ю.И. Воробьев, Н. С. Серова. – М. : ГЭОТАР Медиа, 2008. – 176 с.;
6. [5] Способы оценки ретенции и дистопии зубов по данным конусно-лучевой компьютерной томографии / З. И. Яруллина, И. В. Яхин // X-RAY ART. – 2013. – № 2 (01). – С. 15–22.
7. [6] Лучевая диагностика в стоматологии / А. Ю. Васильев, Ю. И. Воробьев, Н. С. Серова. – М. : ГЭОТАР Медиа, 2008. – 176 с.;
8. [7] Способы оценки ретенции и дистопии зубов по данным конусно-лучевой компьютерной томографии / З. И. Яруллина, И. В. Яхин // X-RAY ART. – 2013. – № 2 (01). – С. 15–22.
9. [8] Проблемные вопросы применения волоконно-оптических датчиков давления в медицинской практике /Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Геращенко С.И., Бростилова Т.Ю.// В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2021. Весенняя сессия. Москва, 2021. С. 16-32.
10. [9] Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А. Волоконно-оптические приборы и системы: Научные разработки НТЦ "Нанотехнологии волоконно-оптических систем" Пензенского государственного университета Ч.I // СПб.: Политехника, 2018. 187 с. https://doi.org/10.25960/7325-1132-1

**Сведения об авторах**

***Татьяна Ивановна Мурашкина***

*доктор техн. наук, профессор, профессор каф. «Приборостроение» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»*

*Пенза, Россия*

*Эл. почта:* timurashkina@mail.ru

**Information about author**

***Tatiana Ivanovna Murashkina***

*Doctor of (Tech.) Sciences, Professor, Professor of the Department of Instrument Engineering Penza State University*

*Penza, Russian Federation*

*E-mail:* timurashkina@mail.ru

***Бадеева Елена Александровна***
*доктор техн. наук, профессор, профессор каф. «Радиотехника и радиоэлектронные системы» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»*
*Пенза, Россия*
*Эл. почта:* badeeva_elena@mail.ru
***Владислав Александрович Бадеев***
студент кафедры «Приборостроение»
*ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»*
*Пенза, Россия*
*Эл. почта:* vladbadeev4464@gmail.com
***Васильев Юрий Анатольевич***
*ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»*
*Краснодар, Россия*
*Эл.почта: yurii-59@mail.ru*
***Аюпова Фарида Сагитовна***
*Кандидат мед.наук, доцент, доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»*
*Краснодар, Россия*
*Эл.почта: farida.sag@mail.ru*
***Арутюнов Арменак Валерьевич***
*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой стоматологии общей практики ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»*
*Краснодар, Россия*
*Эл.почта:armenak@mail.ru*

***Badeeva Elena Aleksandrovna***
*Doctor of Engineering, associate professor, professor of the Department of Radio Engineering and Radioelectronic Systems, Penza State University*
*Penza, Russian Federation*
*E-mail:* badeeva_elena@mail.ru
***Vladislav Alexandrovich Badeev***
*student of the Department of "Instrument Engineering" Penza State University*
*Penza, Russian Federation*
*E-mail:* vladbadeev4464@gmail.com
***Vasiliev Yuri Anatolyevich***
*Assistant of the Department of Public Health, Public Health and the History of Medicine, Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*Email address: yurii-59@mail.ru*
***Ayupova Farida Sagitovna***
*Candidate of Med.Science, associate professor, assistant Professor of the Department of Paediatric Dentistry, Orthodontics and Oral Surgery, Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*Email address: farida.sag@mail.ru*
***Arutyunov Armenak Valerievich***
*Doctor of Medical Science, Professor, Head of the Department of General Practice Dentistry, Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*Email address:armenak@mail.ru*

УДК 62.93, 62-791.2
ГРНТИ 59.14, 59.31
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.129-135

**Т.В. Гайворонская[1], Ф.С. Аюпова[1],**
**Т.И. Мурашкина[2], Ю.А .Васильев[1],**
**Е.А. Бадеева[2], Е.Ю. Плотникова[1], Зуб.А.В[1],**
**А.В. Арутюнов[1], А.В. Оленская[1],**
**И.А. Куликова[1], В.В. Волобуев[1]**
[1]Кубанский государственный медицинский университет,
[2]Пензенский государственный университет,

# МИКРОЭЛЕКТРОННЫЕ, ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОГО ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ

*Обосновано применение микроэлектронных и волоконно-оптических технологий при оценке стоматологического и общего состояния здоровья детей и взрослых.*

***Ключевые слова:*** *микроэлектронная технология, волоконно-оптическая технология, диагностика, стоматологическое здоровье*

**T.V. Gaivoronskaya[1], F.S. Ayupova[1],**
**T.I. Murashkina[2], Yu.A.Vasiliev[1],**
**E.A. Badeeva[2], E.Yu. Plotnikova[1], A.V.Zub[1].,**
**A.V. Arutyunov[1], A.V. Olenskaya[1],**
**I.A. Kulikova[1], B.V. Volobuev[1]**
[1]Kuban State Medical University, Krasnodar
[2]Penza State University, Penza

## MICROELECTRONIC, FIBER-OPTIC TECHNOLOGIES AS A PROMISING DIAGNOSTIC METHOD DENTAL HEALTH OF CHILDREN AND ADULTS

*The use of microelectronic and fiber-optic technologies in assessing the dental and general health of children and adults is justified.*

***Keywords:*** *microelectronic technology, fiber-optic technology, diagnostics, dental health*

**Введение**

В настоящее время изменения параметрических и морфометрических характеристик отдельных областей лица и шеи, обусловленных развитием челюстно-лицевых патологий, определяются путем применения накопленного профессионального опыта врача или косвенными методами диагностики с помощью устаревших, иногда небезопасных для пациента средств измерений, визуализации.

Так, литературные данные свидетельствуют о значительной распространенности нарушений осанки и аномалий окклюзии у детей. Нарушения осанки у детей в 90% случаев сочетаются с аномалиями окклюзии. Эта проблема требует к себе повышенного внимания для поиска путей раннего выявления, своевременного устранения нарушений осанки и прикуса, всестороннего оздоровления детей.

Публикации, содержание которых предполагает взаимосвязь между изменениями осанки и аномалиями прикуса, описывают основные виды нарушений осанки, причины их возникновения, а также современные способы и средства их выявления, пути профилактики и лечения. Однако, нами выявлены трудности в широком применении существующих методов диагностики нарушений осанки и в этой связи считаем актуальным усовершенствование диагностических подходов и средств и широкое их внедрение в практику [1]. Актуальность таких исследований определяется необходимостью решения сложной социально значимой проблемы, в основе которой - постуральные нарушения, которыми страдают более чем 80% обследованных детей и подростков. Благополучное развитие детского организма является залогом хорошего здоровья, определяющего фундаментальный запас жизненных сил растущего организма и качество жизни детей [2].

**Цель работы –** исследование возможности применения микроэлектронных и волоконно-оптических технологий при оценке стоматологического состояния здоровья детей и взрослых.

**Материалы и методы**

Авторами изучены особенности профилактики и лечения различных видов патологии челюстно-лицевой области и нарушений осанки, изучены литературные данные о современных способах диагностики, профилактики и устранения. Проведен поиск источников литературы в базах данных CyberLeninka, E-library и MEDLINE/PubMed по ключевым словам, соответствующим челюстно-лицевой патологии, и подробный анализ своих клинических наблюдений.

**Полученные результаты**

Зубочелюстные аномалии (ЗЧА) составляют важную группу в структуре тесно взаимосвязанных между собой патологических состояний зубочелюстно-лицевой области (ЗЧЛО), приносят ощутимый ущерб эстетическому и функциональному состоянию ЗЧЛО, влияют на качество жизни детей. Ретроспективный анализ медицинских карт стоматологического больного (формы № 043-У) 115 детей в возрасте от 3 до 6 лет, получавших лечение в Клинике ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ, показал, что абсолютное

большинство (77,39%) детей имели кариозные поражения, индекс «кп» составил в среднем 4,26. У 22,6% детей были выявлены признаки локального катарального гингивита легкой степени тяжести. Уровень гигиены полости рта в обследованной группе составил 1,78 (среднее значение), что соответствует удовлетворительному уровню. 22,61% детей имели аномалии положения зубов, 55,65% детей - аномалии зубных рядов, 57,39% детей - аномалии окклюзии. У 41,74% детей были удалены временные зубы по причине осложнений кариеса. Аномалии уздечек губ и языка были выявлены у 17,39% из 115 детей. Таким образом, уже в периоде временного прикуса значительная часть детей страдает теми или иными стоматологическими заболеваниями [3].

У большинства из 20 детей (86%), обратившихся к ортодонту в начальном периоде сменного прикуса, пропорциональность среднего и нижнего отделов, тип профиля и, в целом, конфигурация лица, соответствовали виду патологической окклюзии, что приводило к эстетическим и функциональным нарушениям. Состояние временных зубов, сроки и последовательность прорезывания постоянных зубов у 23 % детей отличались от возрастных норм. У большинства детей методом ортопантомографии были выявлены неравномерная резорбция корней временных зубов, леченных по поводу пульпита и/или периодонтита, и аномальное положение зачатков постоянных зубов. У 6 детей (30%) детей поражённые временные зубы были удалены. Из 20 детей, обратившихся к ортодонту в конечном периоде сменного прикуса, у 15 % (3 чел.) была выявлена нейтральная окклюзия, у 30 % (6 чел.) – дистальная окклюзия, у 5 % (1чел.) – перекрёстная окклюзия, у 5 % (1 чел.) – открытая дизокклюзия, у 5 % (1 чел.) – мезиальная окклюзия, у 40 % детей (8 чел.) – сочетанные аномалии окклюзии. При этом признаки окклюзионных нарушений, характер аномалий зубных рядов и их соотношений у детей не зависели от территории проживания. Аномалии окклюзии сопровождались характерными изменениями конфигурации лица, аномалиями формы и размеров зубных дуг, аномалиями положения и развития отдельных зубов. Для устранения ЗЧА применяли ортодонтические устройства 65 механического, функционального и комбинированного действия, миотерапию. Нами отмечено, что решающими фактором в плане устранения аномалий окклюзии в периоде сменного прикуса является достижение индивидуальной нормы формы и размеров зубных рядов, а также - устранение факторов риска. Активная миотерапия и достижение миодинамического равновесия в зубочелюстно-лицевой области, устранение «вредных привычек», нарушений функций дыхания, глотания, речи способствовали устранению ЗЧА [4]. Для повышения качества ортодонтического лечения нами разработано и внедрено в практику устройство для функциональной и механической коррекции недоразвития верхней и нижней челюстей, которое позволяет оказать комплексное функциональное и механическое лечебно-профилактическое воздействие в периоде активного роста зубочелюстно-лицевой области, нормализовать форму и размеры зубоальвеолярных дуг и положение постоянных зубов в сагиттальном, вертикальном и трансверсальном направлениях, обеспечить условия для формирования физиологического, функционально полноценного постоянного прикуса, сократить сроки ортодонтического лечения. При этом устройство за счёт сочетанного влияния на функциональные и механические дефекты верхней и нижней челюстей позволяет получать устойчивые, функционально полноценные результаты реабилитации у растущих пациентов с недоразвитием верхней и нижней челюстей [5].

Зубочелюстным аномалиям сопутствуют кариес и его осложнения. Учитывая, что распространенность кариеса постоянных зубов у детей 6-летнего возраста в России достигает 13%, авторами изучены возможности ранней профилактики. Известно, что минерализации эмали зубов продолжается в течение нескольких лет после прорезывания постоянных зубов. Для предупреждения кариозного разрушения первых постоянных моляров в течение первого года после их прорезывания считают эффективной проведение герметизации фиссур. Проведено сравнение профилактической роли герметизации фиссур, проведенной с применением двух методик - 105 зубов у 30 детей с использованием

воздушно-абразивного метода и 89 зубов у 28 детей, которым была проведена стандартная неинвазивная герметизация. Результаты эффективности герметизации определяли по модифицированной формуле Э.М. Мельниченко через 3, 6, 12, 18 и 24 мес. К концу максимального срока наблюдения ретенция силанта была лучше в опытной группе (до 76,19%), в сравнении с контрольной группой (48,31%). В основной группе кариес выявлен в 3,81% случаев, а в контрольной - в 12,37%. Таким образом, эффективность герметизации фиссур с помощью воздушно-абразивного метода по сравнению с неинвазивной методикой оказалась выше на 63,4% ($\chi 2 = 16,638$, $p < 0,001$) [6].

Обращает внимание, что для достоверной диагностики стоматологической патологии у детей в периодах временного и сменного прикуса применяют рентгенологические методы исследования, которые при частом использовании могут принести вред здоровью ребёнка.

Известно, что миодинамическое равновесие мышечной системы челюстно-лицевой области обеспечивает необходимые условия для нормального развития зубочелюстной системы. Нарушение функций мышц лицевой и ротовой области - мощный этиопатогенетический фактор в возникновении аномалий положения зубов и развития верхней и нижней челюстей. Среди таких факторов наиболее часто встречаются привычка сосать палец, дыхание ртом (при отсутствии генетически, анатомически и физиологически обусловленного носового дыхания), отсутствие правильного смыкания губ и инфантильное глотание. Особое значение имеет положение языка при ротовом дыхании, так как ребёнок, прокладывая язык между зубными дугами, способствует значительному вестибулярному наклону верхних резцов. В результате данных изменений формируется дизокклюзия в вертикальной плоскости. Дополнительное давление натянутых щёчных мышц, появляющееся при ротовом дыхании, обеспечивает ещё большее сужение зубных рядов. Формирование данной патологии оказывает влияние не только на состояние общего здоровья (нарушения носового дыхания, глотания, жевания, звукопроизношения и осанки), но и на социальную адаптацию ребёнка. В связи с этим у детей необходим комплексный подход в диагностике и коррекции миофункциональных нарушений челюстно-лицевой области. Для определения миофункциональных нарушений определяют биоэлектрическую активность жевательных и височных мышц [7] методом электромиографии, однако использование таких приборов может отрицательно влиять на здоровье маленьких детей.

В этой связи авторами поставлена задача внедрить в практику безвредные для организма детей устройства и способы диагностики патологий челюстно-лицевой области. Так, разработан новый оптический способ определения размеров и конфигурации нёба пациента с челюстно-лицевой патологией по изменению расстояния до отдельных точек нёба посредством отраженного от нёба светового потока, реализуемого с помощью нового 3D-волоконно-оптического сканера в виде платформы с полозьями, по которым перемещается волоконно-оптический чувствительный элемент [8].

Разработана методика измерения давления языка на нёбо при разных положениях языка в полости рта у пациентов разного возраста и пола при челюстно-лицевых патологиях с помощью волоконно-оптического микросенсора давления, обеспечивающая высокие точность, воспроизводимость и достоверность результатов измерений [9].

Среди стоматологических заболеваний острую проблему для взрослого населения создают воспалительно-деструктивные заболевания пародонта, для лечения которых авторами доказана клиническая и иммунологическая эффективность применения препарата на основе растительных компонентов «Хлорофиллипт» в качестве дополнения к традиционному консервативному лечению. Пациенты с диагнозом «хронический генерализованный пародонтит» были разделены на 2 группы: основную ($n = 25$) и сравнения ($n = 25$). Пациентам основной группы применяли базовую терапию и традиционное консервативное лечение с дополнительным включением препарата «Хлорофиллипт». Группа сравнения получала базовую терапию и традиционное консервативное лечение. Для оценки эффективности терапии оценивались клинические показатели и уровни

цитокинов IL-1β, IL-1Ra, IL-8, TNF-α в десневой жидкости до и после лечения через 14 дней, 3 и 6 месяцев. Авторы считают, что результаты определения уровня цитокинов IL-1β, IL-1Ra, TNF-α у пациентов с хроническим пародонтитом могут быть потенциально полезны для оценки реакции тканей пародонта на проводимую терапию [10,11].

**Выводы**

Изучив большое количество публикаций отечественных и зарубежных авторов, а также на основании собственных исследований, авторы данной статьи убедились в актуальности разработки комплексного подхода к определению диагностических признаков челюстно-лицевых патологий и других заболеваний органов лица и шеи, усовершенствования известных и создания новых технологических диагностических микроэлектронных, волоконно-оптических средств, рассматривают возможность их разработки и внедрения в стоматологическую практику для получения достоверной и своевременной информации и установления окончательного диагноза в каждом конкретном случае с учетом возрастных особенностей и особенностей челюстно-лицевых патологий.

**Заключение**. Авторы считают, что в данной работе новым является новый подход к определению стоматологического здоровья населения, основанный на перспективных микроэлектронных и волоконно-оптических технологиях.

## БЛАГОДАРНОСТИ, СВЕДЕНИЯ О СПОНСОРАХ

***Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-15-20069, https://rscf.ru/project/22-15-20069/***

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. К вопросу о взаимосвязи патологий осанки и прикуса у детей и способах их выявления / Ф. С. Аюпова, Т. И. Мурашкина, Т. В. Гайворонская [и др.] // Вопросы практической педиатрии. – 2022. – Т. 17, № 6. – С. 89-96. – DOI 10.20953/1817-7646-2022-6-89-96. – EDN CKHZAK.
2. Рациональная осанка как приоритет сохранения и укрепления здоровья детей / Ф. С. Аюпова, С. Н. Алексеенко, Т. В. Гайворонская [и др.] // Стоматология детского возраста и профилактика. – 2022. – Т. 22, № 3(83). – С. 224-235. – DOI 10.33925/1683-3031-2022-22-3-224-235. – EDN IFPDBS.
3. Аюпова, Ф. С. Структура патологии полости рта у детей, обратившихся за стоматологической помощью в периоде временного прикуса / Ф. С. Аюпова, В. В. Волобуев, Ж. В. Собирова // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2022. – № 1. – С. 144-147. – DOI 10.37882/2223-2966.2022.01.07. – EDN AVMCWD.
4. https://www.elibrary.ru/item.asp?id=50766375
5. Аюпова, Ф. С. Результаты диагностики и комплексного лечения зубочелюстных аномалий у детей в периодах сменного прикуса / Ф. С. Аюпова, А. Р. Восканян // Актуальные вопросы стоматологии : Сборник научных трудов, посвященный основателю кафедры ортопедической стоматологии КГМУ, Профессору Исаак Михайловичу Оксману, Казань, 18 февраля 2023 года. – Казань: Казанский государственный медицинский университет, 2023. – С. 58-67. – EDN WNPEHG.
6. Патент на полезную модель № 212978 U1 Российская Федерация, МПК A61C 7/00. Устройство для функциональной и механической коррекции недоразвития верхней и нижней челюстей : № 2022112739 : заявл. 06.05.2022 : опубл. 17.08.2022 / Ф. С. Аюпова, Т. В. Гайворонская. – EDN OQUQJH.
7. Использование воздушно-абразивного метода при герметизации фиссур постоянных зубов у детей / В. В. Волобуев, М. Н. Митропанова, О. А. Павловская [и др.] // Стоматология детского возраста и профилактика. – 2023. – Т. 23, № 2(86). – С. 153-159. – DOI 10.33925/1683-3031-2023-622. – EDN ACOBQW.

8. Игнатьева, Л. А. Определение миофункциональных нарушений у детей в период сменного прикуса / Л. А. Игнатьева, Н. Х. Хамитова // Клиническая стоматология. – 2018. – № 1(85). – С. 61-63. – DOI 10.37988/1811-153X_2018_1_61. – EDN YVEWBV.
9. Волоконно-оптический сканер для определения морфометрических параметров нёба пациента / Т. И. Мурашкина, Е. А. Бадеева, Т. В. Истомина [и др.] // Медицинская техника. – 2023. – № 1(337). – С. 15-18. – EDN ANHSNC.
10. методика измерения давления языка на нёбо при челюстно-лицевых патологиях с помощью волоконно-оптического микросенсора / Т. И. Мурашкина, Е. А. Бадеева, Ю. А. Васильев [и др.] // Актуальные проблемы медицинской науки и образования (АПМНО-2022) : Сборник статей по материалам VIII Международной научной конференции, Пенза, 22–23 сентября 2022 года. – Пенза: Пензенский государственный университет, 2022. – С. 115-117. – EDN MJHEZW.
11. Клиническая и иммунологическая оценка эффективности применения препарата на основе листьев эвкалипта при лечении хронического пародонтита: рандомизированное интервенционное продольное клиническое исследование / А. А. Зуб, Т. В. Гайворонская, А. Ю. Муратова, А. В. Арутюнов // Кубанский научный медицинский вестник. – 2022. – Т. 29, № 6. – С. 26-40. – DOI 10.25207/1608-6228-2022-29-6-26-40. – EDN LVTECW.
12. Зуб, А. А. Клиническая и биохимическая оценка эффективности применения препарата на основе листьев эвкалипта при лечении хронического пародонтита: Рандомизированное контролируемое экспериментальное исследование / А. А. Зуб, Т. В. Гайворонская // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2022. – Т. 12, № 4. – С. 29-36. – DOI 10.29039/2224-6444-2022-12-4-29-36. – EDN CWHXSV.

**Сведения об авторах исправить**
**Т.В. Гайворонская,**
*д.м.н., профессор, зав. кафедрой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии*
***Эл. почта: gtv2021rnf@mail.ru***

**Ф.С.Аюпова,**
*к.м.н., доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии*
*Эл. почта: farida.sag@mail.ru*

***Мурашкина Татьяна Ивановна***
*д.т.н., профессор, профессор кафедры «Приборостроение»*
*Пензенский государственный университет*
*Пенза, Россия*
*Эл. почта: timurashkina@mail.ru*
***Васильев Юрий Анатольевич***
*ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины Кубанский государственный медицинский университет*
*Краснодар, Россия*
*Эл. почта: yurii-59@mail.ru*
***Бадеева Елена Александровна***
*д.т.н., доцент, профессор кафедры «Радиотехника и радиоэлектронные системы» Пензенский государственный университет Пенза, Россия Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru*

**Information about author**
**T.V. Gayvoronskaya,**
*Ph. D. in medical science, full professor, head of the Departments of surgery dentistry and maxillofacial surgery*
***E-mail: gtv2021rnf@mail.ru***

**F.S. Ayupova,**
*Ph. D. in medical science, associate professor of the Departments of pediatric dentistry, orthodontics and maxillofacial surgery*
*E-mail: farida.sag@mail.ru*

***Murashkina Tatiana Ivanovna***
*Doctor of Technical Sciences, Professor, Professor of the Department of "Instrument Engineering"*
*Penza State University*
*Penza, Russia*
*E-mail: timurashkina@mail.ru*
***Vasiliev Yuri Anatolyevich***
*Assistant of the Department of Public Health, Healthcare and History of Medicine*
*Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: yurii-59@mail.ru*

***Badeeva Elena Aleksandrovna***
*Doctor of Technical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Radio Engineering and Radio Electronic Systems Penza State University Penza, Russia*
*E-mail: badeeva_elena@mail.ru*

**Е.Ю. Плотникова,** *врач-неонатолог отделения новорожденных №1*
*Эл. почта: cat.roll@yandex.ru*
***А.В.Зуб.,***
*К.м.н.. доцент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Эл. почта: anna.zub_1994@mail.ru*
**А.В. Арутюнов,**
*д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей стоматологии Эл. почта: armenak@mail.ru*
**А.В.Оленская** *ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины Кубанский государственный медицинский университет Краснодар, Россия Эл. почта:*alexzobenko@mail.ru
***Куликова Ирина Александровна***
*студентка лечебного факультета*
*Кубанский государственный медицинский университет*
*Краснодар, Россия*
*Эл. Почта: dockulikowa@yandex.ru*
**В.В. Волобуев,** *к.м.н., доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии*
*Эл. почта: vladimir.volobueff@yandex.ru*

**E.Yu. Plotnikova,** *Neonatologist of the department of newborns* ***No. 1***
***E-mail: cat.roll@yandex.ru***
***A.V.Zub,***
*PhD, Associate Professor of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery*
***E-mail:*** *anna.zub_1994@mail.ru*
**A.V. Arutyunov,**
*Ph. D. in medical science, full professor, head of the Departments of dentistry* ***E-mail: armenak@mail.ru***
**A.V.Olenskaya** *Assistant of the Department of Public Health, Public Health and the History of Medicine Kuban State Medical University Krasnodar, Russia* ***E-mail:*** alexzobenko@mail.ru

***Kulikova Irina Aleksandrovna***
*student of the Faculty of Medicine Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: dockulikowa@yandex.ru*

**V.V. Volobuev,** *Ph. D. in medical science, associate professor of the Departments of pediatric dentistry, orthodontics and maxillofacial surgery*
***E-mail: vladimir.volobueff@yandex.ru***

ДК 62.93, 62-791.2
ГРНТИ 59.14, 59.31
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.135-139

**Т.И. Мурашкина, В.А. Бадеев**
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

## ИЗМЕРЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ КАЧЕСТВА ЖИДКОСТЕЙ В СИСТЕМАХ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

*Обосновано применение волоконно-оптического рефрактометрического микродатчика для контроля качества жидкостей в системах жизнеобеспечения медицинских учреждений и космических аппаратов, принцип действия которого основан на измерении изменения показателя преломления жидкостей.*

***Ключевые слова:*** *волоконно-оптический рефрактометрический измерительный преобразователь, система жизнеобеспечения, коэффициент преломления, качество жидкости, световой поток, апертурный угол*

**T.I. Murashkina, V.A. Badeev**
Penza State University

## MEASUREMENT OF LIQUID QUALITY PARAMETERS IN LIFE SUPPORT SYSTEMS

*The use of a fiber-optic refractometric micro-sensor for quality control of liquids in life support systems of medical institutions and spacecraft, the principle of operation of which is based on measuring changes in the refractive index of liquids, is justified.*

***Keywords:*** *fiber-optic refractometric measuring transducer, life support system, refractive index, liquid quality, luminous flux, aperture angle*

**Введение**

Для обеспечения жизнедеятельности космонавта на борту космического аппарата (КА) применяют системы жизнеобеспечения (рисунок 1) [1,2].

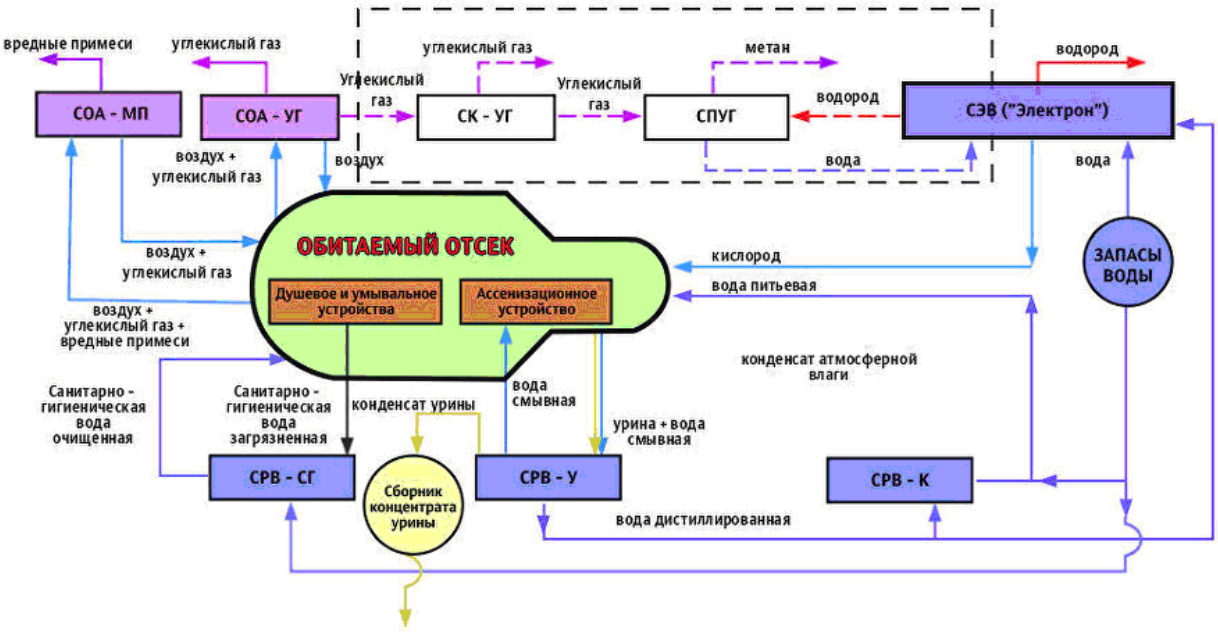



***Рисунок 1 - Структурная схема регенерационной системы жизнеобеспечения космической станции***

Среди основных функций систем жизнеобеспечения является подача жидкости, потребляемой человеком и удаление жидкости, образуемой в процессе его жизнедеятельности [3].

Для оценки состояния здоровья космонавтов необходим постоянный мониторинг качества жидкостных сред в системах жизнеобеспечения.

Аналогичные процессы происходят и в системах жизнеобеспечения в медицинских учреждениях. От качества жидкостей систем жизнеобеспечения в реабилитационных помещениях медучреждений зависит жизнь пациента.

**Цель работы –** исследование возможности измерения параметров качества жидкостных сред в системах жизнеобеспечения с помощью волоконно-оптических средств измерений.

**Материалы и методы**

Проведен анализ известных способов и средств измерения параметров качества жидкостей [4 - 8]. Определено, что известные средства измерений имеют или большие габариты, или требуют длительной процедуры калибровки, или имеют сложную аппаратную реализацию и, соответственно, большую стоимость. Но основной недостаток их использования в системах жизнеобеспечения, – это влияние электромагнитного поля, которое они создают, на здоровье космонавта или пациента [9]. Поэтому авторами (в соавторстве) в 2021 году была подана заявка на изобретение №2021130405 «Волоконно-оптический способ определения коэффициента преломления прозрачного вещества и реализующий его волоконно-оптический рефрактометрический измерительный преобразователь», по которой получен патент на изобретение № 2796797 [10].

**Полученные результаты**

Для определения качества жидкости по изменению ее коэффициента преломления небольшое ее количество помещается в цилиндрической прозрачной трубке 1, с одной стороны которой располагается подводящее оптическое волокно (ПОВ) 3 для передачи света от источника излучения на первую боковую поверхность трубки, а с другой стороны – отводящие оптические волокна (ООВ) 4 и 5 двух измерительных каналов, по которым преломленный свет, несущий информацию о коэффициенте преломления $n_3$

жидкости 2, направляется на приемники излучения (рисунок 2).

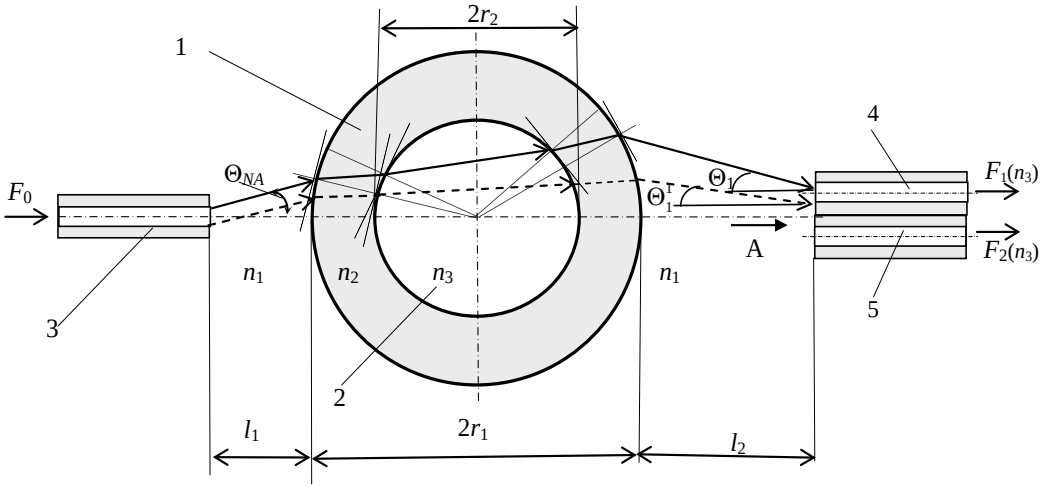



***Рисунок 2 – Ход луча от ПОВ до ООВ***

С помощью светодиода формируется световой поток $F_0$, который выходит под постоянным апертурным углом оптического волокна $\Theta_{NA}$ с излучающего торца ПОВ 3 в виде конуса [11] в направлении цилиндрической прозрачной ёмкости с жидкостью, коэффициент преломления которой определяется.

Световой поток падает поочередно на первую и вторую боковые цилиндрические поверхности трубки 1 с жидкостью 2. В соответствии с законом Снеллиуса лучи света преломляются на границах разделов сред: «воздух - трубка», «трубка - жидкость», «жидкость - трубка», «трубка - воздух». После выхода из трубки лучи падают на приемные торцы ООВ 4 и 5 первого и второго измерительных каналов под углами $\Theta_1$,$\Theta'_1$, зависящими от коэффициентов преломления $n_1$, $n_2$, $n_3$ воздуха, трубки и жидкости соответственно и соотношения размеров всех сред волоконно-оптического измерительного преобразователя.

В зависимости от коэффициента преломления жидкости $n_3$ изображение торца ПОВ в плоскости расположения ООВ меняет свой контур, что, в свою очередь, ведет к изменению площади перекрытия приемных торцов оптических волокон 4 и 5 световым пятном и, соответственно интенсивности световых потоков $F_1(n_3)$ и $F_2(n_3)$ на выходных торцах ООВ [10]. Верхняя часть светового потока поступает по ООВ 4 на первый приемник излучения, нижняя часть светового потока по ООВ 5 поступает на второй приемник излучения.

Перед началом измерения в полость трубки заливают калибровочную жидкость с известным коэффициентом преломления $n_0$, далее на место трубки с калибровочной жидкостью помещают аналогичную трубку с жидкостью, коэффициент преломления $n_3$ которой необходимо определить. По изменению в $k$-раз интенсивности оптического сигнала на выходе ООВ определяют коэффициент преломления жидкости по формуле $n_3=kn_0$.

**Выводы**

Предлагаемый подход при измерении качества жидкости позволит:

- повысить точность измерения показателей преломления жидкостей в системах жизнеобеспечения;
- сократить в 1,5…2 раза время проведения измерения параметров качества жидкости;
- обеспечить высокую воспроизводимость (до 98 %) результатов измерений;
- исключить любые негативные последствия от электромагнитного воздействия на космонавта или пациента, а также на результаты измерения.

**Заключение**.

Авторы считают, что в данной работе новым является:

- запатентованный волоконно-оптический рефрактометрический способ и устройство для его реализации для измерения показателей качества жидкостей в системах жизнеобеспечения на основе измерения показателей преломления исследуемых жидкостей.

## БЛАГОДАРНОСТИ, СВЕДЕНИЯ О СПОНСОРАХ

***Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-29-10017*** https://rscf.ru/project/23-29-10017/

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Камалетдинова Г.Р., Курмазенко Э.А., Хабаровский Н.Н., Кочетков А.А., Гаврилов Л.И., Моруков Б.В., Демин Е.П. Влияние конструктивных особенностей регенерационных систем жизнеобеспечения на эффективность обслуживания экипажем систем с использованием специализированного аппаратно-программного комплекса «АПКОЭС».
2. Самсонов Н.М, Бобе Л.С., Гаврилов Л.И., Кочетков А.А., Курмазенко Э.А., Романов С.Ю, Железняков А.Г., Баранов В.М., Синяк Ю.Е. Регенерационные систем жизнеобеспечения экипажей космических станций // Известия РАН, Энергетика, 2009, №1, - С.61-68
3. Серебряков В. Н. Основы проектирования систем жизнеобеспечения экипажа космических летательных аппаратов. М.: Машиностроение, 1983. 163 с.
4. file:///C:/Users/1/Downloads/0174e29.pdf
5. Латышенко, К.П. Мониторинг загрязнения окружающей среды : учебник и практикум для среднего профессионального образования // Москва : Издательство Юрайт, 2019. - 375 с. URL: https://urait.ru/bcode/433597
6. Волков Р.И., Федоров Э.И. Способ измерения показателя преломления и устройство для его реализации, патент на изобретение №2292038, МПК G 01N 21/41, дата подачи заявки – 03.09.2005, опубликовано 20.01.2007, Россия
7. Волков Р.И., Федоров Э.И. Способ измерения показателя преломления и устройство для его реализации, патент на изобретение №2292038, МПК G 01N 21/41, дата подачи заявки – 31.01.2014, опубликовано 10.09.2015, Россия
8. Акмаров К.А., Артемьев В.В., Белов Н.П. Промышленные рефлектометры и их применение для контроля химических производств//Приборы. 2012. № 4(142) С. 1-8.
9. Бадеев В.А., Шачнева Е.А., Шапетько Л.А., Мурашкина Т.И. Применение волоконно-оптического рефрактометрического микродатчика при мониторинге состояния водной среды// Материалы, средства и технологии получения и обработки измерительной информации (Шляндинские чтения -2022): Материалы XIV Междунар. науч.-техн. конф. (г.Пенза 24-26 октября 2022)/под ред. Е.А.Печерской. – Пенза: Изд.-во ПГУ. – 2022- С.106-108
10. Патент на изобретение РФ 2796797 С2, Волоконно-оптический способ определения коэффициента преломления прозрачного вещества и реализующий его волоконно-оптический рефрактометрический измерительный преобразователь/ Бадеева Е.А., Бадеев В.А., Мурашкина Т.И., Серебряков Д.И., Хасаншина Н.А., Васильев Ю.А., Кукушкин А.Н.
11. Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А. Волоконно-оптические приборы и системы: Научные разработки НТЦ "Нанотехнологии волоконно-оптических систем" Пензенского государственного университета Ч.I // СПб.: Политехника, 2018. 187 с. https://doi.org/10.25960/7325-1132-1

**Сведения об авторах**
***Татьяна Ивановна Мурашкина***
*доктор техн. наук, профессор, профессор каф. «Приборостроение» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»*
*Пенза, Россия*
*Эл. почта:* timurashkina@mail.ru
***Владислав Александрович Бадеев***
Лаборант-исследователь научно-технического центра «Нанотехнологии волоконно-оптических систем» *ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»*
*Пенза, Россия*
*Эл. почта:* vladbadeev4464@gmail.com

**Information about author**
***Tatiana Ivanovna Murashkina***
*Doctor of (Tech.) Sciences, Professor, Professor of the Department of Instrument Engineering Penza State University*
*Penza, Russian Federation*
*E-mail:* timurashkina@mail.ru
***Vladislav Alexandrovich Badeev***
*Laboratory assistant researcher at the Scientific and Technical Center "Nanotechnology of fiber-optic systems" Penza State University*
*Penza, Russian Federation*
*E-mail:* vladbadeev4464@gmail.com

УДК 618.38:616-079.4
ГРНТИ 59.31.31
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.139-142

**Е.Ю. Плотникова[1], В.В. Волобуев[1], Т.И. Мурашкина[2], Е.А. Бадеева[2], И.А. Куликова[1] Ю.А. Васильев[1]**
[1]Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар
[2]Пензенский государственный университет, г. Пенза

## ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЗУСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА У НОВОРОЖДЁННЫХ ИЗМЕРИТЕЛЬНЫМ ОПТИКО-ВОЛОКОННЫМ УСТРОЙСТВОМ

*В статье излагается необходимость в повышении точности и надежности при оценке физических параметров плода при рождении путём перехода к объективным показателям. Это позволит стандартизировать оценочные компоненты и обеспечит единое толкование между различными медицинскими учреждениями. Объективные показатели также позволяют собирать и анализировать большие объемы данных, делая возможным выявление скрытых тенденций и шаблонов, которые могут быть пропущены при субъективных оценках. Улучшенная точность диагностики и снижение погрешностей позволит обеспечить раннее выявление отклонений и принятие своевременных мер для снижения рисков неблагоприятных исходов у новорожденного.*

***Ключевые слова:*** *давление языка, датчик, волоконно-оптический рефрактометрический измерительный преобразователь*

УДК 618.38:616-079.4
ГРНТИ 59.31.31

**E.Yu. Plotnikova[1], V.V. Volobuev[1], T.I. Murashkina[2], E.A. Badeeva[2], I.A. Kulikova[1], Yu.A. Vasiliev[1]**
[1]Kuban State Medical University, Krasnodar
[2]Penza State University, Penza

## DETECTION OF THE UNCONDITIONED REFLEX IN NEWBORNS WITH A MEASURING FIBER-OPTIC DEVICE

*The article outlines the need to improve accuracy and reliability in assessing the physical parameters of the fetus during childbirth by moving to objective indicators of the designated area. This will standardize the evaluation components and ensure their interconnection between different medical institutions. Objective indicators also allow you to collect and analyze large amounts of data, making it possible to identify hidden trends and patterns that may be missed*

*in subjective assessments. Improved diagnostic accuracy and reduced errors will ensure early detection of abnormalities and timely measures to reduce the risks of adverse outcomes in the fetus and newborn.*

***Keywords**: tongue pressure, sensor, fiber optic refractometric measuring transducer*

**Введение.**

В своё время И.П. Павлов ввёл термин «безусловный рефлекс» (1903). К безусловным, или врожденным рефлексам, относят сосание, глотание, мигание, чихание и т.д. Организм новорожденного таким образом приспосабливается к новым условиям жизни. Без данных защитных и ответных реакций ребенок не смог бы найти и «взять» грудь матери, осуществить «правильные» сосательные движения [1]. По степени выраженности рефлекса, можно судить о каких-либо изменениях и нарушениях в организме новорождённого. В настоящее время нет четкой единой физической системы измерения и объективизации здоровья младенца. В практической медицине специалисты часто руководствуются субъективными показателями (человеческий фактор) [2]. Для устранения возможных несовпадений в диагностике, назрела необходимость внедрения объективных диагностических методов на физических принципах работы.

**Цель работы.**

Изложение необходимости в повышении точности и надежности при оценке физических параметров ребёнка при рождении, путём перехода к объективным показателям. Это позволит стандартизировать оценочные компоненты и обеспечит их взаимосвязь между различными медицинскими учреждениями. Объективные показатели также позволяют собирать и анализировать большие объемы данных, делая возможным выявление скрытых тенденций и шаблонов, которые могут быть пропущены при субъективных оценках. Улучшенная точность диагностики и снижение погрешностей позволит обеспечить раннее выявление отклонений и принятие своевременных мер для снижения рисков неблагоприятных исходов у новорожденного.

**Материалы и методы.**

В нашей работе мы провели пилотные измерения давления языка на нёбо у родившихся детей (N=25) по ранее описанной методике [3, 4]. Дети находились в разных физических состояниях, так же рожденные оперативным путем, в виде операции кесарева сечения и путем физиологических родов. Измерения проводилось у каждого ребёнка трехкратно. Результаты заносились в базу данных исследуемой группы. Детальное изучения вопроса потребует большой выборки детей с делением по различным нозологическим формам.

**Полученные результаты.**

В ходе исследования было установлено минимальное значение давления языка у детей (рис. 1), из трёх измерений.

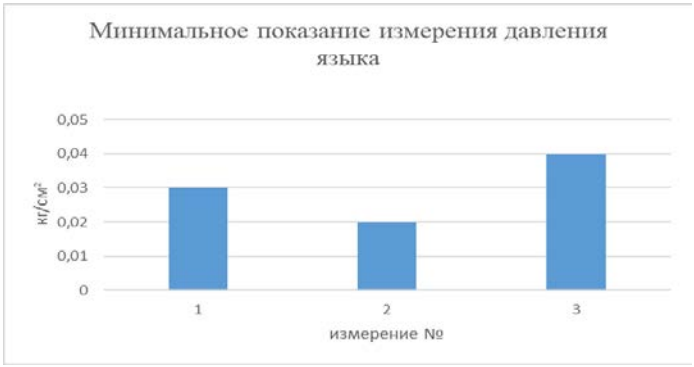



***Рисунок 1. Минимальные значения давления языка у детей***

*Рисунок 2. Максимальные значения давления языка у детей*

*Рисунок 3. Средние значения давления языка у детей*

**Выводы.**

Авторский коллектив считает данное исследование перспективным и прогностическим с возможным переносом данной концепции на измерение максимальных и минимальных показателей давления языка на момент рождения и нахождение в медицинском учреждении [5].

**Заключение.**

В данной работе новыми являются следующие положения и результаты: научно – исследовательский коллектив предлагает измерять максимальную и минимальную, среднюю величины давления языка на окружающие ткани полости рта [6]. Значения могут быть использованы для дальнейшей верификации возможных патологических состояний ребёнка, преимущественно неврологического характера, что позволит своевременно начать лечение, предотвращая развитие патологического процесса и осложнений. Предполагается, что на основе полученных значений возможно выявить скрытые зависимости, выявление которых принесёт свой вклад в дальнейшую врачебную тактику.

**Благодарность.**

***Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-15-20069, https://rscf.ru/project/22-15-20069/***

**Литература.**

1. Новорожденный ребенок. Основы оценки состояния здоровья и рекомендации по профилактике и коррекции его нарушений: руководство для врачей / Под ред. Н. Л. Черной, В. В. Шилкина. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2009. – 352 с.
2. Ультразвуковая диагностика в неонатологии / Под ред. И. В. Дворяковского, Г. В. Яцык. – Москва: Издательский дом «Атмосфера», 2009. – 168 с.
3. Волоконно-оптический датчик давления языка новорожденного / Т. И. Мурашкина, Е. А. Бадеева, А. С. Несяев [и др.] // Научные исследования: итоги и перспективы.

– 2023. – Т. 4, № 4. – С. 46-50. – DOI 10.21822/2713-220X-2023-4-3-46-50. – EDN LWEBMU.
4. Кривошея новорождённых как фактор асимметрии лицевого черепа: этиология, клиника, лечение, прогноз / Е.Ю. Плотникова, Т.И. Мурашкина, Е.А. Бадеева [и др.] // Актуальная биотехнология. – 2022. – № 1. – С. 286-290. – EDN AXHYNW.
5. Волоконно-оптический сканер для определения морфометрических параметров нёба пациента / Т. И. Мурашкина, Е.А. Бадеева, Т.В. Истомина [и др.] // Медицинская техника. – 2023. – № 1(337). – С. 15-18. – EDN ANHSNC.
6. Патент № 2741274 C1 Российская Федерация, МПК G01L 13/00, A61C 19/04. Волоконно-оптический датчик силы мышц языка – давления языка на небо и способ его сборки: № 2020111257: заявл. 19.11.2019: опубл. 22.01.2021 / Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Ю.А. Васильев [и др.]. – EDN YORYZY.

**Сведения об авторах**

***Плотникова Екатерина Юрьевна***
*врач-неонатолог первой квалификационной категории, (соискатель) Кубанский государственный медицинский университет Краснодар, Россия*
*Эл. почта: **cat.roll@yandex.ru***

***Волобуев Владимир Викторович***
*к.м.н., доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии*
*Кубанский государственный медицинский университет Краснодар, Россия*
*Эл. почта: **vladimir.volobueff@yandex.ru***

***Мурашкина Татьяна Ивановна***
*д.т.н., профессор, профессор кафедры «Приборостроение»*
*Пензенский государственный университет Пенза, Россия*
*Эл. почта: timurashkina@mail.ru*

***Бадеева Елена Александровна***
*д.т.н., доцент, профессор кафедры «Радиотехника и радиоэлектронные системы»*
*Пензенский государственный университет Пенза, Россия*
*Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru*

***Куликова Ирина Александровна***
*студентка лечебного факультета*
*Кубанский государственный медицинский университет*
*Краснодар, Россия*
*Эл. почта: dockulikowa@yandex.ru*

***Васильев Юрий Анатольевич***
*ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины*
*Кубанский государственный медицинский университет Краснодар, Россия*
*Эл. почта: yurii-59@mail.ru*

**Information about author**

***Plotnikova Ekaterina Yurievna***
*Neonatologist of the first qualification category, (applicant)*
*Kuban State Medical University Krasnodar, Russia*
*E-mail: cat.roll@yandex.ru*

***Volobuev Vladimir Viktorovich***
*PhD, Associate Professor of the Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Maxillofacial Surgery*
*Kuban State Medical University Krasnodar, Russia*
*E-mail: vladimir.volobueff@yandex.ru*

***Murashkina Tatiana Ivanovna***
*Doctor of Technical Sciences, Professor, Professor of the Department of "Instrument Engineering"*
*Penza State University*
*Penza, Russia*
*E-mail: timurashkina@mail.ru*

***Badeeva Elena Aleksandrovna***
*Doctor of Technical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Radio Engineering and Radio Electronic Systems*
*Penza State University*
*Penza, Russia*
*E-mail: badeeva_elena@mail.ru*

***Kulikova Irina Aleksandrovna***
*student of the Faculty of Medicine Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: dockulikowa@yandex.ru*

***Vasiliev Yuri Anatolyevich***
*Assistant of the Department of Public Health, Healthcare and History of Medicine*
*Kuban State Medical University Krasnodar, Russia*
*E-mail: yurii-59@mail.ru*

УДК 53.043+617-089
ГРНТИ 59.14
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.143-149

**Д.Г. Тагабилев, И.А. Винокуров,**
**В.С. Бессмертная,**
**И.Г. Квирикашвили, А.А. Калайджан,**
**Д.А. Моисеев**
ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»
**А.К. Дмитриев, А.Н. Коновалов, В.А. Ульянов**
НИЦ «Курчатовский институт»

# ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАЗЕРОИНДУЦИРОВАННОЙ ДЕСТРУКЦИИ БИОМОДЕЛИ НА ОСНОВЕ ТКАНИ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ *in vitro*

*Показано, что в зависимости от режимов теплового воздействия лазерного излучения в объеме печени свиньи in vitro наблюдаются три вида деструкции ткани, отличающиеся происходящими процессами вблизи торца волокна: коагуляция, карбонизация, образование внутренней полости. Проведены сравнительные УЗИ, макро- и микроскопические исследования лазероиндуцированной деструкции ткани печени. Выявлена и описана зона термического дефекта ткани в области торца волокна.*

***Ключевые слова:*** *лазер, тепловое воздействие, оптическое волокно, деструкция, печень свиньи, гистология, УЗИ.*

**D.G. Tagabilev, I.A. Vinokurov, V.S. Bessmertnaya,**
**I.G. Kvirikashvili, A.A. Kalaydjan, D.A. Moiseev**
FSBSI «Petrovsky NRCS»
**A.K. Dmitriev, A.N. Konovalov, V.A. Ulyanov**
NRC “Kurchatov Institute”

# STUDY OF LASER-INDUCED DESTRUCTION OF BIOMODELS BASED ON PIG LIVER TISSUE *in vitro*

*It has been shown that, depending on the modes of thermal exposure to laser radiation, three types of tissue destruction are observed in the pig liver volume in vitro. They differ in the processes occurring near the fiber end: coagulation, carbonization, formation of an internal cavity. Comparative ultrasound, macro- and microscopic studies of laser-induced destruction of liver tissue were carried out. A zone of thermal tissue defect in the area of the fiber end has been identified and described.*

***Key words:*** *laser, thermal effect, optical fiber, destruction, pig liver, histology, ultrasound*

## Введение

Лазерная локальная гипертермия давно и активно используется в противоопухолевой терапии [1,2]. Традиционное применение этого метода основано на том, что селективное повреждение и гибель опухолевых клеток наблюдается в диапазоне умеренных температур 40—45°С. Согласно современной точке зрения, традиционная гипертермия в первую очередь рассматривается как универсальный и наиболее эффективный модификатор радио- или химиотерапии, способный повысить их эффективность в 1,5—2,5 раза; и только в случае невозможности применения таких классических методов традиционная гипертермия рассматривается как монотерапия [3]. При этом в самостоятельном виде она оказывает существенное противоопухолевое действие только в 12—13% случаев [4, 5].

Более эффективным является подход, основанный на нагреве объема опухоли до цитотоксических температур 50-54°С [6] или (что более эффективно) - до температуры коагуляции ткани, составляющей для мягких водосодержащих тканей 60 - 70°С. При температурах ≥ 60-70°С происходит денатурация как основных структурных белков ткани в результате необратимого нарушения пространственной структуры их молекул, так и клеточных компонентов, что приводит к быстрой гибели опухолевых клеток в течение короткого времени [7]. Для обеспечения эффективности такой процедуры необходимо создать вокруг опухоли 3D-температурную область с границей между опухолевой и

здоровой тканями ≥60°С. Применение лазерного излучения и его локальная доставка к опухоли, находящейся в объеме пораженного органа, с помощью оптических волокон дает возможности достаточно просто реализовать этот способ проведения хирургического вмешательства.

Такой подход перспективен для лечения локализованных в объеме ткани узловых злокачественных новообразований и метастатических очагов в печени человека на ранних стадиях заболевания. Узловые формы составляют до 85% всех форм образований печени [2]. В частности, к таким формам образований печени относятся гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) и метастатическая аденокарцинома печени. Эти образования могут представлять собой сферические или эллипсовидные новообразования размером до 2-3 см в диаметре (и менее при диагностике на ранних стадиях заболевания), а также произвольной формы (что чаще наблюдается у ГЦК). В настоящее время методы лазероиндуцированной тепловой коагуляции опухолевой ткани (лазероиндуцированной термотерапии – ЛИТТ) активно развиваются за рубежом применительно к задаче лечения ГЦК [8-10]. В большинстве процедур ЛИТТ применяются Nd:YAG лазеры (1,06 мкм) или полупроводниковые диодные лазеры (λ = 800–980 нм). Для доставки излучения к опухоли используются оптические волокна с диаметром сердечника 300-600 мкм.

В данной работе представлено исследование теплового воздействия лазерного излучения с длиной волны 0,98 мкм в биомоделях на основе ткани печени *in vitro* с использованием оптических волокон с плоским торцом.

**Методы и материалы**

В качестве источника лазерного излучения использовался полупроводниковый лазер мощностью до 10 Вт с длиной волны 0,98 мкм. Применение лазера с данной длиной волны обусловлено объемным характером поглощения энергии излучения при его воздействии на мягкие водосодержащие биоткани. Для доставки излучения к биомодели использовалось оптическое волокно с диаметром сердечника 600 мкм и плоским торцом на дистальном конце.

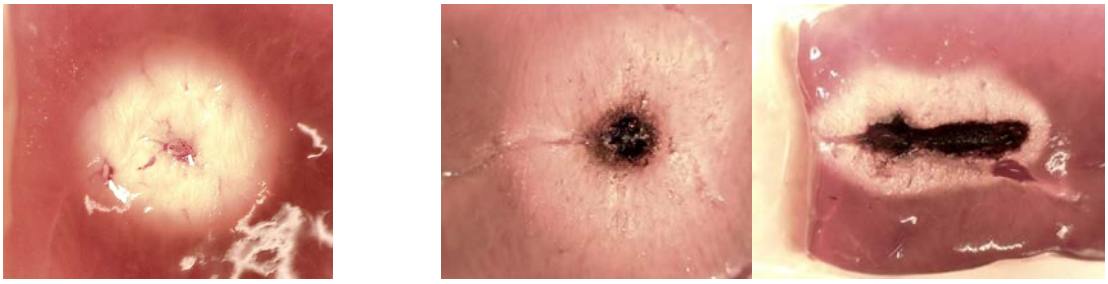
Мощность излучения, подводимая к биомодели, измерялась с помощью измерителя мощности FieldMaster (Coherent). В качестве биомоделей использовались образцы ткани печени свиньи *in vitro.* Оптическое волокно вводилось в объем образца на расстояние 2,5-3 см. Размеры коагулируемого объема (коагулята) определялись по изменению цвета ткани печени и на основании результатов гистологических исследований. Изменение цвета печени при тепловом воздействии лазерного излучения является результатом коагуляции белков ткани и происходит в результате их нагрева до температуры 65-70°С [11].

При гистологическом исследовании для оценки объёма повреждения гепатоцитов, других клеточных структур и некроза ткани материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Тканевые образцы подвергали проводке в аппарате для гистологической обработки тканей Орион Медик Агот-1 по программе, которая включала: 10% формалин – 3 раза по 1 часу, этанол 96% - 3 раза по 50 минут, ксилол – 3 раза по 1 часу, парафин – 1 раз в течение часа, 2 раза в течение 1,5 часов. Заливка в парафиновые блоки проводилась на заливочном центре DiaPath Canova. Срезы толщиной 3 мкм готовили на роторном микротоме Leica RM2245 и окрашивали гематоксилином и эозином в автомате окрашивания Leica Autostainer XL (ST5010). Исследование гистологических препаратов проводилось в световом микроскопе при увеличениях от х40 до х400.

Ход процесса деструкции ткани непосредственно во время воздействия лазерного излучения проводился с помощью ультразвуковой диагностики. Использовался аппарат SAMSUNG RS80A – RUS, с использованием линейного датчика L3-12A (3,0-12,0 МГц) в следующих режимах: В-режим (настройка - «Поверхностный»); режим энергетического доплера (ЭДК) - в диапазоне скоростей 3,5/-3,5 см/сек. Ход исследования зафиксирован при помощи карты видеозахвата HDMI.

**Результаты и обсуждение**

Как показали эксперименты, в зависимости от мощности излучения и времени облучения процесс лазерного воздействия на ткань может перейти из стадии ее нагрева до температуры коагуляции в стадию обугливания и последующего горения, сопровождающиеся интенсивной карбонизацией ткани. При умеренных скоростях нагрева в области торца волокна формируется зона коагуляции сферической формы с центром в области торца волокна (рис. 1, a). Высокие значения мощности излучения даже при малых временах воздействия приводят к интенсивному испарению и сгоранию ткани печени, сопровождающиеся формированием полости внутри объема образца с обугленными (карбонизированными) краями и зоной коагуляции (рис. 1, c). При этом в процессе нагрева имеет место вынос продуктов лазерного испарения ткани через место ввода волокна в образец ткани. Минимизировать процесс карбонизации в области торца волокна без образования полости в объеме ткани можно значительным уменьшением мощности излучении и увеличением времени воздействия (рис. 1, b). Визуально зоны коагуляции и карбонизации наблюдаются как «побледнение» или изменение цвета ткани по отношению к интактной и появление области черного цвета соответственно.



a) b) c)

***Рисунок 1. Зоны коагуляции и карбонизации в образцах печени свиньи in vitro после облучения на длине волны 0,98 мкм в зависимости от режимов воздействия (оптическое волокно вводилось в образец слева направо) при макроскопическом исследовании:***
***a) - P = 1,5 Вт, время воздействия 120 с.***
***b) - P = 1.3 Вт, время воздействия 10 мин.***
***c) - P = 5 Вт, время воздействия 50 с.***

Нами проведено сравнительное исследование формирования коагулята с карбонизацией ткани в области торца волокна (аналогично рис. 1, b). Для этого использовались 9 образцов ткани печени свиньи, которые подвергались воздействию лазерного излучения мощностью 1, 5, 2,0 и 2,5 Вт в течение 3 мин. На каждый режим облучения - по 3 образца ткани. При введении оптического волокна в толщу образца и на всем протяжении времени воздействия проводился контроль при помощи ультразвука, проводилась фиксация времени появления изменений (рис.2, 30 и 31-я сек) в месте воздействия и замер измененного участка на УЗИ в конце времени воздействия. По результатам УЗИ визуализировались характерные изменения в В-режиме – появление эффекта реверберации на конце оптического волокна, соответствующее газообразованию (рис. 2, 163-я сек) и обугливанию участка ткани. В режиме ЭДК – интенсивное неоднородное окрашивание ткани (рис. 2, 165-я сек), опережающее изменения в В-режиме на 0,5-0,6с. По размерам изменения ткани в В-режиме и ЭДК сопоставимы.

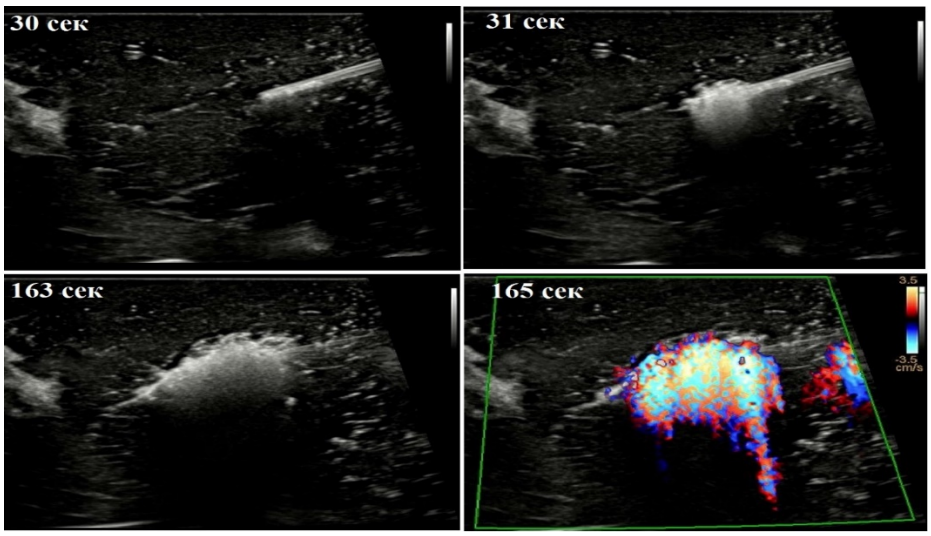



***Рис.2. Ультразвуковой контроль динамики изменений в ткани печени на конце волокна при воздействии лазерного излучения (31 и 163 сек - ультразвуковые признаки выделения газа и карбонизации вследствие деструкции ткани; 165 сек - при одновременном использовании В-режима и режима ЭДК (энергетического доплеровского картирования) наблюдается интенсивное окрашивание карбонизированной полости – за счет движения газовой компоненты).***

После лазерного воздействия на ткань печени, все образцы были подвергнуты гистологическому исследованию для оценки гистологических признаков повреждения гепатоцитов печени свиньи и замера объема этих повреждений. Полученные данные представлены в таблице №1.

***Таблица №1. Изменения в ткани печени свиньи in vitro при разной мощности лазерного излучения по данным УЗИ, макро- и микроскопического исследования (средние значения).***

| | | | |
|---|---|---|---|
| Мощность лазерного излучения, Вт | 1,5 | 2,0 | 2,5 |
| Время появления видимых изменений на УЗИ, с | 120 | 52,7 | 30 |
| Диаметр очага повреждения ткани по окончании лазерного воздействия по УЗИ, мм | 3,4 | 14 | 15 |
| Диаметр зоны карбонизации при макроскопическом исследовании, мм | 2,8 | 3 | 3,5 |
| Диаметр прилегающей коагулированной зоны при макроскопическом исследовании, мм | 6,2 | 6,8 | 9,2 |
| Диаметр зоны карбонизации (термического дефекта) при микроскопическом исследовании, мм | 1,5 | 2,5 | 2,7 |
| Диаметр зоны первичного некроза с коагуляцией ткани при микроскопическом исследовании, мм | 2,5 | 3,7 | 4,2 |

При микроскопическом исследовании в центре области воздействия (вблизи торца волокна) во всех образцах выявлена зона термического дефекта ткани. Она представляет собой полость (рис. 3, а) с неровными фестончатыми внутренними стенками, на некоторых участках которых изнутри включения темно-коричневого цвета. Начиная непосредственно от границ полости и на расстоянии от 1 до 1,5 мм по кругу клетки печени были без четких границ, межклеточные пространства практически полностью отсутствовали, ядра не определялись, зона цитоплазмы имела выраженную эозинофильную окраску (рис.3 б). Подобные изменения характерны для зоны первичного некроза ткани с коагуляцией.

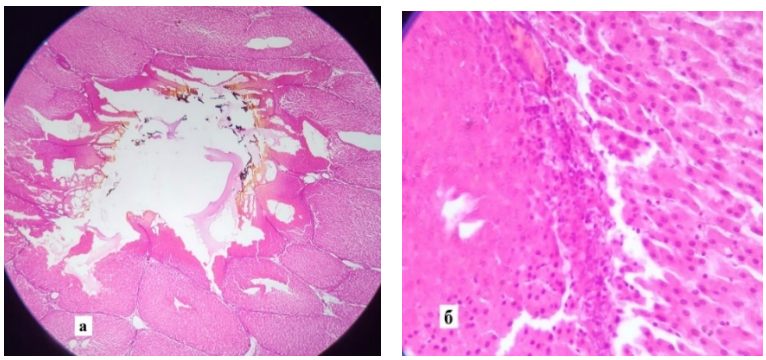



***Рисунок 3. Микроскопическая картина изменений в области воздействия лазером на ткани печени свиньи in vitro.***
***а) В центре зона термического дефекта в виде полости с неровными краями, увеличение х40.***
***б) В левой части фото - зона первичного некроза ткани с коагуляцией, увеличение х400.***

Исходя из вышеописанного, достоверно можно судить о полной гибели ткани печени в зоне термического дефекта и о безвозвратном повреждении (коагуляции) в прилежащей зоне с безъядерными гепатоцитами. Как следует из таблицы №1, разница измерений зоны коагуляции вокруг полости карбонизации, выполненных на УЗИ, при макроскопическом исследовании и при микроскопическом исследовании довольно значительна. Это может свидетельствовать о том, что в некотором отдалении от торца волокна имеется еще одна зона, где визуальная картина изменений в клетках не столь ярко выражена, поскольку нами, при рутинном гистологическом исследовании была замечена лишь некоторая бледность окрашивания цитоплазмы клеток эозином. Ядра и границы клеток имели обычный вид, а граница этой зоны представлялась нечеткой. В связи с вышеизложенным, необходимо отметить, что при рутинном гистологическом исследовании некоторые, критичные для жизнедеятельности изменения клеток достоверно визуализировать и доказать невозможно, поэтому необходимо продолжить изучение с использованием дополнительных методик.

**Выводы**

Исследованы особенности теплового воздействия лазерного излучения с длиной волны 0, 98 мкм для формирования коагулируемых объемов в биомоделях на основе печени свиньи in vitro с использованием оптических волокон с плоским торцом. Проведены сравнительные УЗИ, макро- и микроскопические исследования лазероиндуцированной деструкции ткани печени.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В.Петровского» и НИЦ «Курчатовский институт».

**Заключение**

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

Показано, что в зависимости от режимов теплового воздействия лазерного излучения в объеме печени могут быть сформированы 3 типа областей деструкции ткани: коагуляции без карбонизации ткани, с карбонизацией ткани в области волокна и с образованием макроскопической полости в объеме ткани.

При гистологическом исследовании во всех образцах выявлена и описана зона термического дефекта ткани в центре области воздействия (вблизи торца волокна) и прилежащая к ней зона первичного некроза и коагуляции с необратимым повреждением ткани.

УЗИ позволяет визуализировать процесс карбонизации ткани. Корреляция между размером очага повреждения ткани по УЗИ и зоны карбонизации ткани по результатам макро- и микроскопических исследований нами не выявлена.

**Литература.**


1. A.C. Steger, W. R. Lees, K. Walmsley, and S. G. Bown. Interstitial laser hyperthermia: a new approach to local destruction of tumours. BMJ, 1989, 299 (6695), p. 362–365.
2. В.И. Чиссов. Онкология. Национальное руководство. М., Геотар-Медиа, 544 с., (2017).
3. С.З.Фрадкин. Современное состояние гипертермической онкологии и тенденции ее развития. Медицинские новости, 2004, № 3, с. 3—8.
4. Van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? Annals of Oncology.- 2002.— V.13.— P.1173—1184.
5. Мардынский Ю.С., Курпешев О.К., Ткачев С.И. Гипертермия как универсальный радиосенсибилизатор. V Российская онкологическая конференция.— М., 2001 //http: //www.rosoncoweb.ru. /library /5th-conf /47.htme.
6. Ahmed M, Brace CL, Lee FT, Jr., Goldberg SN. Principles of and advances in percutaneous ablation. Radiology, 2011, 258(2), p. 351- 369.
7. C. M. Pacella, L. Breschi, D. Bottacci, L. Masotti. Physical Principles of Laser Ablation. In book: Image-guided Laser Ablation, 2020, Springer Link, p. 7–18.
8. Л.И.Москвичева, Д.В.Сидоров, М.В.Ложкин, Л.О.Петров, М.В.Забелин. Современные методы абляции злокачественных новообразований печени. Исследования и практика в медицине, 2018, т .5, №4, с. 58-71.
9. Costanzo Di GG, Francica G,Pacella CM. Laser ablation for small hepatocellular carcinoma: State of the art and Future perspectives. World J Hepatol, 2014,6(10):704-715
10. Yan-rong ZHANG, Ling-yun FANG, Cheng YU et al. Laser-induced Interstitial Thermotherapy via a Single-needle Delivery System: Optimal Conditions of Ablation, Pathological and Ultrasonic Changes. J. Huazhong Univ Sci Technol [MedSci], 2015, 35(4), p. 579-584.
11. G. Muller, K.Dorschel, and H. Kar. Biophysics of photoablation process. Lasers in Medical Sciences,1991, 6, 241-254.



**Сведения об авторах**

***Дмитрий Геннатулович Тагабилев,***
*к.м.н., главный врач НКЦ №3*
*ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: dimatagabilev@list.ru*
***Иван Андреевич Винокуров,***
*д.м.н., г.н.с. НКЦ №3*
*ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: docvin.med@gmail.com*
***Виктория Сергеевна Бессмертная,***
*к.м.н., заведующий патологоанатомическим отделением НКЦ №3*
*ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: v.s.bessmertnaya@mail.ru*
***Ия Глебовна Квирикашвили,***
*врач патологоанатом НКЦ №3*
*ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: iya691@gmail.com*
***Акоп Андроникович Калайджан,***
*врач ультразвуковой диагностики*
*НКЦ №3 ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: Kalaydzhan.akop@mail.ru*

**Information about author**

***Dmitry Gennatulovich Tagabilev,***
*candidate of medical sciences, chief physician of SCC №3 FSBSI «Petrovsky NRCS»*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: dimatagabilev@list.ru*
***Ivan Andreevich Vinokurov,***
*doctor of medical sciences, chief researcher, SCC №3 FSBSI «Petrovsky NRCS»*
*Moscow, Russian Federation*
*Эл. почта: docvin.med@gmail.com*
***Victoriya Sergeevna Bessmertnaya,***
*candidate of medical sciences, head of pathology department, SCC №3 FSBSI «Petrovsky NRCS»*
*Moscow, Russian Federation*
***E-mail: v.s.bessmertnaya@mail.ru***

***Iya Glebovna Kvirikashvili,***
*pathologist, SCC №3 FSBSI «Petrovsky NRCS»*
*Moscow, Russian Federation*
***E-mail: iya691@gmail.com***

***Akop Andronikovich Kalaydjan,***
*ultrasound doctor, SCC №3 FSBSI «Petrovsky NRCS»*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: Kalaydzhan.akop@mail.ru*

***Моисеев Дмитрий Александрович***
*заведующий отделением лучевой диагностики НКЦ №3 ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» Москва, Россия*
*Эл. почта: dimois2005@mail.ru*
***Александр Константинович Дмитриев,***
*н.с.*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: dmitriev_a62@mail.ru*
***Алексей Николаевич Коновалов,***
*к.ф.м.н., с.н.с.*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: alex_konov@mail.ru*
***Валерий Андреевич Ульянов,***
*к.т.н., в.н.с.*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: vaul595@mail.ru*

***Dmitry Alexandrovich Moiseev***
*head of department of radiation diagnostics, SCC №3 FSBSI «Petrovsky NRCS»*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: dimois2005@mail.ru*
***Alexander Konstantinovich Dmitriev,***
*researcher, NRC "Kurchatov Institute",*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: dmitriev_a62@mail.ru*

***Aleksey Nikolaevich Konovalov,***
*PhD, senior researcher, NRC "Kurchatov Institute"*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: alex_konov@mail.ru*
***Valery Andreevich Ulyanov,***
*PhD, leading researcher, NRC "Kurchatov Institute"*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: vaul595@mail.ru*

УДК 53.07+617-089
ГРНТИ 59.14
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.149-154

**А.К. Дмитриев, А.Н. Коновалов, В.Н. Кортунов, В.А. Ульянов**
НИЦ «Курчатовский институт»

## ОСОБЕННОСТИ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО ЛАЗЕРНОГО ИСПАРЕНИЯ БИОТКАНЕЙ

*Исследовано автоматизированное лазерного испарение поверхности биомоделей на основе агара. Показано, что в зависимости от степени перекрытия штриховых линий выпаренная область поверхности может иметь как пилообразный, так и гладкий вид. Оптимальное расстояние между штриховыми линиями позволяет получить ровную поверхность после сканирования. Исследовано лазерное сканирование двухслойной биомодели с различным содержанием агара в каждом слое с одновременным детектированием автодинного сигнала. Такая диагностика позволяет осуществлять контроль полного выпаривания каждого слоя.*

***Ключевые слова**: роботизированная хирургия, $CO_2$ лазер, двухкоординатный сканер, биомодель, агар, диагностика послойного испарения.*

**A.K. Dmitriev, A.N. Konovalov, V.N. Kortunov, V.A. Ulyanov**
NRC "Kurchatov Institute"

## PECULIARITIES OF BIOTISSUE EVAPORATION BY LASER SCANNING METHOD

*The peculiarities of automated laser evaporation of the surface of agar-based biomodels were studied. It is shown that, depending on the degree of overlap of the dashed lines, the evaporated surface area can have either a sawtooth or a smooth appearance. The optimal distance between the dashed lines allows you to get a flat surface after scanning. Laser scanning of a two-layer biomodel with different agar content in each layer with simultaneous detection of an autodyne signal was studied. It is shown that such diagnostics makes it possible to control the complete evaporation of each layer.*

***Keywords:** robot-assist surgery, $CO_2$ laser, two-dimensional scanner, biomodel, agar, layer-by-layer diagnostics.*

**Введение**

Применение автоматизированных и роботизированных систем для проведения прецизионных малотравматичных и органосохранных операций является востребованным направлением в современной медицине [1,2]. Такой подход снижает риски человеческого фактора, дает возможность быстрой послеоперационной реабилитации пациентов и основан на объективном контроле за процессом хирургического вмешательства в реальном времени. Лазерное излучение как один из инструментов хирургических манипуляций привлекает возможностями минимальной инвазивности и травматизации здоровых тканей, высокой точностью и скоростью удаления патологической ткани. Эти достоинства лазерного излучения наиболее полно проявляются при его использовании в составе автоматизированных и роботизированных хирургических систем.

Одним из направлений автоматизации хирургических вмешательств является применение сканирующих систем в составе лазерных установок [3,4]. Наиболее распространенным является применение установок на основе $CO_2$ - и Er:YAG лазеров для лазерной шлифовки, удаления поражений кожи и слизистых оболочек. Это считается золотым стандартом в дерматологической хирургии [5]. Лазерные установки со сканирующими системами получают распространение для малотравматичного выпаривания поверхностных новообразований различного типа и прецизионного рассечения тканей. Они позволяют в автоматизированном режиме задавать форму, область испаряемой ткани и пошаговую глубину испарения.

Перспективным инструментом для прецизионных операций является установка на основе $CO_2$ лазера и двухкоординатного гальвано-сканатора, включающая диагностику процесса испарения биоткани в режиме реального времени [6]. В основе диагностики лежит автодинный эффект – модуляция выходной мощности излучения (автодинный сигнал) в результате попадания обратно рассеянного из зоны испарения биоткани излучения в резонатор лазера [7]. Такая установка позволяет осуществлять послойное автоматизированное лазерное удаление патологических тканей.

**Цель работы**

Целью работы является исследование особенностей формирования поверхности биомоделей на основе агара в процессе двухкоординатного сканирования излучением $CO_2$ лазера и диагностика испарения двухслойных биомоделей.

**Методы и материалы**

Для автоматизированного поверхностного испарения биомоделей использовалась установка, состоящая из лазерного блока, шарнирно-зеркального манипулятора и состыкованного с ним 2-х координатного гальвано-сканатора JS1105 Galvo Scanner (Sino-Galvo Technology Co., Китай) (рис.1). Установка создана на основе одномодового $CO_2$ лазера C-20A (Coherent, США) мощностью до 15 Вт с высокочастотной (ВЧ) накачкой активной среды и позволяет производить прецизионное испарение/рассечение биотканей с одновременной регистрацией автодинного сигнала [6]. В процессе двухкординатного сканирования обратно рассеянное из зоны лазерного испарения излучение попадает на зеркала 2-х координатного сканатора, затем через систему зеркал шарнирно-зеркального манипулятора направляется в резонатор $CO_2$ лазера и инициирует модуляцию выходной мощности излучения на доплеровской частоте. Сигнал от фотоприемника через плату АЦП подается на компьютер, который

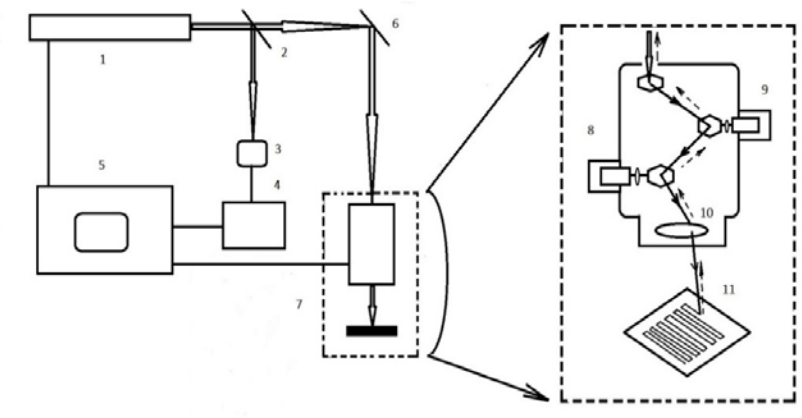



***Рис.1. Схема двухкоординатного сканирования и автодинного детектирования обратно рассеянного излучения. 1 – $CO_2$ лазер, 2- светоделительная пластина, 3- HgCdTe фотоприемник, 4- АЦП, 5- ноутбук, 6- поворотное зеркало, 7- гальвано-сканатор,8- сканатор по оси X, 9- сканатор по оси Y, 10- фокусирующая линза, 11- биомодель.***

осуществляет обработку и выделение информационной составляющей автодинного сигнала и управление работой сканатора.

Блок управления сканатором и специально разработанная программа позволяли задавать любые формы областей выпаривания в пределах 20х20 мм2, скорость перемещения лазерного пучка в пределах 1мм/с – 50 мм/с. Область сканирования поверхности представляет собой совокупность параллельных линий (далее-штриховые линии). Ширина этих линий соответствует диаметру фокального пятна. Изменением расстояния между штриховыми линиями обеспечивалась необходимая плотность лазерной штриховки – от совокупности отдельных резов до испарения заданного участка поверхности размером 8.5 мм х11.6 мм. Использовалась линза с фокусным расстоянием 50 мм. Излучение фокусировалось на поверхность биомодели. Размер фокального пятна составлял 175 мкм по уровню 86 %. В экспериментах изменялись режимы лазерного воздействия и сканирования: мощность лазерного излучения (2-5 Вт), скорость перемещения лазерного пучка (от 2 мм/с до 20 мм/с), плотность заполнения штриховкой испаряемого участка поверхности биоткани. Расстояние между штриховыми линиями варьировалась от 75 до 400 мкм. Обработка автодиного сигнала в процессе лазерного сканирования проводилась с использованием специального алгоритма выделения информационной компоненты доплеровского сигнала. В качестве информационного параметра автодинного сигнала использовалась мощность сигнала Ps в выбранном диапазоне частот.

В качестве биомоделей использовались образцы на основе агара Difco с массовой долей агара 2%, 5% и 15%. Такие образцы моделировали мягкие ткани с высоким содержанием воды. Поперечные срезы биомоделей изучались под микроскопом.

**Полученные результаты**

Глубина испарения и характер формирующейся поверхности биомодели в процессе выпаривания зависят от скорости сканирования, мощности лазерного излучения и плотности заполнения испаряемого участка штриховыми линиями. На рис. 2, а представлены поперечные срезы образцов 5% агара, полученные при одном проходе сканирования, постоянных мощности и скорости сканирования с различной плотностью штриховки. При низкой плотности заполнения сканируемого участка поверхность агара приобретает пилообразный вид. При высокой плотности заполнения, когда расстояние между штриховыми линиями равно или меньше ширины выпаренного канала, поверхность испаренной области образца более гладкая и равномерная. Для данной биомодели оптимальное расстояние между штриховыми линиями для получения ровной поверхности после сканирования равно 175 мкм и менее. Похожий результат достигается и при уменьшении скорости сканирования при фиксированном расстоянии между штриховыми линиями (рис. 2, б). Это связано с тем, что при меньшей скорости сканирования увеличивается ширина

выпаренного канала из-за того, что тепловой фронт успевает распространиться на большее расстояние при смещении лазерного пучка. В связи с этим при меньших скоростях сканирования и оптимальном заполнении сканируемого участка в этих биомоделях поверхность выпаренной области более ровная.

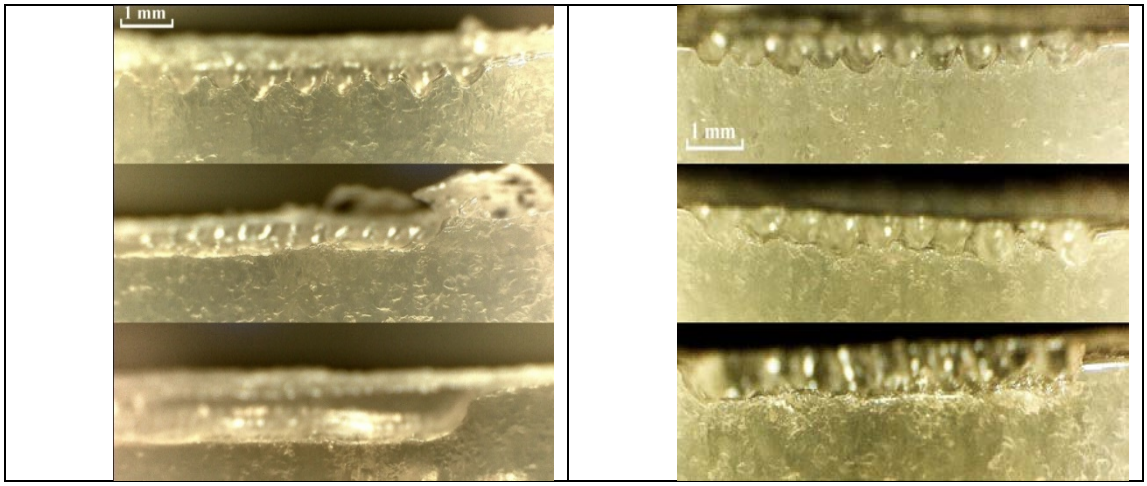



***Рис. 2. Поперечный срез испаренной зоны в образцах агара при различных режимах однопроходного сканирования.***
***a) 5% агар, P = 4 Вт, v = 18 мм/сек, расстояние между штриховыми линиями (сверху вниз): 400, 325 и 175 мкм);***
***b) 15% агар, P = 4 Вт, расстояние между штриховыми линиями 400 мкм, скорость сканирования (сверху вниз): 12,5; 9 и 4,5 мм/с.***

На рис. 3 представлена экспериментальная зависимость глубины выпаривания образцов из агара с разной массовой долей от скорости сканирования за один проход лазерного луча. Глубина выпаривания материала биомодели практически не зависит от содержания воды в образцах. Это обусловлено тем, что определяющим фактором является поглощение вдой излучения с длиной волны 10, 6 мкм. Как следует из рисунка, в зависимости от скорости сканирования глубина съема материала может варьироваться от нескольких мм до 100 мкм за один проход.

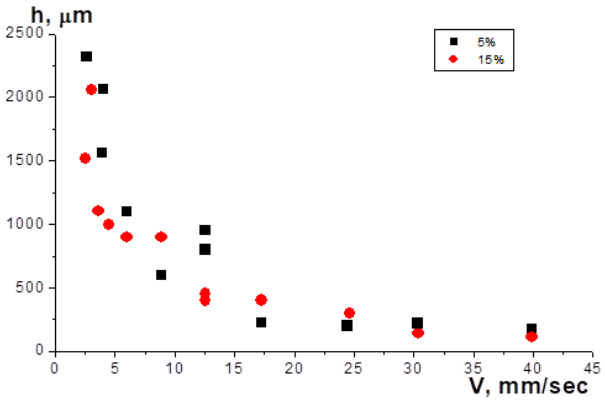



***Рис.3. Зависимость глубины выпаривания образцов из агара от скорости сканирования. Мощность излучения на выходе сканатора 3,8 Вт.***

На рис. 4 показано изменение уровня мощности автодинного сигнала при последовательном лазерном сканировании двухслойной модели с различным содержанием агара в слоях. Мощность излучения 5 Вт, скорость сканирования 20 мм/с. Первый и второй проход (черная и красная линия соответственно) осуществлен в тонком верхнем 2%

слое агара, третий и шестой (зеленая и синяя линии) проход – в нижнем 5% слое. Видно, что при переходе от слоя с 2% содержанием агара к более плотному 5% слою происходит заметное возрастание мощности автодинного сигнала. Периодический характер изменения мощности автодинного сигнала при третьем проходе связан с неравномерностью толщины верхнего 2% слоя на границах участка сканирования – излучение «захватывает» слой с 5% содержанием агара.

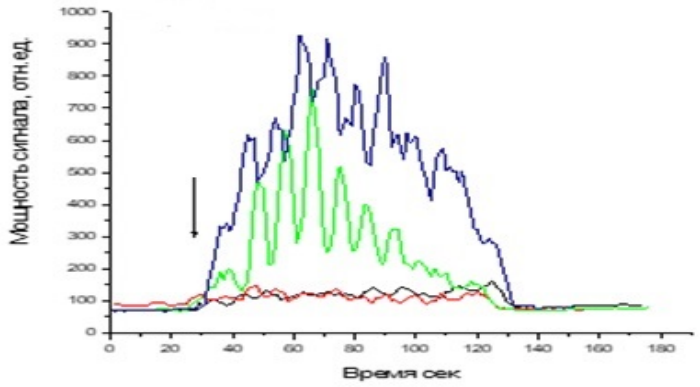



***Рис.4. Динамика мощности автодинного сигнала при лазерном сканировании двухслойного образца с весовым содержанием агара в верхнем слое 2% и в нижерасположенном слое 5% (пояснение в тексте). Мощность лазерного излучения – 5 Вт, скорость сканирования – 20 мм/с. Стрелкой обозначено начало лазерного сканирования.***

**Выводы**

Исследованы особенности автоматизированного лазерного испарения поверхности биомоделей на основе агара - от совокупности отдельных резов до испарения заданного участка поверхности. Показано, что при увеличении плотности лазерной штриховки (расстояние между резами менее диаметра лазерного пятна) и уменьшении скорости сканирования аблируемая поверхность биомодели приобретает более гладкий вид. При однопроходном сканировании глубина съема материала биомодели может варьироваться от нескольких мм до 100 мкм за один проход.

Проведены исследования по лазерному сканированию двухслойной биомодели с различным содержанием агара в каждом слое с одновременным детектированием автодинного сигнала. Показано, что такая диагностика автоматизированного лазерного испарения поверхности двухслойной биомодели позволяет осуществлять контроль полного выпаривания каждого слоя.

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

**Заключение**

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

Показано, что в зависимости от степени перекрытия штриховых линий выпаренная область поверхности может иметь как пилообразный, так и гладкий вид. Для данного типа биомоделей оптимальное расстояние между штриховыми линиями для получения ровной поверхности после сканирования равно диаметру лазерного пучка.

Изменяя параметры сканирования (мощность, скорость и плотность сканирования), можно контролировать глубину испаряемого участка с точностью до 100 мкм.

Исследовано лазерное сканирование двухслойной биомодели с различным содержанием агара в каждом слое с одновременным детектированием автодинного сигнала. Показано, что такая диагностика автоматизированного лазерного испарения поверхности двухслойной биомодели позволяет осуществлять контроль полного выпаривания каждого слоя.

**Литература.**


1. B.S. Peters, P.R. Armijo, C. Krause, S.A. Choudhury, D. Oleynikov. Review of emerging surgical robotic technology. Surgical Endoscopy, V. 32, Issue 4, 2018, P. 1636-1655.
2. Guillermo Maza, Arun Sharma. Past, Present, and Future of Robotic Surgery. Otolaryngologic Clinics of North America, V. 53, Issue 6, 2020, P. 935-941.
3. Roberto Colasanti, Luca Giannoni, Stefano Dallar, Valentina Liverotti, Denis Aiudi, Alessandro Di Rienzo, Francesca Rossi, Maurizio Iacoangeli. Application of a Scanner-Assisted Carbon Dioxide Laser System for Neurosurgery. World Neurosurgery, Available online 25 June 2021.
4. Andrew R. Padalhin. Lasers and Robots: Recent Developments in Transoral Laser and Transoral Robotic Surgery. Med. Laser, 2020; 9(2), p. 103-109.
5. Aslam, Arif; Alster, Tina S. Evolution of Laser Skin Resurfacing: From Scanning to Fractional Technology. Dermatologic Surgery, 2014, 40(11), p.1163-1172.
6. A.K. Dmitriev, A.N. Konovalov, V.N. Kortunov, and V.A. Ulyanov. An Apparatus Based on a CO2 -Laser with Feedback for Automated Precision Evaporation of Biological Tissues. Instruments and Experimental Techniques, 2022, v. 65, № 2, pp. 332-335.
7. Alexander K. Dmitriev, Alexey N. Konovalov, Vladimir N. Kortunov, and Valery A. Ulyanov. Possibilities for organizing feedback on the Doppler backscattering signal in surgical CO2 lasers. Journal of Laser Applications, 2020, V.32, p. 022073-1-022073-7.



**Сведения об авторах**

***Александр Константинович Дмитриев,***
*н.с.*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: dmitriev_a62@mail.ru*

***Алексей Николаевич Коновалов,***
*к.ф.м.н., с.н.с.*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: alex_konov@mail.ru*

***Владимир Николаевич Кортунов,***
*н.с*
*. НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: vncor@yandex.ru*

***Валерий Андреевич Ульянов,***
*к.т.н., в.н.с.*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: vaul595@mail.ru*

**Information about author**

***Alexander Konstantinovich Dmitriev,***
*researcher, NRC "Kurchatov Institute"Moscow,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: dmitriev_a62@mail.ru*

***Aleksey Nikolaevich Konovalov,***
*senior researcher, NRC "Kurchatov Institute"*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: alex_konov@mail.ru*

***Vladimir Nikolaevich Kortunov,***
*researcher, NRC "Kurchatov Institute"*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: vncor@yandex.ru*

***Valery Andreevich Ulyanov,***
*leading researcher NRC "Kurchatov Institute"*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: vaul595@mail.ru*

УДК 616-71/-78
ГРНТИ 59.14
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.155-164

**А.Н. Черных[1], Г.И. Кленов[1], К.С. Красильщиков[1], Д.И. Гранин[2], Ж.С. Лебедева[2], В.В. Белкин[3], С.В. Гришин[3]**
[1] НИЦ «Курчатовский институт»
[2] НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ
[3] АО «НПО «МРТЗ»»

# РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ДОЗОВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ДЛЯ ПРОЕКТА ОНКООФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ «ОКО»

*В статье представлен краткий обзор развития протонной лучевой терапии (ПЛТ) в мире и в частности специализированных установок для протонной онкоофтальмологии в России. Представлены текущие результаты работы по реализации проекта создания комплекса протонной лучевой терапии онкоофтальмологических пациентов на базе циклотрона Ц-80 НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, выполняемого в рамках Федеральной научно – технической программы, утвержденной Правительством РФ в марте 2020 года. В работе приводятся требования к характеристикам протонного пучка и особенности формирования дозовых распределений для ПЛТ пациентов с локализациями в области глаз, и текущие результаты разработки системы формирования и контроля параметров протонного пучка с данными проведения моделирования в МС TOPAS.*

***Ключевые слова:*** *протонная лучевая терапия, протонная онкоофтальмология, комплекс протонной лучевой терапии.*

УДК 616-71/-78

**A.N. Chernykh[1], G.I. Klenov[1], K.S. Krasilshchikov[1], D.I. Granin[2], Z.S. Lebedeva[2], V.V. Belkin[3], S.V. Grishin[3]**
[1] National Research Center "Kurchatov Institute"
[2] National Research Center "Kurchatov Institute" - PNPI
[3] JSC NPO MRTZ

# DEVELOPMENT OF A BEAM DELIVERY SYSTEM FOR THE PROTON RADIATION THERAPY ONCO-OPHTHALMOLOGICAL COMPLEX PROJECT «OKO»

*The article provides a brief overview of the development of proton beam therapy (PBT) in the world and, in particular, specialized facilities for proton onco-ophthalmology in Russia. The current results of the work on the implementation of the project to create a complex of proton radiation therapy for onco-ophthalmic patients based on the Ts-80 cyclotron of the National Research Center "Kurchatov Institute" - PNPI, carried out within the framework of the Federal scientific and technical program approved by the Government of the Russian Federation in March 2020, are presented. The paper presents the requirements for the characteristics of the proton beam and the features of the formation of dose distributions for PBT of patients with localizations in the eye area, and the current results of the development of a beam delivery system of the proton beam and the results of modeling in MC TOPAS.*

***Keywords****: proton beam therapy, proton onco-ophthalmology, complex of proton beam therapy.*

## Введение

Протонная лучевая терапия является эффективным методом лучевой терапии для многих типов опухолей. В гетерогенных органах пучки протонов могут обеспечить лучшую конформность дозы по сравнению с фотонами благодаря основному отличию протонного излучения, заключающемуся в том, что протоны при пролете в человеческом теле отдают большую часть своей энергии непосредственно в опухоль, а затем останавливаются. Это позволяет доставлять к опухоли более высокие дозы, уменьшая при этом повреждение окружающих здоровых тканей [1, 2]. Наиболее значимыми преимуществами протонной терапии перед стандартным фотонным и рентгеновским излучениями

являются: снижение риска повреждения здоровых тканей, меньшее количество краткосрочных и долгосрочных побочных эффектов, улучшение качества жизни и меньшая частота вторичных осложнений.

Варианты лечения опухолей глаза включают хирургическое вмешательство (локальную резекцию или энуклеацию), химиотерапию, термотерапию и лучевую терапию [3]. Протонная терапия дает преимущества при лечении меланомы глаза, поскольку она позволяет сохранить здоровые ткани.

Первый клинический центр протонной лучевой терапии на базе больницы был открыт в 1990 году в Медицинском центре Университета Лома Линда. С тех пор в мире уже работает более 105 центров ПЛТ в том числе специализированные установки для проведения протонной лучевой терапии пациента с локализациями в области глаз, и около 300 000 человек во всем мире прошли протонную терапию в центрах США, Европы и Азии [4].

В России первая установка для протонной лучевой терапии пациентов с локализациями в области глаз была построена в начале 1980-ых годов в Курчатовском комплексе теоретической и экспериментальной физики НИЦ «Курчатовский институт» (ранее НИЦ «Курчатовский институт» - ИТЭФ) и профункционировала до начала 2012 года. За это время было пролечено около 1500 онкоофтальмологических пациентов – четверть всего мирового опыта на тот момент.

На этом история отечественной ПЛТ пациентов с локализациями в области глаз прервалась т.к. из 3-х работающих центров ПЛТ в России, в 2-х из них – в МИБС в С.Петербурге на базе циклотрона Varian (активное формирование дозовых формирований с использованием гантри) и на отечественном синхротроне PROMETEUS в Обнинске (недостаточная интенсивность выводимого пучка) - ПЛТ пациентов с локализациями в области глаз проводить невозможно, а в 4-х-кабинном центре фирмы IBA в Димитровграде специализированная кабина для облучения мишеней в области глаз до сих не введена в эксплуатацию.

В то же время, очевидной альтернативы ПЛТ для данной локализации практически нет: хорошо зарекомендовавшая себя брахитерапия применяется для мишеней ограниченных размеров, использование гамма-найфов возможно, однако, при нескольких сотнях работающих установок в мире, количество пролеченных пациентов с локализациями в области глаз сравнимо с количеством этих установок, в то время, как в одной только Ницце (Франция) на протонном офтальмологическом пучке на конец 2020 года было пролечено 6 684 пациента [5].

Наиболее перспективным проектом в России для проведения протонной лучевой терапии пациентов с локализациями в области глаз является проект создания в НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ комплекса протонной лучевой терапии онкоофтальмологических пациентов на базе циклотрона Ц-80, реализуемый в рамках Федеральной научно – технической программы, утвержденной Правительством РФ в марте 2020 года [6]. Реализация комплекса протонной лучевой терапии онкоофтальмологических пациентов на базе циклотрона Ц-80 НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ и вывод его на проектный годовой поток пациентов решит проблему лечения сложных онкологических заболеваний таких, как меланома глаза, для целого региона РФ.

Комплекс протонной лучевой терапии онкоофтальмологических пациентов на базе циклотрона Ц-80 НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ представляет собой специализированный процедурный кабинет с фиксированным в пространстве направлением протонного пучка. В этой работе исследуется система формирования и контроля протонного пучка, которая позволяет формировать дозовые распределения, предназначенные для проведения протонной лучевой терапии мишеней глаза (ОФТ) и некоторой части мишеней орбиты глаза (ОРБ)

**Цель работы**

Целью работы является разработка системы формирования и контроля

протонного пучка (СФКП) для комплекса протонной онкоофтальмологии и построение 3D модели системы, учитывающей характеристики протонного пучка и особенности формирования дозовых распределений для ПЛТ пациентов с локализациями в области глаз, а также выполнение аналитического и численного моделирования СФКП в МС TOPAS.

Также целью работы является определение требований к характеристикам протонного пучка с учетом особенностей формирования дозовых распределений для ПЛТ пациентов с локализациями в области глаз.

**Материалы и методы**

**Онкоофтальмологический комплекс протонной лучевой терапии на базе циклотрона Ц-80.** Создание онкоофтальмологического комплекса на базе действующего циклотрона Ц-80, размещаемого на территории НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ («ОКО»), предназначено для обеспечения высокотехнологичными средствами лечения пациентов со сложными онкоофтальмологическими заболеваниями Северо-Западного региона России и частично из других регионов страны.

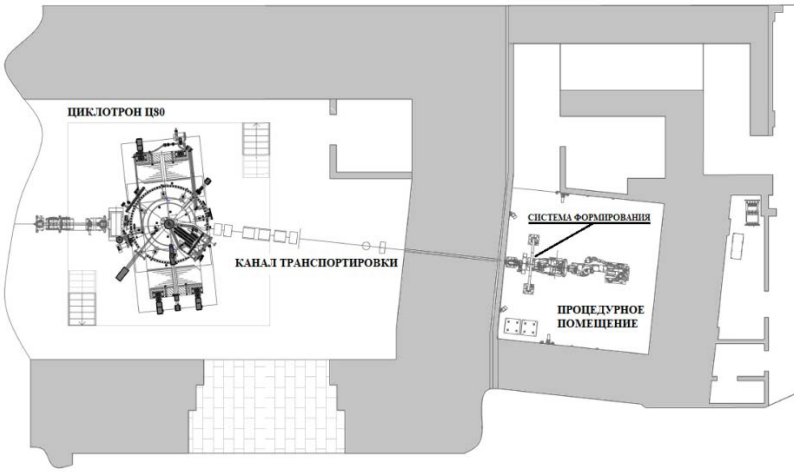



***Рис. 1. Конфигурация расположения технологического оборудования проекта «ОКО»***

Создаваемый онкоофтальмологический комплекс имеет в своем составе следующее оборудование и системы:

– кресло-позиционер с системой управления;
– устройство транспортировки терапевтического протонного пучка от ускорителя к лучевой установке (ЛУ);
– формирования дозового распределения;
– мониторинга пучка и поглощенной дозы;
– позиционирования пациента;
– программно-аппаратный комплекс (ПАК), интегрированный в автоматизированную систему управления технологическим процессом и лучевой установкой (АСУ ТП и АСУ ЛУ);

План расположения основных узлов технологического оборудования схематически представлен на рис. 1 [8, 9].

**Особенностью формирования дозовых распределений для ПЛТ пациентов с локализациями в области глаз** является то, что, несмотря на малые размеры облучаемой мишени (диаметр глазного яблока не превышает 25 мм), интенсивность используемого пучка должна быть весьма высокой:

– во-первых, в протонной онкоофтальмологии принято использовать крупное фракционирование — как правило, необходимая доза в 60 Гр подводится за 4 сеанса (вместо обычных 30-ти);

– во-вторых, желательно снижать время облучения мишени до десятков секунд из-за особенностей позиционирование мишени (добровольная фиксации взора на нужном направлении);

– в-третьих, при использовании протонов низкой энергии (порядка 70 МэВ) для формирования равномерного поперечного дозового распределения кпд использования интенсивности выводимого в процедурную кабину протонного пучка не превышает 5% для глубокозалегающих мишеней и уменьшается еще на порядок при облучении мишеней переднего отрезка глаза из-за того, что уменьшение остаточного пробега протонов осуществляется посредством торможения пучка с помощью поглотителя, который, как правило, размещается на расстоянии порядка 1 м от изоцентра установки из-за необходимости обеспечения высоких латеральных градиентов дозы. Поглотитель сильно рассеивает пучок, что приводит к дополнительной потере интенсивности.

Эти особенности необходимо учитывать при проектировании медицинских ускорителей, если на них предполагается проводить ПЛТ пациентов с локализациями в области глаз. Но для сильноточного циклотрона Ц80 эта проблема не стоит, т.к. даже без использования специальных методов формирования, призванных экономить интенсивность пучка, отбираемая у ускорителя интенсивность для облучения мишеней глаза не превышает 1 % от максимальной проектной.

Проектирование системы формирования дозовых распределений, используемых при проведении ПЛТ, основывается на общих требованиях к характеристикам формируемых дозовых распределений и к особенностям облучаемой мишени:

– пробег протонного пучка, определяется анатомическими характеристиками облучаемой мишени и потерями энергии, связанными с формированием дозового распределения. Пробег протонов с энергией Ер = 75 МэВ в воде 4.66 г/см2 [3], даже с учетом потерь на традиционное формирование для ОФТ - мишеней, избыточен, но увеличивает возможности для ОРБ - мишеней;

– равномерность поперечного дозового распределения должна оставаться в пределах от 98% до 102% значения дозы на оси;

– максимальный размер поля: диаметр до 30 мм достаточен для всех ОФТ-мишеней, что связано с размерами глазного яблока, а диаметр 50 мм достаточен для мишеней ОРБ;

– мощность дозы: определяется величиной дозы 15 Гр за сеанс и оптимизируется по времени – учитывая крайнюю подвижность облучаемой мишени и методику добровольной фиксации взора при позиционировании мишени на пучке, оптимальное время на отпуск дозы в сеансе – 15-30 сек, т.е. необходимая мощность дозы находится в интервале 0.5-1 Гр/с;

– боковая полутень представляет собой расстояние между точками дозы 80% и 20%. Обычно она должно быть не более 2 мм и, по возможности, должна быть минимизирована. Важный параметр, минимизация которого сильно зависит от размещения элементов формирования дозового поля на тракте транспортировки протонного пучка. К таким элементам относятся модификатор энергетического спектра (гребенчатый фильтр, ГФ), формирующий равномерное (+- 2.5%) глубинное дозовое распределение, соответствующее максимальному размеру облучаемой мишени вдоль направления распространения протонного пучка, и тормозитель – плоскопараллельная пластина из материала с Z близким к 1 г/см$^2$ – который останавливает протонный пучок на заданной глубине. Экспериментальные исследования в НИЦ «Курчатовский институт» - ИТЭФ показали (Рис.2), что удовлетворительное значение величины латерального градиента достигается только при достаточном удалении ГФ и тормозителя от места расположения облучаемой мишени. По общепринятой методике облучения ОФТ-мишеней расстояние от обреза коллиматора до изоцентра установки не может быть меньше 7 см. Моделирование с использованием программы Монте-Карло показало, что оптимальное расстояние от изоцентра установки, где располагается облучаемая мишень, до поверхности ближайшего

рассеивающего элемента, должно составлять не менее 91 см. На рисунке 3 показана зависимость величины латерального спада дозы (80% - 20%) от размещения сборки (гребенчатый фильтр + рассеиватель) на расстоянии 91 см от последнего коллиматора (нижняя правая кривая) и непосредственно перед этим коллиматором (три верхних кривых).

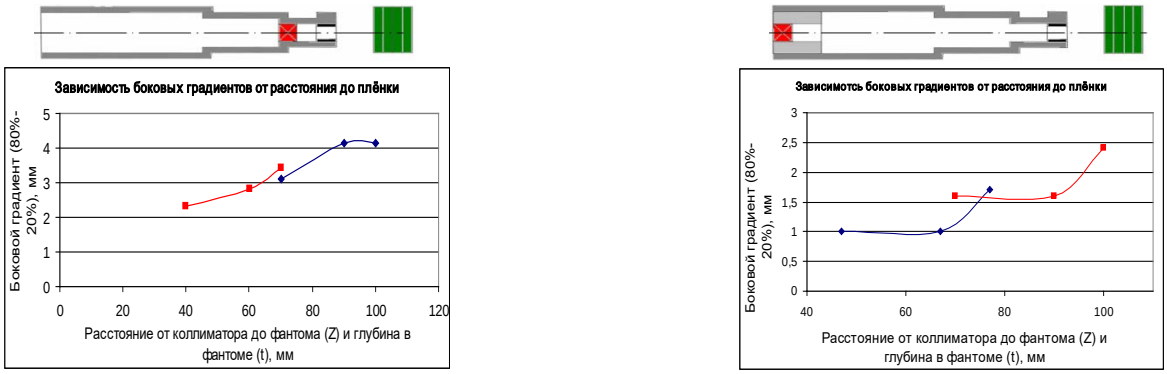



***Рис. 2 Зависимость величины спада дозы на латеральной границе мишени от места расположения элементов формирования, рассеивающих протонный пучок (ГФ и тормозителя), измеренная с использованием фотодозиметров на протонном офтальмологическом пучке в ИТЭФ***

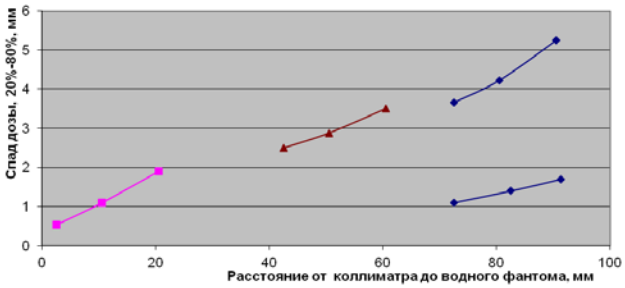



***Рис.3 Зависимость величины спада дозы на латеральной границе мишени от места расположения элементов формирования, рассеивающих протонный пучок (ГФ и тормозителя) – моделирование с помощью программы Монте-Карло IThMC.***

**Система формирования дозового распределения** для комплекса протонной лучевой терапии онкоофтальмологических пациентов на базе циклотрона Ц-80 реализовано по схеме однократного рассеивания.

Схематическое изображение основных компонентов СФКП показано на рис. 4. Пучок протонов выходит в воздух необиевое выводное окно толщиной через 25 мкм, расположенное на расстоянии около 1,9 м от изоцентра установки. По ходу распространения пучка по воздуху на СФКП располагаются следующие элементы слева направо: первая ионизационная камера, которая служит монитором профиля пучка на входе в СФКП, коллимирующее устройство, которое сопряжено с рассеивающей (материал с высоким Z и высокой плотностью) фольгой, механическое устройство быстрого прерывания подачи пучка, коллимирующее устройство, барабан со сменными модификаторами энергетического спектра протонного пучка (МЭСП), устройство регулировки глубины пробега протонного пучка, биологическая защита - плита из карбида бора, используемая для остановки нейтронов, образующихся в СФКП (в основном за счет регулировки глубины пробега протонного пучка и при рассеянии), двух ионизационных камеры, которые служат как монитором профиля пучка, так и интегральной камерой отпуска предписанной дозы и устройство «носик», представляющее собой стационарный коллиматор, в который устанавливаются съемные коллиматоры с апертурой 3 см, 5 см и набором индивидуальных диафрагм и болюсов.

В работе рассматривается компоновка СФКП со съемным коллиматором с апертурой 3 см, который определяет собой максимальный размер поля, необходимый при проведении ПЛТ пациентам с внутриглазными новообразованиями. Изоцентр установки находится в 7 см от торца съемного коллиматора по ходу распространения протонного

пучка. В состав СФКП помимо оборудования, отвечающего за формирования дозового распределения, также входит вспомогательное оборудование для реализации технологии ПЛТ ОФТ мишеней, в частности система светового позиционирования пациента, позволяющая визуализировать на поверхностных тканях тела пациента световым пучком форму поперечного дозового распределения, создаваемую посредством индивидуальной диафрагмы, а также система углового контроля положения глазного яблока позволяющая выполнять процедуру позиционирования мишени в системе координат лучевой установки в соответствии с заданным программой дозно-анатомического планирования положением глазного яблока и для контроля положения мишени в реальном времени при отпуске дозы по технологии произвольной фиксации взора пациента.

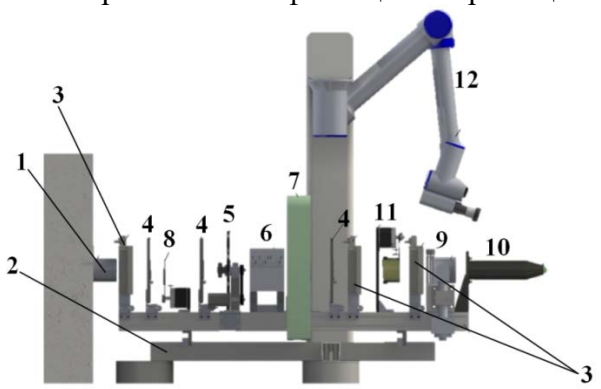



***Рис. 4. Компоновка составных частей СФКП, установленных на станине оптической скамьи***

***Таблица 1. Оборудование, установленное на станине оптической скамьи СФКП***

| Поз. | Наименование |
|---|---|
| 1 | Вакуумопровод (не входит в состав СФКП) |
| 2 | Станина оптической скамьи |
| 3 | Система мониторинга пучка и поглощенной дозы |
| 4 | Коллимирующее устройство (Коллиматор) |
| 5 | Устройство для смены модификаторов энергетического спектра протонного пучка |
| 6 | Устройство регулировки глубины пробега протонного пучка |
| 7 | Стационарная защита пациента (биозащита) |
| 8 | Шаттер №1 |
| 9 | Система светового позиционирования пациента |
| 10 | Устройство «носик» |
| 11 | Шаттер №2 |
| 12 | Система углового контроля положения глазного яблока (фиксационная точка) |

Поперечные и глубинные профили дозового распределения, полученные в изоцентре, должны соответствовать строгим клиническим требованиям: латеральный градиент, равномерность модифицированной кривой Брэгга (SOBP), оптимальная мощность дозы и боковая полутень, значения которых были приведены выше.

Все эти свойства дозового распределения определяются оптическими свойствами пучка протонов на входе в СФКП, компоновкой СФКП, геометрией рассеивателя и МЭСП.

Для расчета компоновки СФКП и геометрии МЭСП была предложена следующая модель:

– аналитический расчет технологических характеристик МЭСП (высоты и толщины единичного профиля периодической структуры МЭСП) с помощью программы NEU, Готтчелк);

– моделирование МЭСП с помощью программы МК TOPAS с использованием параметров профиля из аналитического расчета и данных о характеристиках протонного пучка и элементов системы формирования;

– корректировка с помощью программы МК TOPAS технологических характеристик МЭСП до достижения заданных характеристик глубинного дозового распределения:

- заданная длина плато модифицированной кривой Брэгга (по 97.5% изодозе);
- равномерность глубинного дозового распределения в районе плато ±2.5 %);

**Моделирование СФКП на основе математической модели, реализованной в программном продукте МК TOPAS**. Для более точной оценки параметров дозового распределения была построена 3D модель системы формирования в программном продукте МК TOPAS, который позволяет промоделировать взаимодействие протонного пучка со всеми элементами, входящими в состав УФКП и расположенными на оси распространения пучка. Геометрия размещения элементов системы формирования объемного дозового распределения показана на рис. 5.

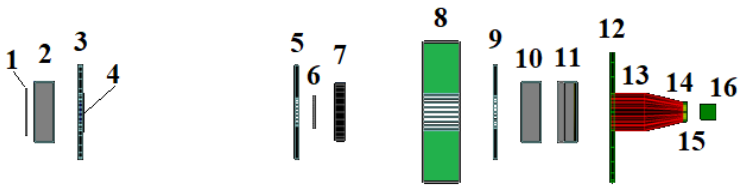



***Рис.5 Геометрия размещения элементов системы формирования объемного дозового распределения***

Исходные данные математической модели системы формирования дозового распределения, представленной на рисунке 5:

1. выходное окно: ниобий, h = 0.025 мм, Z=1900 мм;
2. рабочая область ионизационной камеры ИК1 (ИК- ионизационная камера): водоэквивалентная толщина 0.202 мм, геометрический размер 128*128*52 мм, Z=1850 мм;
3. коллиматор: сталь, h =10 мм, максимальный d=80 мм, Z=1750 мм;
4. рассеиватель: тантал, h=0.92 мм, Z=1750 мм;
5. коллиматор: сталь, h=10 мм, d=60 мм, Z=1150 мм;
6. МЭСП: фотополимерная смола, d=80 мм, Z=1100 мм;
7. тормозитель переменной толщины: $h_{max}$ = 30 мм;
8. биозащита: борированный полиэтилен, h =100 мм, максимальный d=80 мм, Z = 750 мм;
9. коллиматор: сталь, h =10 мм, d=70 мм, Z=600 мм;
10. рабочая область ИК2: водоэквивалентная толщина 0.202 мм, геометрический размер 128*128*52 мм, Z=500 см;
11. рабочая область ИК3: водоэквивалентная толщина 0.202 мм, геометрический размер 128*128*52 мм, Z=450 мм;
12. плита носика: латунь, h=10 мм, Z=275 мм;
13. труба носика: латунь, h= 93.3 мм, $D_{max}$ =80 мм, $D_{min}$=60 мм, Z=233.3 мм;
14. конус носика: латунь, h = 106.7 мм, $D_{max1}$=80 мм, $D_{min1}$=60 мм, $D_{max2}$= 40 мм, $D_{min2}$=30 мм, Z=133.3 мм;
15. чистовая диафрагма: латунь, h=10 мм, $D_{max}$=30 мм, $D_{min}$=5 мм, Z=75 мм;
16. водный фантом: вода, объем V(x,y,z)=30*30*40 мм$^3$, $Z_ц$=-20 мм,

где Z – координата положения середины элемента системы формирования на оптической скамье (Z=0 – изоцентр лучевой установки), h - толщина элемента по Z, d и D – диаметры.

Исходные данные параметров протонного пучка для математической модели системы формирования дозового распределения представлены в таблице 2.

***Таблица 2. Параметры протонного пучка на входе в СФКП***

| Наименование | Значение |
|---|---|
| начальная энергия, выводимая из ускорителя, | $E_0$=75 МэВ |
| энергетический разброс, | dE/E=0.267 % |
| пространственное распределение гауссово, со стандартными отклонениями, | $\sigma_x$ = 2.8 мм, $\sigma_y$ = 2.3 мм |
| угловое распределение импульсов гауссово, со стандартными отклонениями, | $\sigma_{\Theta x}$ = 4 мрад, $\sigma_{\Theta y}$ = 1.5 мрад |

Разработанная 3D модель компоновки СФКП (рис. 6) позволила провести детальные исследования характеристик модификаторов энергетического спектра протонного пучка и сформировать набор модификаторов энергетического спектра (МЭСП), обеспечивающий равномерное глубинное дозовое распределение с длиной плато от 5 до 35 мм с неравномерностью дозы в пределах заданного объема облучаемой мишени не выше ± 2,5 %.

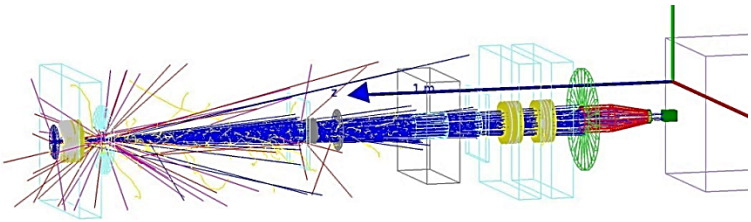


***Рис.6 Модель СФКП в программном продукте МК TOPAS. Протоны показаны синим цветом, электроны - желтым, гамма - красным, нейтроны - розовым.***

На рисунке 7 показан график глубинного дозового распределения одного из МЭСП, обеспечивающего формирование глубинного дозового распределения протонного пучка в водоэквивалентной среде с модифицированной кривой Брэгга длинной 13 мм, при остаточном пробеге 35 мм.

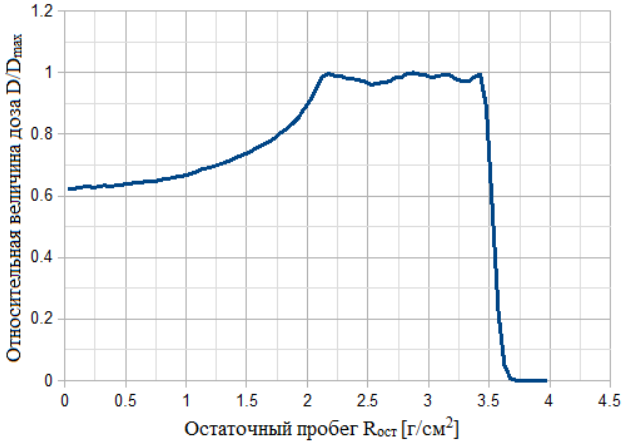



***Рис. 7 График глубинного дозового распределения***

Для исследуемого МЭСП в геометрии СФКП была установлена нулевая толщина тормозителя (поз. 7, рис.5) 0 мм и толщина рассеивателя (поз. 4, рис.5) - 0.92 мм (тантал, плотность $\rho$=16.65 г/см$^3$).

**Заключение**

В работе представлены и обсуждаются результаты, полученные при моделировании системы формирования и контроля протонного пучка, разрабатываемой в рамках реализации проекта создания комплекса протонной лучевой терапии онкоофтальмологических пациентов на базе циклотрона Ц-80 НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ.

Проведено детальное исследование характеристик СФКП, определен набор устройств для формирования модифицированного пика Брэгга (SOBP), выполнена оценка дистального и латерального спада дозы.

По результатам проведенного исследования рассчитан, спроектирован и изготовлен в сотрудничестве с АО «НПО «МРТЗ»» комплект оборудования для формирования дозовых распределений при проведении ПЛТ внутриглазных новообразований. Выполненные работы закладывают основу для дальнейшего проведения исследований с использованием уже протонного пучка в рамках пусконаладочных работ, что позволит уточнить и скорректировать геометрию отдельных элементов СФКП с целью получения клинически точных дозиметрических характеристик формируемых дозовых распределений.

***Проведенные исследования и моделирования СФКП проведены в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт», проектирование и изготовление комплекта оборудования за счет НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ.***

**Литература**

1. National Association for Proton Therapy. (2014). Retrieved August 20, 2014, from http://www.protontherapy.org/facts.htm.
2. Fowler, J. F. (2003). What can we expect from dose escalation using proton beams. Clin. Oncol., 15(1), S10–S15. DOI: 10.1053/clon.2002.0182.
3. D. J. Bell, M. W. Wilson, “Choroidal Melanoma: Natural History and Management Options”, in Cancer Control, pp. 296–303, 2004.
4. WWW.PTCOG (Particles Therapy Co-Operative Group), Online 2022.
5. J. Héraulta, A. Gérarda, A. Carnicer and etc. // Cancer/Radiothérapie Volume 26, Issue 8 November 2022, Pages 1016-1026
6. http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202003260022?index=0&rangeSize=1
7. A.N.Chernykh, V.S.Khoroshkov, G.I.Klenov and ets., / Onco-ophthalmology center based on the C-80 accelerator at the NRC "Kurchatov Institute" – PNPI // 26th Russian Particle Accelerator Conference of RuPAC-2018, pp.145-148. http://accelconf.web.cern.ch/AccelConf/rupac2018/papers/proceed.pdf/ JACoW, Proceedings
8. Ковальчук М.В., Нарайкин О.С., Сергунова К.А. и др. Распределенный центр ядерной медицины НИЦ «Курчатовский институт»: история, современное состояние и перспективы развития (научная статья), Кристаллография, 2022, №67, Том 5, С. 801 –817

**Сведения об авторах**
***Алексей Николаевич Черных***
*кандидат техн. наук, старший научный сотрудник*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 1*
*Эл. почта: Chernykh_AN@nrcki.ru*

**Information about author**
***Alexey Nikolaevich Chernykh***
*PHD, senior researcher,*
*National Research Center "Kurchatov Institute"*
*123182 Russia, Moscow, pl. Academician Kurchatov, 1*
*E-mail: Chernykh_AN@nrcki.ru*

***Геннадий Иванович Кленов***
*доктор техн. наук, зам. начальника отдела*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 1*
*Эл. почта: Klenov_GI@ nrcki.ru*
***Константин Сергеевич Красильщиков***
*лаборант исследователь*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 1*
*E-mail: kopobka.ne@gmail.com*
***Дмитрий Игоревич Гранин***
*начальник отдела*
*НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ*
*188300, Ленинградская обл., г.Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1*
*E-mail: granin_di@pnpi.nrcki.ru*
***Жанна Сергеевна Лебедева***
*медицинский физик*
*НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ*
*188300, Ленинградская обл., г.Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1*
*E-mail: zhanna-med.phys@mail.ru*
***Владислав Владимирович Белкин***
*начальник отдела*
*АО «НПО «МРТЗ»»*
*121357 Россия, Москва, ул. Верейская, д. 29*
*E-mail: vvbelkin@mail.ru*
***Сергей Викторович Гришин*** *заместитель начальника отдела*
*АО «НПО «МРТЗ»»*
*121357 Россия, Москва, ул. Верейская, д. 29*
*E-mail: grishinsv@rambler.ru*

***Gennady Ivanovich Klenov***
*Doctor of Science (Tech.), deputy head of department,*
*National Research Center "Kurchatov Institute"*
*123182 Russia, Moscow, pl. Academician Kurchatov, 1*
*E-mail: Klenov_GI@ nrcki.ru*

***Konstantin Sergeevich Krasilshchikov***
*laboratory assistant researcher*
*National Research Center "Kurchatov Institute"*
*123182 Russia, Moscow, pl. Academician Kurchatov, 1*
*E-mail: kopobka.ne@gmail.com*

***Dmitry Igorevich Granin***
*head of department*
*National Research Center "Kurchatov Institute" - PNPI*
*188300, Russia, Leningradskaya Oblast, Gatchina, 1, mkr. Orlova roshcha*
*E-mail: granin_di@pnpi.nrcki.ru*
***Zhanna Sergeevna Lebedeva***
*medical physicist*
*National Research Center "Kurchatov Institute" - PNPI*
*188300, Russia, Leningradskaya Oblast, Gatchina, 1, mkr. Orlova roshcha*
*E-mail: zhanna-med.phys@mail.ru*
***Vladislav Vladimirovich Belkin***
*head of department*
*JSC NPO MRTZ*
*121357 Russia, Moscow, st. Vereyskaya, 29*
*E-mail: vvbelkin@mail.ru*
***Sergey Viktorovich Grishin***
*deputy head of department*
*JSC NPO MRTZ*
*121357 Russia, Moscow, st. Vereyskaya, 29*
*E-mail: grishinsv@rambler.ru*

УДК 536.331 + 617.741-004.1
ГРНТИ 59.14
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.164-172

**Ю. Н. Юсеф[1], А. А. Гамидов[1],**
**Е. П. Медведева[1],**
**З. В. Сурнина[1], Е. М. Касьяненко[2], О.И. Баум[2]**
[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней им. М. М. Краснова»,
[2] НИЦ "Курчатовский институт".

## РЕЗУЛЬТАТЫ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ РОГОВИЦЫ ПОСЛЕ YAG-ЛАЗЕРНЫХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА ТКАНЯХ ПЕРЕДНЕГО СЕГМЕНТА ГЛАЗА

*Лазерная дисцизия (ЛД) вторичной катаракты (ВК) и лазерная иридэктомия (ЛИРЭ) в основе которых заложен эффект лазерной фотодеструкции тканей, может приводить к развитию осложнений, в том числе со стороны роговицы. В работе исследовалось состояния роговицы после ЛД ВК и ЛИРЭ с помощью современного метода – конфокальной микроскопии роговицы.*

***Ключевые слова:*** *Nd:YAG-лазер, капсула хрусталика, вторичная катаракта, роговица, радужка, лазерная капсулотомия, лазерная иридэктомия.*

**Yusef Yu.N.**[1], **Gamidov A.A.** [1], **Medvedeva E.P.**[1],
**Surnina Z.V.** [1], **Kasianenko E.M.** [2],**Baum O.I.** [2]
[1]Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Sciences
[2]National Research Centre "Kurchatov Institute"

## RESULTS OF CONFOCAL MICROSCOPY OF THE CORNEA AFTER YAG LASER TREATMENT ON THE TISSUE OF THE EYE ANTERIOR SEGMENT

*Laser discission (LD) of secondary cataract (SC) and laser iridotomy (LIE), which are based on the effect of laser photodestruction of tissues, are not without drawbacks associated with the risk of complications, including those of the cornea. In this study the condition of the cornea after LD of SC and LIE were researched using a modern method - corneal confocal microscopy.*
***Keywords**: Nd:YAG-laser, lens capsule, secondary cataract, cornea, iris, laser capsulotomy, laser iridectomy.*

**Введение**

Лазерная фотодеструкция (ЛФД) тканей является основой современной лазерной реконструктивной хирургии в офтальмологии [1]. Чаще всего применяется при т.н. вторичной катаракте (ВК) – послеоперационном помутнении задней капсулы хрусталика (ЗКХ). В этом случае проводят лазерную дисцизию (ЛД) ВК. Пациентам с закрытоугольной глаукомой (ЗУГ) или узким углом передней камеры глаза выполняют лазерную иридэктомию (ЛИРЭ). Несмотря на все преимущества широко используемых лазерных технологий, в основе которых заложен эффект ЛФД тканей, их применение может сопровождаться развитием лазериндуцированных осложнений [1-4], в том числе, связанных с повреждением роговицы [5, 6**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

Неправильная фокусировка лазерного излучения может приводить к повреждению роговицы в виде сетки трещин [7, 8]. В случае, если облучаемая структура находится очень близко к роговице, это может привести к повреждению ее эндотелиального слоя и вызвать дефицит эндоделиальных клеток роговицы (ЭКР) [9, 10]. Снижение популяции ЭКР приводит к дегенеративным изменениям роговицы [11]. Таким образом, при лазерных вмешательствах на структурах переднего сегмента глаза риск повреждения роговицы тем выше, чем ближе зона воздействия лазерного излучения к самой роговице. Вероятность повреждения роговицы также увеличивается при ЛИРЭ из-за таких анатомических особенностей, как мелкая передняя камера (ПК), закрытый или узкий угол ПК, избыточно толстый хрусталик в относительно коротком глазу.

До настоящего времени основным методом оценки состояния роговицы после лазерных вмешательств (ЛД, ЛИРЭ) на переднем отрезке глаз являлся метод зеркальной микроскопии, который имеет ограничения и позволяет оценить только задний эпителий роговицы [12, 13]. Конфокальная микроскопия роговицы (КМР) - более современный метод исследования, который позволяет проводить прижизненную морфологическую оценку структуры роговицы. Использование данного метода исследования, как правило, ограничивается оценкой роговицы при общих заболеваниях [14-20]. При этом отсутствуют научные работы, раскрывающие возможности КМР в вопросе оценки безопасности лазерных фотодеструктивных глазных вмешательств (в частности - ЛД ВК и ЛИРЭ), в связи с чем проведение дальнейших исследований в этом направлении является актуальным. Применение метода КМР позволит изучить возможные структурные преобразования в роговице после ЛФД и способствовать в будущем разработке оптимальных алгоритмов, обеспечивающих безопасность лазерного вмешательства.

**Цель работы.**

Цель данной работы состояла в исследовании состояния роговицы после лазерной дисцизии (ЛД) вторичной катаракты (ВК) и лазерной иридэктомии (ЛИРЭ) с помощью метода конфокальной микроскопии роговицы (КМР).

**Материалы и методы.**

Все пациенты были распределены на 2 группы. Первая группа состояла из 36

пациентов (41 глаз) с диагнозом "Артифакия, Вторичная катаракта", которым была проведена ЛД ВК. Пациенты данной группы были разделены на две подгруппы в зависимости от состояния роговицы – 1 А (22 глаза, 54 %) с неизмененной роговицей и 1 Б (19 глаза, 46 %) с наличием различных изменений в роговице. Вторая группа включала 20 пациентов (24 глаза) с диагнозом "Закрытоугольная глаукома" (15 случаев, 62,5 %) и "Подозрение на глаукому" (9 случаев, 37,5 %), которым была проведена ЛИРЭ.

На приборе HRT-3 фирмы Heidelberg (Германия) с насадкой Rostock Cornea, исследовали состояние роговицы до и после лазерных операций. Исследовали различные параметры, включая толщину роговицы в центре, количество ЭКР, полиморфизм и полимегатизм ЭКР, состояние нервных волокон и наличие депозитов на поверхности роговицы. Исследовали центральную зону роговицы, которая является самой важной, оптически активной областью. КМР позволяла получить изображение размером 384×384 пикселей, покрывающее площадь роговицы в 0,4х0,4 мм. При отборе пациентов в первую группу учитывались степень помутнения ЗКХ и их оптическая плотность, которые определяли методом биомикроскопии на щелевой лампе Opton (Германия) и с помощью сканирующей системы для исследования переднего отрезка глаза Pentacam HR (Oculus, Германия).

Гониоскопию (исследование угла ПК глаза) осуществляли по стандартной методике с использованием гониолинзы Magna view (Ocular, США). При осмотре оценивали профиль и степень открытия УПК по классификации Shaffer. Основным критерием для определения пациента во 2 группу являлось наличие закрытого или очень узкого УПК. Глубину передней камеры и расстояние от ЗКХ до роговицы оценивали на оптическом когерентном биометре IOL Master 700 (ZEISS, Германия).

Операции проводили на Nd:YAG лазерном офтальмодеструкторе LPULSA SYL-9000 Premio фирмы LightMed (Тайвань-США), λ=1,064 мкм. Рассекаемые лазерным деструктором ткани (задняя капсула хрусталика (ЗКХ), радужка) имели различную толщину и плотность. В связи с этим при подборе энергетических параметров в каждом случае использовали тактику постепенного увеличения энергии до получения эффекта «пробоя» в ткани по схеме, описанной в статье [21]. Данную тактику использовали в подгруппе 1А и во 2 группе. В подгруппе 1Б рассечение ЗКХ проводили по методике последовательной модификации ткани на минимально возможных значениях энергии, что было связано с наличием имеющихся изменений в роговице и высокой вероятностью ее дополнительной травматизации в связи с проведением лазерного вмешательства. С этой целью достижения эффекта добивались не за счет повышения уровня энергии, а за счет увеличения кратности лазерных импульсов. Медикаментозное сопровождение заключалось в назначении перед лазерной операцией и после ее проведения глазных капель с нестероидным противовоспалительным действием.

**Полученные результаты.**

Изучение оптической плотности ВК (помутнений в ЗКХ) позволило подразделить пациентов в 1 группе на условно «мягкие» пленки (псевдорегенераторная форма ВК) и условно «твердые» (фиброзная форма ВК). В подгруппе 1А с неизмененной роговицей количество мягких пленок ВК составило 17 (77 %) случаев, твердых – 5 (23 %). В группе 1Б с исходно измененной роговицей количество случаев с мягкими пленками ВК составило 10 (53 %) случаев, твердых – 9 (47 %).

Значительные различия в группах сравнения имел зафиксированный пороговый уровень энергии ввиду неоднородной плотности облучаемых вариантов ЗКХ с помутнениями и в связи с неоднородной толщиной радужки. Средний уровень энергии в импульсе составлял: в 1А группе – 2.77 мДж, 1Б – 2.55мДж, 2 группе – 3.7 мДж. Средний показатели суммарной энергии составили: в 1А группе – 212.5 мДж, 1Б – 180 мДж, 2 группе – 430.5мДж. Среднее расстояние от роговицы до облучаемой структуры (ЗКХ или радужки) составляло: в 1А группе – 4.47мм, 1Б – 4.43мм, во 2 группе – 2.45мм. Известно, что в 1 группе исходное состояние роговицы различалось из-за изначально имеющей

место сопутствующей патологии в 1Б группе. Поэтому представляло интерес исследование роговицы до и после лазерного воздействия в условиях уже имеющихся изменений и в случаях с интактной роговицей. Ниже приведены результаты сравнительного анализа отдельных показателей, демонстрирующих состояние роговицы в динамике по данным КМР (Табл.1).

***Таблица 1***
***Динамика показателей роговицы в группах сравнения до и через месяц после лазерного вмешательства***

| **Показатели роговицы** | | **(1-А группа)** $M \pm \sigma$ | **(1Б группа)** $M \pm \sigma$ | **2группа** $M \pm \sigma$ |
|---|---|---|---|---|
| толщина роговицы, мкм | до | 552 | 561 | 559 |
| | после | 554 | 569 | 570 |
| | *p* | 0.508 | 0.027 | 0.000 |
| Количество ЭКР кл/мм$^2$ | до | 1459 | 1395 | 2056 |
| | после | 1408 | 1286 | 1910 |
| | *p* | 0,000 | 0.001 | 0,000 |

Из таблицы 1 следует, что показатель толщины роговицы в 1 А группе после лазерного вмешательства значительно не изменился (p>0,05), в то же время толщина роговицы в группах 1 Б и 2 претерпел заметные изменения, выражающиеся достоверным увеличением данного показателя (p<0,05). Другой показатель, отражающий количество эндотелиальных клеток роговицы (ЭКР), при сравнении до и после лазерного воздействия, также имел достоверные различия в каждой подгруппе (p<0,05).

Во всех случаях после ЛД ВК и ЛИРЭ были выявлены изменения различной степени выраженности. В 1А группе в большинстве случаев выявлены единичные гиперрефлектирующие включения с четкими границами, округлой формы, экранирующие эндотелиальный слой роговицы. Минимальная потеря ЭКР (до ЛД ВК – 1459/мм2, после – 1408/мм2) позволила сохранить правильную гексогональную форму клеток и объясняла отсутствие признаков усиления их полиморфизма и/или полимегатизма (рис. 1, а, б).

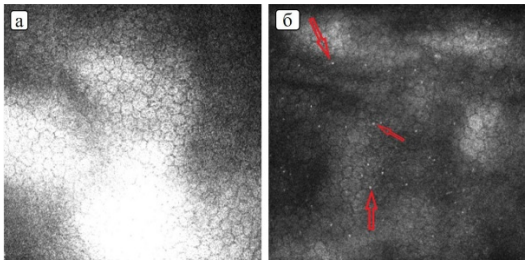



***Рис.1. Картина конфокальной микроскопии роговицы пациента 1А группы:***
***а – до лазерного вмешательства слой ЭКР не изменен;***
***б – после лазерного вмешательства слой ЭКР выглядит интактным, отмечаются единичные гиперрефлектирующие включения белого цвета (обозначено стрелками), гексогональная форма ЭКР сохранена.***

В 1Б группе было выявлено лазериндуцированное уменьшение количества ЭКР. Так, при среднем количестве ЭКР до ЛД ВК 1395/мм2, данный показатель после лазерного вмешательства снизился до уровня 1286/мм2. Кроме того, отмечено заметное усиление полиморфизма и полимегатизма ЭКР за счет уменьшения плотности клеток на единицу площади, их перераспределения и компенсаторного увеличения размера. Наряду с перечисленными изменениями в группе 1Б после ЛД определялось умеренное количество гиперрефлектирующих включений, а также заметное повышение рефлективности ядер ЭКР (рис.2, а, б, с). Перечисленные изменения в группе 1Б имели преимущественный характер и отличались большей степенью выраженности при сравнении с группой 1А.

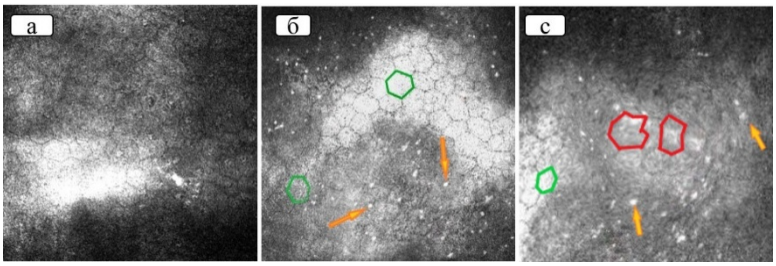



***Рис.2. Картина конфокальной микроскопии роговицы пациента 1Б группы:***
***а – до лазерного вмешательства отмечается умеренно выраженный полиморфизм и полимегатизм ЭКР;***
***б - после лазерного вмешательства определяется умеренное количество гиперрефлектирующих включений, частично экранирующих ЭКР (указано стрелками);***
***с - проявления полимегатизма и полиморфизма эндотелиальных клеток роговицы на фоне исходного и дополнительно индуцированного лазерным излучением дефицита ЭКР (на снимке красным цветом обведены границы измененных по форме и размеру клеток, зеленым цветом – граница неизмененной по форме и размеру клетки).***

Во 2-ой группе после проведения ЛИРЭ выявлялось большое количество гиперрефлектирующих включений разных размеров, в значительной степени экранирующих эндотелиальный слой роговицы. Столь многочисленные депозиты, покрывающие роговичный эндотелий, являются продуктами лазерной абляции радужки, формирующиеся в процессе проведения ЛИРЭ. Наличие во 2 группе большого количества депозитов после лазерного воздействия связано с разлетом аблированных фрагментов ткани радужки в непосредственной близости от роговицы. Кроме того, характерным для пациентов 2 группы являлось повышение рефлективности ядер ЭКР и достоверное уменьшение количества клеток до уровня 1910/мм2, при исходной средней плотности ЭКР – 2056/мм2. Также отмечено заметное усиление полиморфизма и полимегатизма ЭКР (рис.3 а, б, с).

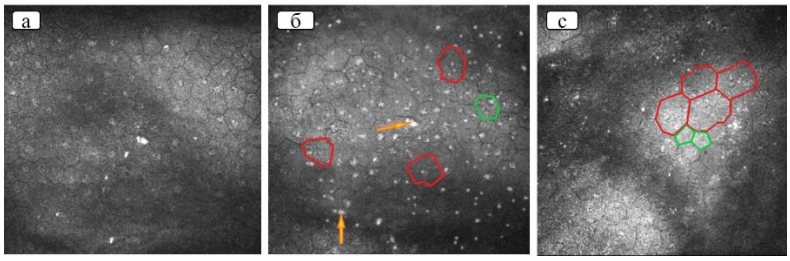



***Рис.3. Картина конфокальной микроскопии роговицы пациента 2 группы:***
***а – до лазерного вмешательства слой ЭКР выглядит интактным и содержит нормальные по форме и размеру клетки;***
***б - после лазерного вмешательства отмечено появление большого количества (до нескольких сотен в поле зрения) гиперрефлектирующих включений разных размеров, в том числе крупных депозитов (обозначено стрелками), расположенных на эндотелии роговицы и повышение рефлективности ядер ЭКР.***
***с – на фоне относительного уменьшения плотности ЭКР отмечается усиление их полимегатизма и полиморфизма (на снимке красным цветом обведены границы измененных по форме и размеру клеток, зеленым цветом – граница неизмененных клеткок), а также повышение рефлективности клеточных ядер.***

Состояние нервных волокон роговицы оценивалось до и после лазерных фотодеструктивных вмешательств. Изучалась толщина нервных волокон, оценивались их ход, направленность, рефлективность. Следует отметить, что проведение лазерных вмешательств существенным образом не повлияло на указанные параметры (в качественном и количественном выражении) ни в одной из групп. В группе 2, где значения суммарной энергии намного превышали значения в 1 группе, даже в условиях повышенного риска для роговицы на фоне укорочения безопасной дистанции от роговицы до облучаемой структуры (радужки), не привели к заметным изменениям нервных волокон роговицы (рис. 4, а, б).

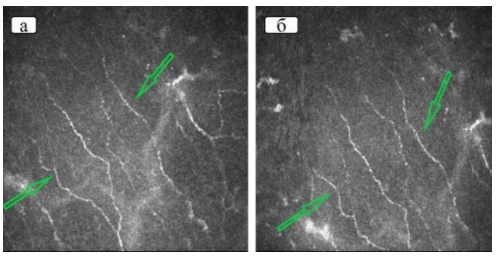



***Рис.4. Конфокальная микроскопия нервных волокон роговицы пациента 2 группы:***
***а - до лазерного вмешательства (зеленой стрелкой указаны нервные волокна роговицы);***
***б - после лазерного вмешательства толщина, ход, направленность и рефлективность нервных волокон не изменились (зеленой стрелкой указаны нервные волокна роговицы).***

В ходе исследования определялась зависимость между изменениями роговицы по данным КМР и параметрами лазерного вмешательства (значениями энергии импульса, количеством импульсов, суммарными значениями энергии). Кроме того, изучалось влияние на изменение в роговице фактора, учитывающего расстояния от роговицы до облучаемой структуры. В связи с этим изменения в роговице после лазерных реконструктивных вмешательств были распределены на 3 степени (минимальные, умеренные, максимальные) в зависимости от выраженности изменений с учетом представленных ниже критериев (табл. 2).

***Таблица 2***

| **Критерий** | **Степень изменения роговицы по данным КМР** | | |
|---|---|---|---|
| | **Минимальные** | **Умеренные** | **Максимальные** |
| Толщина роговицы (в мкм) | без изменений/ недостоверное увеличение, до 5 мкм | Увеличение, от 6 до 10 мкм | Увеличение, более 10 мкм |
| Гиперрефлектирующие включения, в поле зрения (в п.з.) | Единичные<br>До 50 в п.з. | умеренное количество от 50 до 100 в п.з. | большое количество более 100 в п.з. |
| Потеря ЭКР (количество) | Минимальная (до 50 клеток) | Умеренная (от 50 до 100 клеток) | Значительная (более 100. клеток) |
| Степень рефлективности ядер ЭКР | | Повышенная | Повышенная |
| Полимегатизм ЭКР (количество измененных ЭКР по размеру в % от общего количества нормальных ЭКР) | не выражен, менее 5% | Слабое усиление, от 5% до 10% | Заметное усиление, более 10% |
| Полиморфизм ЭКР | не выражен | слабое усиление | Заметное усиление |
| Нервные волокна роговицы | не изменены | не изменены | не изменены |

В таблице 3 приведены энергии импульса и значения суммарной энергии воздействия, а в таблице 4 соответствующие зависимости изменений роговицы по данным КМР в каждой группе.

***Параметры воздействия КМР для каждой группы*** ***Таблица 3***

| **Изменения роговицы по данным КМР/ количество глаз** | **Энергия импульса (мДж) (m ± σ), по группам** | | | **Суммарная энергия (мДж) (m ± σ), по группам** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1А | 1Б | 2 | 1А | 1Б | 2 |
| Минимальные | 2.25 ± 0.27* | 2.17 ± 0.3* | 3.63 ± 0.56*** | 149.7 ± 74.9** | 147.6 ± 59.2*** | 226.8 ± 117.69* |
| Количество(глаз) | 15 | 4 | 5 | 15 | 4 | 5 |
| Умеренные | 2.81 ± 0.46* | 2.64 ± 0.41* | 3.64 ± 0.63*** | 168.7 ± 74.7** | 169.6 ± 90.9*** | 466.1 ± 59.26* |
| Количество(глаз) | 5 | 7 | 8 | 5 | 7 | 8 |
| Максимально выраженные | 3.57 ± 0.45* | 3.15 ± 0.3* | 4.14 ± 0.6*** | 361.3 ± 182.8** | 264 ± 203.1*** | 726 ± 145.72* |
| Количество(глаз) | 2 | 8 | 11 | 2 | 8 | 11 |

***Примечание: влияние на роговицу показателей уровня энергии лазерного излучения и топографических параметров –*(p=0,000–0,005); **(p=0,02); ***(p>0,05)***

***Зависимость изменений роговицы по данным КМР в каждой группе…….*** ***Таблица 4***

| **Изменения роговицы по данным КМР/ количество глаз** | **Расстояние от роговицы до капсулы/радужки (мм) (m ± σ), по группам** | | | **Толщина радужки (мкм) (m ± σ)** |
|---|---|---|---|---|
| | **1А** | **1Б** | **2** | **2** |
| Минимальные | 4.5 ± 0.48*** | 4.24 ± 1.24*** | 2.59 ± 0.56* | 313.22 ± 16.82* |
| Количество(глаз) | 15 | 4 | 5 | 5 |
| Умеренные | 4.37 ± 0.76*** | 4.54 ± 0.23*** | 2.45 ± 0.22* | 360.1 ± 8.09* |
| Количество(глаз) | 5 | 7 | 8 | 8 |
| Максимально выраженные | 4.51 ± 0.85*** | 4.64 ± 0.37*** | 2.18 ± 0.29* | 393.4 ± 8.56* |
| Количество(глаз) | 2 | 8 | 11 | 11 |

***Примечание: влияние на роговицу показателей уровня энергии лазерного излучения и топографических параметров –*(p=0,000–0,005); **(p=0,02); ***(p>0,05)***

**Выводы.**

Из сопоставления данных таблиц 3 и 4 следует, что изменения роговицы после ЛД ВК в подгруппе 1А зависели от уровня энергии одиночного импульса (p<0,05), а также от суммарной энергии p<0,05).

Изменения роговицы после ЛД ВК в подгруппе 1Б зависели от уровня энергии одиночного импульса (p<0,05) и практически не были связаны с расстоянием от ЗКХ до роговицы (p>0,05).

Таким образом показано, что изменения роговицы во 2 группе после ЛИРЭ зависели от:

- суммарной энергии (мДж) (p<0,05);
- расстояния от роговицы до радужки (в мм) (p<0,05);
- исходной толщины радужки (p<0,05);

**Заключение**

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

Возможность развития после ЛФД осложнений со стороны роговицы в определенной степени связана с исходным состоянием роговицы. Риск развития повреждения роговицы повышается с уменьшением фокусного расстояния «роговица-облучаемая структура», прежде всего – при проведении ЛИРЭ.

Увеличение уровня энергии лазерного излучения и ее суммарных значений также способствует повреждению роговицы, что возможно при плотной ВК и толстой радужке.

Сопоставление параметров лазерного воздействия с изменениями роговицы по

данным КМР раскрывают основные факторы риска, способствующие повреждению роговицы в результате ЛФД тканей в переднем отрезке глаза и должны учитываться при разработке алгоритмов лазерных вмешательств с целью повышения их безопасности.

**Литература.**


1. Большунов А.В. Новые технологии в разработке и совершенствовании методов лечения заболеваний переднего и заднего отделов глаза. // Автореф. дис. докт. мед. наук. М.: 1994.
2. Гамидов А.А., Юсеф Ю.Н., Гаврилина П.Д., Медведева Е.П. Современные возможности лазерного воздействия на структуры переднего сегмента глаза. Вестник офтальмологии. 2023. Т. 139. № 3-2. С. 107-112.
3. Гамидов А.А., Большунов А.В. Лазерная микрохирургия зрачковых мембран. Иллюстрированное руководство // М.: 2008.
4. Steinert R.F., Puliafito C.A., Kumar S.R., Dudak S.D., Patel S. Cystoid macular edema, retinal detachment and glaucoma after Nd:YAG laser posterior capsulotomy. // Am J Ophthalmol. 1991. No. 112 (4): 373-380.
5. Гамидов А.А., Сосновский В.В., Боев В.И., Бузыканова М.А. Изучение факторов риска повреждения ИОЛ лазерным излучением. // Вестник офтальмологии. 2006. № 122 (5): 28-31.
6. Filipecka I, Gierek-Ciaciura S, Formińska-Kapuścik M, Myga W. Observation of the cornea with confocal microscopy after Nd:YAG laser capsulotomy. // Klin Oczna. 2000. No. 102 (6): 431-433. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11392804/
7. Юсеф Ю.Н., Гамидов А.А., Медведева Е.П., Сурнина З.В., Асламазова А.Э. Лазериндуцированные повреждения роговицы после YAG-лазерных вмешательств на структурах переднего сегмента глаза. // Вестник офтальмологии. 2022. № 138 (5-2): 266-272.
8. Юсеф Ю.Н., Гамидов А.А., Баум О.И., Южаков А.В., Медведева Е.П., Касьяненко Е.М. К вопросу об изучении механизмов и оценке безопасности nd:yag-лазерной деструкции задней капсулы хрусталика (экспериментально-клиническое исследование). // Вестник офтальмологии. 2022. № 138(5): 47-56.
9. Гамидов А.А. Лазерные реконструктивные вмешательства в зоне иридохрусталиковой диафрагмы при артифакии. // Автореф. дис. докт. мед. наук. М.: 2016.
10. Meyer KT, Pettit TN, Staasma BR. Corneal endothelial demage with neodimium: YAG laser. // Ophthalmology. 1984. No. 91 (9): 1022-1028.
11. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. // Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol. 2005. No. 243: 1056-1061. https://doi.org/10.1007/s00417-004-1075-8
12. Ozturk Y, Göktas E, Calli U. Corneal endothelial changes following Nd:YAG laser capsulotomy in patients with dense posterior capsular opacification. // Turkiye Klinikleri J Ophthalmol. 2019. No. 28 (2): 75-79.
13. Wu SC, Jeng S, Huang SC, Lin SM. Corneal endothelial damage after neodymium:YAG laser iridotomy. // Ophthalmic Surg Lasers. 2000. No. 31 (5): 411-6.
14. Аветисов С.Э., Сурнина З.В., Троицкая Н.А., Патеюк Л.С., Велиева И.А., Гамидов А.А., Сидамонидзе А.Л. Результаты лазерной кон- фокальной микроскопии роговицы при вирусных увеитах (предвари- тельное сообщение). // Вестник офтальмологии. 2019. № 135 (1): 53-58.
15. Аветисов С.Э., Карабанов А.В., Сурнина З.В., Гамидов А.А. Изменения нервных волокон роговицы на ранних стадиях болезни паркинсона по данным лазерной конфокальной микроскопии (предварительное сообщение). // Вестник офтальмологии. 2020. №136 (5-2): 191-196.
16. Крахмалева Д.А., Сурнина З.В., Маложен С.А., Гамидов А.А.

Гистоморфологическая картина роговицы по данным лазерной конфокальной микроскопии при кератопластике. // Медицинский совет. 2021. № 15 (21-2): 110-117.
17. Сурнина З.В., Суханова Е.В., Гамидов А.А. Клиническая манифестация эпителиальной дистрофии роговицы после lasik. // Медицинский совет. 2022. № 16 (23): 275-283.
18. Крахмалева Д.А., Сурнина З.В., Маложен С.А., Гамидов А.А. Гистоморфологическая картина роговицы по данным лазерной конфокальной микроскопии при кератопластике. // Медицинский совет. 2021. № 21-2: 110-117.
19. Аветисов С.Э., Страхов В.В., Сурнина З.В., Попова А.А., Гамидов А.А. Изменение клеток лангерганса и структуры нервных волокон роговицы у пациентов с глаукомой по данным лазерной конфокальной микроскопии. // Точка зрения. Восток - запад. 2021. № 3: 30-32.
20. Аветисов С.Э., Сурнина З.В., Гамидов А.А., Велиева И.А. Состояние нервных волокон роговицы после факохирургии. // Точка зрения. Восток - запад. 2021. № 2: 16-18.
21. A.A. Gamidov, A.V. Bol'shunov, A.V. Yuzhakov, E.M. Shcherbakov, O.I. Baum, E.N.Sobol. Optical transmission and laser ablation of pathologically changed eye lens capsule. // Quantum Electronics. 2015. No. 45 (2): 180 – 184.

**Сведения об авторах**
***Юсеф Наим Юсеф***
*д-р мед. наук, директор*
*ФГБНУ НИИ глазных болезней*
*Москва, Россия*
***Гамидов Алибек Абдулмуталимович***
*д-р мед. наук, старший научный сотрудник*
*ФГБНУ НИИ глазных болезней*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: algam@bk.ru*

***Медведева Елена Пулодовна***
*врач-офтальмолог, аспирант*
*ФГБНУ НИИ глазных болезней*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: safarova.lena1994@mail.ru*

***Сурнина Зоя Васильевна***
*к-т мед. наук, старший научный сотрудник*
*ФГБНУ НИИ глазных болезней*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: medzoe@yandex.ru*
***Баум Ольга Игоренва***
*Д.ф.-м.н., в.н.с.*
*НИЦ "Курчатовский институт"*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: baumolga@gmail.com*
***Касьяненко Екатерина Михайловна***
*научный сотрудник;*
*НИЦ "Курчатовский институт"*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: ekkassianenko@g mail.com*

**Information about author**
***Usef Naim Usef***
*Doctor of Science, director of the Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Sciences*
*Moscow, Russian Federation*
***Gamidov Alibek***
*Doctor of Science, Senior Scientist, Leading Researcher, Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Sciences*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: algam@bk.ru*
***Medvedeva Elena***
*ophthalmologist, graduate student*
*Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Sciences*
*Moscow, Russian Federation*
*e-mail: safarova.lena1994@mail.ru*
***Surnina Zoya***
*PhD, Senior Researcher,*
*Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Sciences Moscow, Russian Federation*
*e-mail: medzoe@yandex.ru*
***Baum Olga***
*Doctor of Science, Leading Researcher,*
*National Research Centre "Kurchatov Institute"*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: baumolga@gmail.com*
***Kasianenko Ekaterina***
*Researcher*
*National Research Centre "Kurchatov Institute"*
*Moscow, Russian Federation*
*e-mail: ekkassianenko@g mail.com*

УДК: 57.023
ГРНТИ 76.29
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.173-176

**Будько А.И., Завалева Е.В.,**
**Прохорычева А.А., Трашков А.П.**
Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт»

# РОЛЬ ГЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

*Авторами проведен анализ имеющихся на сегодняшний день актуальных работ по глимфатической системе, выявлены основные направления исследований, способы визуализации данной системы и приведены новые методики определения её дисфункции*
***Ключевые слова:*** *Глимфатическая система, злокачественные новообразования, APLS, вастеосомы, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона*

**Budko Alexander I., Zavaleva Elena V.,**
**Prokhorycheva Anna A., Trashkov Alexander P.**
National Research Center
«Kurchatov Institute»

# THE ROLE OF THE GLYMPHATIC SYSTEM IN BRAIN TUMORS. REVIEW OF LITERATURE DATA

*The authors analyzed the currently available relevant works on the glymphatic system, identified the main directions of research, methods for visualizing this system, and presented new methods for determining its dysfunction.*
***Keywords:*** *Glymphatic system, malignant neoplasms, APLS, vasteosomes, Alzheimer's disease, Parkinson's disease.*

.

## Введение

Глимфатическая система - недавно открытая макроскопическая система выведения отходов, в которой используется уникальная система периваскулярных туннелей, образованная астроглиальными клетками, способствующими эффективному выведению растворимых белков и метаболитов центральной нервной системы [1].

Динамика глимфатической системы впервые охарактеризована *in vivo* с помощью двухфотонной микроскопии на мышах в 2012 году. При применении доступного сегодня метода магнитно-резонансной томографии (МРТ) было показано, что глимфатическая система существует и у людей. Сегодня исследования глимфатической системы обширны, но существует множество нерешенных вопросов [2, 3, 4].

Известно, что нарушения в работе глимфатической системы рассматриваются как фактор риска развития возраст ассоциированных изменений головного мозга, нейроваскулярных, нейродегенеративных заболеваний, а также нарушений восстановления после травм головного мозга [5, 6, 7]. Множество работ посвящено связи между дисфункцией глимфатической системы (ГС) и нейродегенерацией, связанной с черепно-мозговой травмой, когнитивными нарушениями при заболеваниях мелких сосудов головного мозга [7, 8 ,9]. Существуют публикации, посвященные роли ГС при развитии перитуморального отека при опухолях головного мозга [10], но пока недостаточно данных, подтверждающих влияние глимфатической системы на локализацию первичных и вторичных (метастатических) новообразований, что представляет интерес для изучения патогенеза возникновения последних в связи с их распространенностью, незначительной пятилетней выживаемостью, а также развитием сопутствующей симптоматики, в том числе когнитивных нарушений, что, несомненно, сказывается на качестве жизни.

## Цель работы

Провести анализ источников литературы для формирования собственных гипотезы и методов оценки участия глимфатической системы в патогенезе первичных и

вторичных злокачественных новообразований головного мозга.

**Материалы и методы**

Был проведён анализ и обобщение имеющихся публикаций по тематике работы за последние 8 лет в реферативных базах данных PubMed и РИНЦ.

**Основные результаты и их обсуждение**

Основным направлением исследований в области глимфатической системы в последние годы стало изучение её морфологического строения и выведения амилоида – β, а также участия в патогенезе таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркенсона. Однако, статей, посвящённых новообразованиям головного мозга, недостаточно [10 - 13].

Основными биологическими тест-системами при проведении экспериментальных работ по изучению глимфатической системы выступают грызуны [14, 11, 15]. Однако, встречаются исследования, посвященные применению методов визуализации ГС посредством МРТ сканирования у человека [16].

В работе Jie Tang и др. в качестве маркера, идентифицирующего дисфункцию глимфатической системы, выступало изменение индекса ALPS, указывающего на проницаемость для жидкостей тканей головного мозга [17]. Однако, появились статьи по изучению вастеосом, изменение концентраций которых так же могут использоваться в качестве маркера дисфункции [18].

Основным методом визуализации глимфатической системы является МРТ с контрастом, в качестве которого используется гадолиний и меченая $O^{17}$ вода [19]. По данным публикаций основной методикой при проведении исследований ГС выступила диффузионная МРТ, для которой представлено сопутствующее программное обеспечение, повышающее точность получаемых результатов и изображений при МРТ [20].

Говоря о взаимосвязи опухолей головного мозга и глимфатической системы, следует отметить, что нарушение глимфатических функций коррелирует с ростом злокачественности опухолей головного мозга. Эта дисфункция особенно выражена при диффузных глиомах, где она связана с мутационным статусом IDH и степенью опухоли (по классификации Всемирной Организации Здравоохранения). Исследователями была выдвинута гипотеза о различии вовлечения ГС в развитие перитуморального отёка при новообразованиях ГМ и иных патологических состояниях, таких как инсульт или черепно-мозговая травма. Предполагается, что лучшее понимание глимфатической функции в контексте опухолей головного мозга потенциально может стать основой для формирования целенаправленных терапевтических стратегий и способствовать лучшему лечению опухолеассоциированных отеков. Данная гипотеза начала проверяться Туркиным А.М. и соавторами в 2023 году на менингиомах, и в их исследованиях было показано, что статистически значимое влияние на образование отёка оказывала дисфункция ГС [13].

Hu X, Deng Q, Ma L и соавторы показали, что глимфатическая система может играть важную роль в иммунитете к опухолям головного мозга и быть нацелена на иммунотерапию опухолей головного мозга [12].

**Выводы**

Авторы считают, что для реализации комплексного подхода исследования участия глимфатической системы в патогенезе новообразований головного мозга необходимо:

- в качестве тест-объектов при проведении экспериментальных работ по исследованию роли глимфатической системы в патогенезе новообразований головного мозга необходимо использовать не только грызунов, но и лабораторных приматов, так как их морфология ближе к человеческой;

- применение гадолиния и меченой $O^{17}$ воды экономически не эффективно, в связи с чем, в качестве основного метода визуализации и оценки структуры и функции глимфатической системы целесообразно использовать диффузионную МРТ без усиления;

- оценку функции глимфатической системы рационально проводить при помощи анализа индекса ALPS на диффузионной МРТ совместно с определением уровня вастеосом.

**Заключение**

Таким образом, в работе определены актуальность изучения роли глимфатической системы в патогенезе и ее влияние на локализацию новообразований головного мозга, тест-объекты для проведения экспериментальных исследований, а также маркеры и наиболее рациональный метод визуализации функции ГС.

**Литература**

1. Nadia Aalling Jessen, Anne Sofie Finmann Munk, Iben Lundgaard, Maiken Nedergaard. The Glymphatic System: A Beginner's Guide //Neurochem Res. 2015. V. 40. No. 12. P. 2583-2599.
2. Alba Corell, Asgeir S Jakola, Thomas Skoglund. The glymphatic system - an overview //Lakartidningen. 2023. P. 22120-22124.
3. Янькова Г.С., Богомякова О.Б. Лимфодренажная система головного мозга: возможности визуализации и современное состояние проблемы // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2020. Т. 9. №. 3. С. 81-89.
4. Cheng Hong Toh, Tiing Yee Siow, Mauricio Castillo. Peritumoral Brain Edema in Metastases May Be Related to Glymphatic Dysfunction // Front Oncol. 2021. No. 11. P. 725354.
5. Dai Z, Yang Z, Li Z, Li M, Sun H, Zhuang Z, Yang W, Hu Z, Chen X, Lin D, Wu X.Increased glymphatic system activity in patients with mild traumatic brain injury // Front. Neurol. 2023.No. 14. P.1148878.
6. Helene Benveniste, Xiaodan Liu, Sunil Koundal, Simon Sanggaard, Hedok Lee, Joanna Wardlaw. The Glymphatic System and Waste Clearance with Brain Aging: A Review // Gerontology. 2019. V. 65. No. 2. P. 106-119.
7. Tang J, Zhang M, Liu N, Xue Y, Ren X, Huang Q, Shi L, Fu J. The Association Between Glymphatic System Dysfunction and Cognitive Impairment in Cerebral Small Vessel Disease // Front Aging Neurosci. 2022. V. 14. P. 916633.
8. Matthew E. Peters, Constantine G. Lyketsos. The glymphatic system's role in traumatic brain injury-related neurodegeneration //Molecular Psychiatry. 2023. No. 28. P. 2707–2715.
9. Zhao Ding, Xiaodi Fan, Yehao Zhang, Mingjiang Yao, Guangrui Wang, Yilei Dong, Jianxun Liu, Wenting Song. The glymphatic system: a new perspective on brain diseases. //Front. Aging Neurosci. 2023. V. 15. P.1179988.
10. Cheng Hong Toh, Tiing Yee Siow, Mauricio Castillo. Peritumoral Brain Edema in Metastases May Be Related to Glymphatic Dysfunction //Front Onco. 2021. V. 11. P. 725354.
11. Jasleen Kaur, Guangliang Ding, Li Zhang, Yong Lu, Hao Luo, Lian Li, Edward Boyd, Qingjiang Li, Min Wei, Zhenggang Zhang, Michael Chopp & Quan Jiang. Glymphatic transport is reduced in rats with spontaneous pituitary tumor //Front Med (Lausanne). 2023. V. 10. P.1189614.
12. Hu X, Deng Q, Ma L, Li Q, Chen Y, Liao Y, Zhou F, Zhang C, Shao L, Feng J, He T, Ning W, Kong Y, Huo Y, He A, Liu B, Zhang J, Adams R, He Y, Tang F, Bian X, Luo J., «Meningeal lymphatic vessels regulate brain tumor drainage and immunity //Cell Res. 2020. V. 3. No. 3. P. 229-243.
13. Туркин А.М., Мельникова-Пицхелаури Т.В., Фадеева Л.М., Кравчук А.Д., Ошоров А.В., Лапина П.С., Петряйкин А.В., Титов О.Ю., Рыжова М.В., Козлов А.В., Пронин И.Н. Перитуморозный отек при менингиомах и факторы, влияющие на его формирование: количественная оценка на основе КТ и МРТ //«Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. 2023. Т. 87. №. 4. С. 17-26.

14. Jasleen Kaur, Guangliang Ding, Li Zhang, Yong Lu, Hao Luo, Lian Li, Edward Boyd, Qingjiang Li, Min Wei, Zhenggang Zhang, Michael Chopp, Quan Jiang. Imaging glymphatic response to glioblastoma //Cancer Imaging. 2023. V. 23. No. 107. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37904254/.
15. Lian Li, Michael Chopp, Guangliang Ding, Esmaeil Davoodi-Bojd , Li Zhang, Qingjiang Li, Yanlu Zhang, Ye Xiong, Quan Jiang. MRI Detection of Impairment of Glymphatic Function in Rat after Mild Traumatic Brain Injury // Brain Res. 2020. V. 1747. P. 147062.
16. Naganawa S., Taoka T., Ito R., Kawamura M. The Glymphatic System in Humans: Investigations With Magnetic Resonance Imaging //Investigative Radiology. 2024. V. 59. No. 1. P. 1-12.
17. Jiajie Xu, Ya Su, Jiayu Fu, Xiaoxiao Wang, Benedictor Alexander Nguchu, Bensheng Qiu, Qiang Dong, Xin Cheng. Glymphatic dysfunction correlates with severity of small vessel disease and cognitive impairment in cerebral amyloid angiopathy //European journal of neurology. 2022. V. 29. No. 10. P. 2895-2904.
18. Riba Marta, Jaume del Valle, Molina-Porcel Laura, Vilaplana Jordi. Wasteosomes (corpora amylacea) as a hallmark of chronic glymphatic insufficiency // PNAS. 2022 V. 119 . No. 48. P. e2211326119.
19. Mohammed S. Alshuhri, Lindsay Gallagher, Lorraine M. Work, and William M. Holmes. Direct imaging of glymphatic transport using H217O MRI // JCI Insight. 2021. V. 6. No. 10. P. e141159.
20. Rena Elkin, Saad Nadeem, Eldad Haber, Klara Steklova, Hedok Lee, Helene Benveniste, Allen Tannenbaum. GlymphVIS: Visualizing Glymphatic Transport Pathways Using Regularized Optimal Transport // Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI. 2018. P 844–852

**Сведения об авторах**

***Будько Александр Игоревич**, аспирант,*
*НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия.Эл. почта: Budko_AI@nrcki.ru*

***Завалева Елена Валентиновна,** к.м.н,*
*НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия, Эл. почта: Zavaleva_EV@nrcki.ru*

***Прохорычева Анна Алексеевна**, аспирант,*
*НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия. Эл. почта: a.prokhorycheva@gmail.com*

***Трашков Александр Петрович**, к. м. н., заместитель руководителя ККНБИКС-пт по научной работе,*
*НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия. Эл. почта: Trashkov_AP@nrcki.ru*

**Information about author**

***Budko Alexander Igorevich** PhD student National Research Center «Kurchatov Institute»*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: Budko_AI@nrcki.ru*

***Zavaleva Elena Valentinovna,** Ph.D., National Research Center "Kurchatov Institute",*
*Moscow, Russia, El. mail:*
*Zavaleva_EV@nrcki.ru*

***Prokhorycheva Anna A.**, PhD student National Research Center «Kurchatov Institute»*
*Moscow, Russian Federation.*
*E-mail: a.prokhorycheva@gmail.com*

***Trashkov Alexander P.**, PhD Doctor of (Med.) Sciences. Deputy Head KC NBICS -nature-like technologies for scientific work, National Research Center «Kurchatov Institute»*
*Moscow, Russian Federation.*
*E-mail: Trashkov_AP@nrcki.ru*

УДК 617-089:538.93
ГРНТИ 59.14
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.177-183

**А.Н. Коновалов, В.И. Юсупов**
НИЦ «Курчатовский институт»

# МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭНДОВАЗАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ ОБЛИТЕРАЦИИ НА ДЛИНЕ ВОЛНЫ 0.98 МКМ

*Проведено моделирование эндовазальной лазерной облитерации (ЭВЛА) на длине волны 0.98 мкм в программе COMSOL Muliphysics. Рассчитаны температурные поля, потоки и процесс коагуляции при движении оптоволокна в вене. Разработанная модель может использоваться для прогнозирования и подбора режима воздействия (мощность излучения, скорость движения волокна) для ЭВЛА.*

***Ключевые слова:*** *варикозное расширение вен, лазеры, оптическое волокно, теплоперенос, коагуляция.*

**A.N. Konovalov. V.I. Yusupov**
NRC “Kurchatov Institute”

# SIMULATION OF ENDOVASAL LASER OBLITERATION AT A WAVELENGTH OF 0.98 μm

*Endovasal laser obliteration (EVLA) at a wavelength of 0.98 μm was simulated in the COMSOL Multiphysics program. Temperature fields, flows and the coagulation process during the movement of optical fiber in a vein are calculated. The developed model can be used to predict and select the impact mode (radiation power, fiber speed) for EVLA.*

***Keywords****: varicose veins, lasers, optical fiber, heat transfer, coagulation.*

## Введение.

Варикозное заболевание вен – распространенное и коварное заболевание, связанное с их необратимым расширением в результате патологических процессов и приводящее к нарушению нормального кровотока. За два последних десятилетия «золотым стандартом» лечения этого заболевания стала эндовазальная лазерная облитерация (коагуляция) ЭВЛО [1-3]. При такой процедуре пораженная вена пережимается с двух сторон, в ее полость вводится лазерное волокно, затем лазер включается, а волокно постепенно выводится с постоянной скоростью. В результате теплового воздействия на венозные стенки происходит их деградация и выведение сосуда из общего кровотока. И хотя среди специалистов достигнут определенный консенсус об оптимальных параметрах лазерного воздействия, до сих пор происходят их активные поиски [4-10].

Так, проходят активные дискуссии о том, какие же длины волн лучше использовать [2,4,6,7,9]. Первую группу составляют лазеры с λ=810 нм, 940 нм, 970 или 980 нм. Это излучение относительно слабо поглощается водой. Во вторую группу входят лазеры с λ=1.47, 1.56 или 1.94 мкм, излучение которых очень эффективно поглощается водой [11]. Основное преимущество ЭВЛО с использованием лазеров из второй группы заключается в существенно большем вкладе эффектов взрывного кипения волы, что приводит к периодической очистке торца волокна от сгустков коагулированной и карбонизированной крови. Преимущество при применении лазеров из первой группы заключается в их доступности и относительной дешевизне.

Клинические наблюдения показывают, что технология ЭВЛО с использованием диодного лазера с λ=980 нм в непрерывном режиме представляется безопасной и эффективной [12]. Однако для более детальной ее отработки необходимо понимать, какие гидродинамические процессы происходят в просвете вены и какие при этом достигаются температуры. Такие исследования могут проводится путем экспериментального или компьютерного моделирования. Моделирование, проведенное с плазмой крови [13] позволило изучить особенности генерации пузырьков, струйных и конвективных течений и

образования коагулянта. В [7] на модели in vivo показано, что средняя температура на торце волокна при ЭВЛО с лазерами из первой группы превышает 700 °C. При этом оказалось, что на внешней поверхности вены температура во время ЭВЛО достигает лишь от 40-49 °C [14] до 80-90 °C [5]. В [14] с использованием термопар было показано, что температура на оптической оси на удалении 4 мм от торца волокна лежит в диапазоне 40-85 °C, что может быть достаточно для денатурации белка. Для уточнения механизма действия лазерного излучения при ЭВЛО необходимо провести сравнение этих «точечных» значений с результатами компьютерного моделирования.

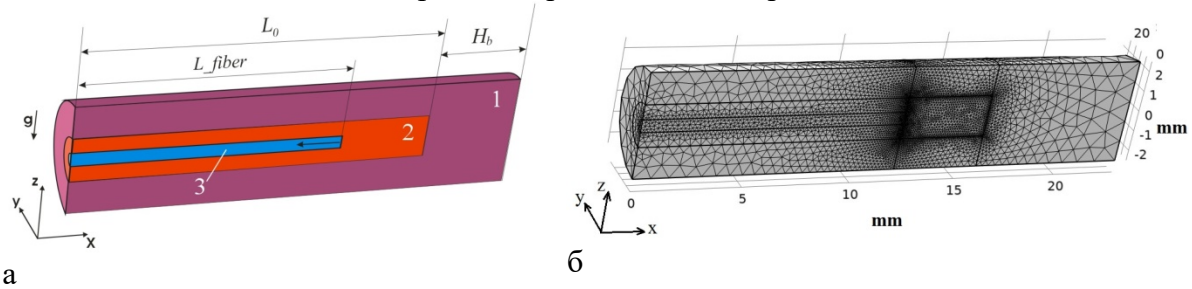
Оптические методы регистрации могут дать более полную информацию, но для этого необходимо использовать прозрачные среды. В [1] в качестве среды для моделирования процессов при ЭВЛК использовалась вода, а в [2] - водный раствор поверхностно-активного вещества и сыворотки крови. Более подходящим объектом для моделирования процессов теплопередачи при лазерном нагреве крови является плазма крови, которая по составу ближе к крови и содержит ряд коагулирующих белков, таких как фибриноген и антигемофильный глобулин, отсутствовавших в сыворотке крови [3].

**Цель работы.**

Разработка модели процесса ЭВЛО на длине волны 0.98 мкм и изучение методом численного моделирования особенностей формируемых тепловых полей, гидродинамических потоков и коагуляции сыворотки крови в вене.

**Материалы и методы.**

Моделирование процесса ЭВЛО производилось с использованием программы COMSOL Muliphysics 6.1. Рассчитывались тепловые поля, гидродинамические потоки и коагуляция, которые возникают в вене в процессе воздействия лазерного излучения, выходящего из торца волокна. Моделирование осуществлялось как 3-х мерная задача с временной динамикой в 3D геометрии, которая показана на рис.1.




а б

***Рис.1 Геометрия (а) и расчётная сетка (б) для мультифизической задачи эндовазальной лазерной облитерации. Расчётные зоны: 1 – окружающая биоткань, 2 – полость сосуда с кровью, 3 – оптическое волокно.***

Цилиндр с внешним диаметром Ra представляет внешнюю среду вены. Полость в этом цилиндре представляет полость вены с внутренним диаметром Rv. В данной модели не учитывается стенка вены как отдельный элемент геометрии, поскольку её теплофизические параметры не столь отличаются от окружающей ткани, чтобы значительно повлиять на картину теплопередачи. Данная цилиндрическая полость не сквозная. Это необходимо для моделирования пережатия вены перед операцией. Расчёт гидродинамических процессов осуществлялся только в этой полости, моделирующей полость вены, где располагается кровь, тогда как тепловые поля и коагуляция ткани осуществлялись во всей области 3D модели. Оптоволокно моделируется цилиндром радиуса r_fiber, который расположен в полости вены. При моделировании процесса ЭВЛО цилиндр радиуса r_fiber, сдвигался справа налево с задаваемой скоростью V. Это осуществлялось с использованием инструмента подвижной сетки в COMSOL Muliphysics.

Расчёт температуры и гидродинамических потоков рассчитывался с помощью мульти-физической связки стандартных узлов “Heat Transfer in Solids and Fluids” и “Laminar Flow” программы COMSOL. Для моделирования термогравитационной конвекции, возникающей при локальном неоднородном нагреве крови, в расчёте была учтена

сила гравитации, направленная вертикально сверху вниз. В качестве граничного условия для тепловой задачи бралась постоянная температура равная температуре тела человека 36.6 ОС. Для задачи гидродинамики в качестве граничного условия для левой границы области 2 бралось условие открытой границы. Для остальных границ в задаче гидродинамики устанавливалось условие “без проскальзывания”.

Излучение, выходящее из волокна, имеет Гауссовый профиль с изменяющимся радиусом, который определяется апертурой волокна. В качестве зависимости радиуса пучка от расстояния до волокна □x бралась линейная зависимость:

$r_0(\Delta x) = 0.3$ [мм] + 0.1 * Δx [мм] (1)

где Δx - расстояние до торца волокна. Эта зависимость определяется параметром апертуры используемого волокна на длине волны 0.98 мкм.
Интенсивность лазерного излучения моделировалось в виде:

$$I_0(r,\Delta x) = \frac{P_0}{\pi r_0^2(\Delta x)} e^{-\left(\frac{r^2}{r_0^2(\Delta x)}\right)-\mu_{eff}\Delta x} \quad (2)$$

где $r^2 = y^2 + z^2$, $P_0$ – мощность лазерного излучения, $\mu_{eff}$ - эффективный коэффициент экстинкции, $\mu_a$, - коэффициент поглощения.
Объёмный источник тепловыделения соответственно брался как:

$$Q_T(r,\Delta x) = I_0(r,\Delta x)\mu_a \quad (3)$$

Процесс коагуляции описывался дифференциальным уравнением, для доли C исходных некоагулированных молекул белков с учётом конвективного движения среды:

$$\frac{dC}{dt} + \vec{u}\cdot\nabla C = -C\,Ae^{-E_a/(RT)} \quad (4)$$

где $\vec{u}$– скорость движения конвективного потока в крови, $A$ и $E_a$ – константы в интеграле Аррениуса, которые описывают температурную зависимость скорости коагуляции.
При отсутствии движения среды $|\vec{u}|=0$ данное уравнение переходит в обычное уравнение для скорости коагуляции, решением которого является известный интеграл Аррениуса.
Коагуляция крови в вене приводит к тому, что её вязкость резко возрастает с температурой, что в конечном итоге приводит к закупорке вены в процессе (ЭЛО). Данное обстоятельство нами моделировалось как зависимость вязкости крови от температуры и от параметра C по квадратичному закону.

$$\eta = 2.5[\mathrm{mPa}*\mathrm{s}] + \frac{80[\mathrm{mPa}*\mathrm{s}*\mathrm{K}]}{\mathrm{T}-273.15[\mathrm{K}]} + 10^4[\mathrm{mPa}*\mathrm{s}](1-C)^2 \quad (3)$$

Данная полуэмпирическая зависимость была получена по данным зависимости вязкости белка яйца от температуры, представленной в [15]. Такой подход для описания величины вязкости плазмы крови может использоваться как некоторое приближение, поскольку как яичный белок, так и кровь содержат примерно 80% воды, причём примерно 50% белкового состава составляет альбумин. В связи с этим нами в качестве параметров A и Ea в интеграле Аррениуса использовались значения для белка альбумина [15]. В Таблице 1 приведены значения всех параметров для данной мультифизической задачи.

***Таблица 1. Расчётные параметры геометрии в мультифизической задаче.***

| **Расчётная зона 3D модели** | **Физическая величина** | **Значение** | **Единица измерения** |
|---|---|---|---|
| **1** Окружающая ткань | Теплофизические параметры | мышца из БД COMSOL | |
| | Коэффициент поглощения, □$_a$ | 0.5 | см$^{-1}$ |
| | Коэффициент экстинкции, □$_{eff}$ | 5 | см$^{-1}$ |

| **Расчётная зона 3D модели** | **Физическая величина** | **Значение** | **Единица измерения** |
|---|---|---|---|
| | Радиус расчётной зоны, Ra | 2 | мм |
| | Длина расчётной зоны, $L_0+H_b$ | 24 | |
| **2** Плазма крови | Теплофизические параметры | вода из БД COMSOL | |
| | Коэффициент поглощения, $\mu_a$ | 0.5 | $см^{-1}$ |
| | Коэффициент экстинкции, $\mu_{eff}$ | 0.65 | $см^{-1}$ |
| | Динамическая вязкость | формула (3) | |
| | Радиус расчётной зоны, Rv | 1 | мм |
| | Длина расчётной зоны, $L_0$ | 17 | мм |
| | | | |
| **3** оптоволокно | Теплофизические параметры | кварцевое стекло из БД COMSOL | |
| | Радиус расчётной зоны, r_fiber | 0.3 | мм |
| | Начальная длина, L_fiber | 12 | мм |
| | Скорость вытягивания волокна, V | -1 | мм/с |
| Все расчётные зоны | $A$ | $3.8*10^{57}$ | $с^{-1}$ |
| | $E_a$ | $3.88*10^5$ | Дж/моль |
| | Шаг по времени | 20 | мс |

**Полученные результаты.**

Для сравнения нами был произведён расчёт для двух случаев: без учёта коагуляции и с учётом коагуляции. В первом случае в формуле вязкости (3) не учитывалось слагаемое (1-C)2. На рис.2 приведено распределения скорости потока в вене в плоскости X- в разные моменты времени для этих двух случаев.

Слева от торца волокна наблюдается сильная неоднородность в поле скоростей. Это вызвано тем, что в этой области размер расчётной сетки устанавливался достаточно большим. Установка крупной сетки оправдывается тем, что эта зона до торца волокна не столь информативна для понимания физических явлений, которые происходят в процессе ЭВЛО и это позволило сократить время счёта за счёт существенного уменьшения количества узлов сетки.

Как видно из рис.2 в начальный момент времени заметной разницы в распределении потоков не наблюдается. Затем по мере движения волокна разница в потоках для этих двух случаев становится существенной. Это связано с тем, что по мере разогрева среды возникает процесс коагуляции с быстрым возрастанием вязкости. В области, где происходит этот процесс, резко снижается скорость потоков. Это видно на рис.2 справа для моментов времени 2.5 с, 5 с и 10 с. Также эта разница наблюдается и для моментов времени более ранних, например, для момента времени 0.8 с и дальше. Появляется явная компонента скорости вдоль оси X, тогда как при отсутствии коагуляции в основном движение происходит снизу вверх за счёт конвективного потока. Это указывает на то, что в некоторый момент времени некоторый объём жидкости начинает двигаться по направлению к волокну как единое целое. Затем данное движение к волокну прекращается, что видно по синему цвету правой части рис.2. Данное поведение потоков жидкости в капилляре объясняется возникновение коагулянта на торце волокна, который начинает двигаться вместе с волокном. Затем, когда размер коагулянта становится достаточно большим происходит закупорка вены, движение коагулянта. В последующем происходит постепенное нарастание коагулянта по направлению торца волокна по мере разогрева новой порции объёма жидкости, поступающей к торцу волокна при его движении.

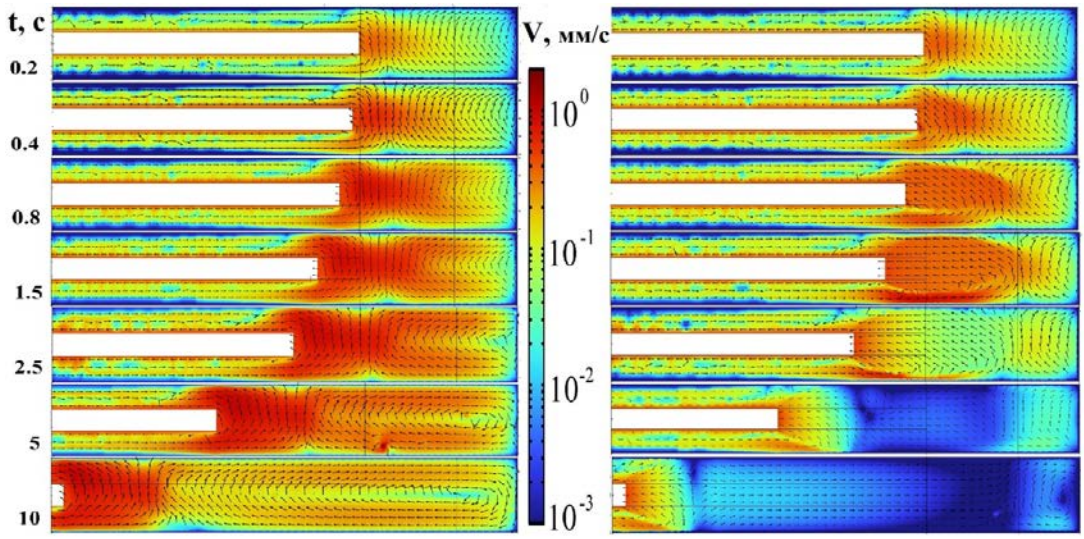



***Рис.2 Распределения скорости потока внутри вены в плоскости X-Z проходящей через центр вены в разные моменты времени. Слева – без коагуляции, справа – при учете процесса коагуляции. Стрелками обозначено направление движения потока.***

Это хорошо видно на распределении концентрации коагулированного белка в разные моменты времени, приведённой на рис.3. На этом же рисунке слева приведено распределение температурного поля.

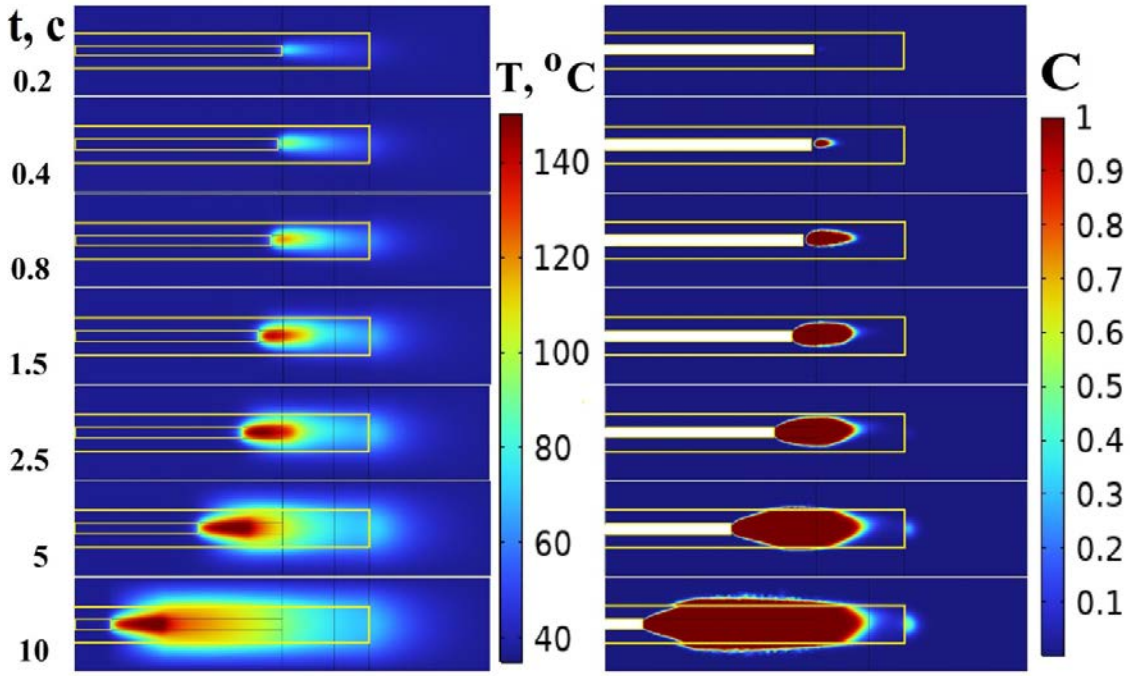
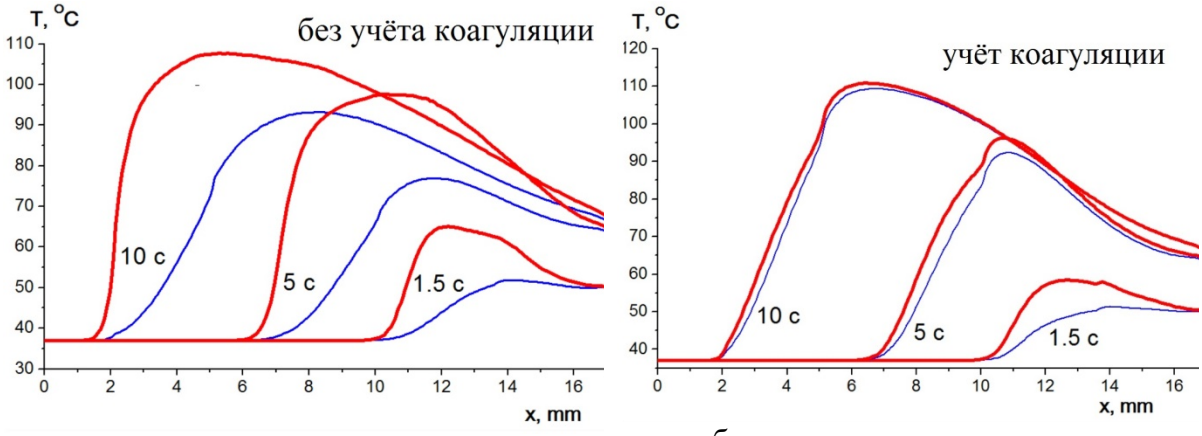



***Рис.3 Распределение температуры (слева) и концентрации коагулированного белка (справа) в вене в процессе ЭВЛО в различные моменты времени.***

В ЭВЛО наиболее важным показателем процесса является температура стенки вены. Эта температура и её динамика будут определять произойдёт ли деградация вены. На рис.4 приведено распределение температуры на верхней и нижней поверхности вены в разные моменты времени. Как видно из рисунка, если в расчётах не учитывать коагуляцию, наблюдается заметная разница в температуре верхней и нижней стенки вены. Например, в момент времени 5 с эта разница в температурах достигает примерно 42 °C. Тогда как при учёте коагуляции разница температур составляет величину 7 - 8 °C. Это связано с тем, что в отсутствии коагуляции термогравитационная конвекция по направлению снизу вверх существенна, что приводит к большему разогреву верхней стенки сосуда.




а б

***Рис.4 Распределение температуры на верхней (красная линия) и нижней (синяя линия) поверхности вены в разные моменты времени без учёта коагуляции (а) и с учётом коагуляции (б).***

**Выводы.**

Проведено теоретическое численное исследование процесса эндовазальной лазерной облитерации на длине волны 0.98 мкм с использованием программы COMSOL Muliphysics. Разработанная модель может использоваться для прогнозирования и проектирования процесса эндовазальной лазерной облитерации и подборов режимов воздействия (скорость движения волокна, мощность излучения) с учётом параметров вены.

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

**Заключение**

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

-впервые разработана модель процесса эндовазальной лазерной облитерации на длине волны 0.98 мкм, в которой одновременно учитываются процессы тепло и массопереноса, а также коагуляции в их мультифизической связке;

- результаты численного исследования продемонстрировали ряд особенностей нагрева и потоков, происходящих в вене, которые обусловлены постепенным образованием коагулянта на торце волокна с последующим его отрывом;

-показано, что при учёте процесса коагуляции при мощности излучения 10 Вт и скорости перемещения волокна 1 мм/с разность температуры верхней и нижней стенки вены составляет $\Delta T \sim 7$-$8$ °C, что заметно ниже, чем при расчёте без учёта процесса коагуляции ($\Delta T \sim 40$ °C).

**Литература.**

1. Teter K.A., Kabnick L.S., Sadek M. Endovenous laser ablation: A comprehensive review // Phlebology. 2020. №9. P. 656-662.
2. Malskat W.S., Poluektova A.A., van der Geld C.W., Neumann H.M., Weiss R.A., Bruijninckx C.M., van Gemert M.J. Endovenous laser ablation (EVLA): a review of mechanisms, modeling outcomes, and issues for debate // Lasers in medical science. 2014. P. 393-403.
3. Стойко Ю.М., Мазайшвили К.В. Эндовенозная лазерная облитерация. М.: ЛЕНАНД, 2020. С. 208.
4. Чудновский В.М., Юсупов В.И., Захаркина О.Л., Игнатьева Н.Ю., Жигарьков В.С., Яшкин М.Н., Баграташвили В.Н.. Вклад лазероиндуцированной газопарожидкостной динамики в механизм эндовенозной лазерной облитерации // Современные технологии в медицине. 2016. №2. С. 6-13.

5. Belikov A.V., Skrypnik A.V.. Soft Tissue Cutting Efficiency by 980nm Laser with Carbon-, Erbium-, and Titanium-Doped Optothermal Fiber Converters // Lasers in Surgery and Medicine. 2018. 9999:1–16.
6. Минаев В.П., Минаев Н.В., Богачев В.Ю., Капериз К.А., Федоров Д.А., Юсупов В.И. Теплоперенос в воде при лазерном нагреве через световоды для эндовенозной лазерной коагуляции // Квантовая электроника. 2020. №8. С. 793-800.
7. Yamamoto T., Sakata M. Influence of fibers and wavelengths on the mechanism of action of endovenous laser ablation // Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders. 2014. №1. P. 61-9.
8. Деркачев С.Н., Федотов Ю., Фигуркина М., Воробьев С., Гузев М., Юсупов В., Чудновский В. Лазерная облитерация варикозно трансформированных притоков магистральных вен (скьюер-облитерация) // Флебология. 2022. №3. С. 195.
9. Игнатьева Н.Ю., Захаркина О.Л., Свиридов А.П., Мазайшвили К.В., Шехтер А.Б. Оценка минимальной мощности лазерного излучения с длинами волн 1.47, 1.56 и 1.68 мкм для эффективной облитерации варикозных вен. // Квантовая электроника. 2022. №1. С. 78-82.
10. Chudnovskii V., Mayor A., Kiselev A., Yusupov V. Foaming of blood in endovenous laser treatment. // Lasers in Medical Science. 2018. P. 33:1821–1826.
11. Deng R., He Y., Qin Y., Chen Q., Chen L. Measuring pure water absorption coefficient in the near-infrared spectrum (900 - 2500 nm). // Yaogan Xuebao - Journal of Remote Sensing. 2012. №1. P. 192-206.
12. Kim H.S., Nwankwo I.J., Hong K., McElgunn P.S.. Lower energy endovenous laser ablation of the great saphenous vein with 980 nm diode laser in continuous mode. // Cardiovascular and interventional radiology. 2006. P. 64-69.
13. Minaev V.P., Minaev N.V., Bogachev V.Y., Kaperiz K.A., Yusupov V.I. Endovenous laser coagulation: Asymmetrical heat transfer and coagulation (modeling in blood plasma) // Lasers in Medical Science. 2022. №1. P. 627-38.
14. Zimmet S.E., Min R.J. Temperature Changes in Perivenous Tissue during Endovenous Laser Treatment in a Swine Model. // Dermatol Surg. 2003. P. 911-915.
15. SV-A Series. Sine-wave vibro viscometer, User's handbook, June 2009, International Div., A&D Company, Limited.

**Сведения об авторах**
***Алексей Николаевич Коновалов***
*к.ф-м.н., с.н.с.*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: ank27.ift@mail.ru*

***Владимир Исаакович Юсупов***
*к.ф-м.н., ведущий научный сотрудник*
*НИЦ «Курчатовский институт»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: iouss@yandex.ru*

**Information about author**
***Alexey Nikolaevich Konovalov***
PhD (*PhD (Math), Senior Scientist*
*NRC "Kurchatov Institute"*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: ank27.ift@mail.ru*

***Vladimir Issaakovich Yusupov***
PhD (*PhD (Math), Leading Researcher,*
*NRC "Kurchatov Institute"*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: iouss@yandex.ru*

УДК: 57.023
ГРНТИ 76.29
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.184-187

**Прохорычева А.А., Завалева Е.В., Будько А.И., Трашков А.П.**
Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

*В работе представлен перечень базовых биомаркеров повреждения тканей головного мозга после черепно-мозговой травмы, из которых определены основные, имеющие наибольшее диагностическое значение.*

***Ключевые слова:*** *биомаркеры, нейровоспаление, травматическое повреждение головного мозга, черепно-мозговая травма, сотрясение головного мозга*

**Prokhorycheva Anna A., Zavaleva Elena V., Budko Alexander I., Trashkov Alexander P.**
National Research Center «Kurchatov Institute»

# USE OF BIOMARKERS IN THE DIAGNOSIS OF TRAUMATIC BRAIN INJURY: LITERATURE REVIEW

*The paper presents a list of basic biomarkers of brain tissue damage after traumatic brain injury, of which the main ones that have the greatest diagnostic value are identified.*

***Keywords:*** *biomarkers, neuroinflammation, traumatic brain injury, concussion*

## Введение

К настоящему моменту ведущим методом диагностики черепно-мозговой травмы (ЧМТ) является компьютерная томография (КТ), благодаря которой возможно визуализировать внутричерепные органические изменения головного мозга, являющиеся показаниями к госпитализации пациентов. Однако, у 90–95% пациентов с лёгкой черепно-мозговой травмой (ЛЧМТ) не определяются морфологические изменения [3], так как повреждения характеризуются метаболическими, ионными, нейротрансмиттерными и другими клеточно-молекулярными нарушениями. Ограничение визуализации для диагностики ЛЧМТ служит причиной поиска других доступных методов.

В последние десятилетия активно исследуются механизмы вторичного повреждения тканей мозга, и ведется поиск биологических молекул, принимающих участие в патогенезе этого повреждения. Полученные данные будут способствовать разработке новых терапевтических методов, направленных на предупреждение развития нейродегенеративных процессов.

**Цель работы** – провести анализ литературы и определить ключевые биомаркеры травматического поражения головного мозга, которые потенциально могут быть включены в новые диагностические критерии ЧМТ и будут являться предиктором тяжелых исходов в отдаленном периоде после травмы.

## Материалы и методы

Был проведен анализ источников литературы в базах данных Scopus, Web of Science, MEDLINE/PubMed, CyberLeninka и E-library с использованием терминов в предметных установках «биомаркеры», «нейровоспаление», «травматическое повреждение головного мозга», «черепно-мозговая травма», «сотрясение головного мозга». Из общего числа найденных публикаций отобраны научные работы, посвященные связи механизмов развития ЧМТ и современных методов диагностики. Глубина поиска составила 10 лет.

## Результаты

Патогенез ЧМТ включает механизмы первичного и вторичного повреждения. К первому относится механическое воздействие на ткани мозга, ко второму –

нейровоспаление, эксайтотоксичность, нарушение ионного баланса и другие. Оба механизма сопряжены с высвобождением в межклеточное пространство биологических молекул.

Наиболее активное участие в патогенезе травмы принимают клетки астро- и микроглии.

Клетки микроглии первыми реагируют на повреждение в паренхиме головного мозга (ГМ) выделяя соответствующие цитокины: интерлекинов (ИЛ) -4, ИЛ-13, фактор некроза опухоли-α (ФНО-α), ИЛ-12, -6, -1β, NO, хемокинов CCL2, CXCL9, CXCL10 [4,5,6,7] для утилизации разрушенных элементов ткани и влияя на процессы нейродегенерации и восстановления тканей мозга. Безусловно, цитокины являются полезными при оценке хронического воспаления в организме, но они обладают крайне низкой специфичностью, что ограничивает их использование в качестве биомаркеров повреждения тканей ГМ.

Другими клетками, реагирующими на травму, являются клетки астроглии. Они принимают участие в астроглиозе - это способствует выживанию нейронов и обеспечению целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [6], но при этом становится препятствием для регенерации аксонов нейронов. Активированные клетки астроглии повышают экспрессию промежуточных филаментов, таких как глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) и виментин [7,8], которые необходимы для инициирования и поддержания реактивного астроглиоза [9].

Белок GFAP на данный момент является наиболее перспективным сывороточным биомаркером ЧМТ, по данным метаанализа его чувствительность составляет от 67% до 100% и специфичность - до 89% [10]. Реактивные астроциты способствуют воспалительной реакции при ЧМТ, секретируя цитокины, хемокины, оксид азота, молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (DAMPs) и матриксную металлопротеиназу 9 (MMP-9) [11]. Астроциты продуцируют S100β, который усиливает нейрогенез в гиппокампе и улучшает восстановление когнитивных функций после ЧМТ [10], но это касается его наномолярных концетраций, а микромолярные концентрации нейротоксичны. Данный белок обладает высокой чувствительностью к повреждению тканей ГМ и его уровни достаточно коррелируют со степенью тяжести, но он обладает низкой специфичностью, так как обнаруживается при патологических процессах других органов, что ограничивает его изолированное применение.

В развитии вторичных повреждений также участвуют нейроны, но в меньшей мере. Маркером разрушения этих клеток служат белковые компоненты, высвобождающиеся в межклеточное пространство. Повреждение аксонов нейронов сопровождается высвобождением легкого полипептида нейрофиламента (NfL) [12,13], этот белок выполняет структурную функцию, и он особенно чувствителен к механическим и метаболическим нарушениям. Другим маркером аксонального повреждения является повышение основного белка миелина (MBP), главного поверхностного антигена олигодендроцитов, этот белок редко обнаруживается в биологических жидкостях и чаще свидетельствует о тяжелой степени, что ограничивает его применение как потенциального маркера [14]. Тау-белок (англ. tubulin associated unit) представляет собой белок, который играет роль в развитии нейронов, стабилизации аксонов и полярности нейронов. По данным R. Rubenstein и др. при воспроизведении модели повторяющейся закрытой легкой черепно-мозговой травмы на мышах в коре ГМ общее количество тау-белка и фосфорилированного тау-белка увеличивалось в течение 1–10 дней и оставалось повышенным до 12 месяцев [15]. Было также показано, что уровни расщепленного тау-белка (C-tau) в сыворотке значительно выше при тяжелой ЧМТ по сравнению с контрольной группой [16]. Нейрон-специфическая энолаза (NSE) является гликолитическим ферментом цитоплазмы нейронов ГМ, нейроэндокринных клеток и периферической нервной ткани. По данным исследований повышение уровней NSE в сыворотке крови коррелирует со степенью тяжести травмы [17].

**Выводы**

Детальное изучение механизмов, принимающих участие в развитии травматической болезни головного мозга, является необходимым условием для формирования достоверных методов диагностики и предупреждения осложнений. По результатам проведенного анализа литературы можно выделить следующие потенциальные биомаркеры GFAP, белок S100β и NSE, но исследования показали, что использование каждого биомаркера в отдельности обладает недостаточной чувствительностью и специфичностью. Отсюда следует, что наиболее эффективной тактикой диагностики ЧМТ является использование широкой панели биологических маркеров, которые позволят оценивать степень тяжести повреждения ГМ и отслеживать развитие нейровоспаления в отдаленном периоде после травмы.

**Заключение**

Авторы считают, что данная работа представляет новый взгляд на диагностику ЧМТ и рассматривают возможность дальнейшего введения данных биомаркеров в клинические рекомендации, что позволит ускорить выявление ЧМТ и улучшить прогнозирование исходов у пациентов.

**Литература**

1. Maas A. I. R. et al. Traumatic brain injury: progress and challenges in prevention, clinical care, and research //The Lancet Neurology. 2022. V. 21. No. 11. P. 1004-1060.
2. Карчевская А. и др. Нейровоспаление как процесс вторичного повреждения при черепно-мозговой травме // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2023. Т. 17. №. 1. С. 55-68.
3. Devanney N. A., Stewart A. N., Gensel J. C. Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease: The role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma //Experimental neurology. 2020. V. 329. P. 113310.
4. Jiang Q. et al. Phillyrin prevents neuroinflammation-induced blood–brain barrier damage following traumatic brain injury via altering microglial polarization //Frontiers in pharmacology. 2021. V. 12. P. 719823.
5. Li Y. F. et al. Microglial polarization in TBI: Signaling pathways and influencing pharmaceuticals //Frontiers in Aging Neuroscience. 2022. V. 14. P. 901117.
6. Sofroniew M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation //Nature Reviews Neuroscience. 2015. V. 16. No. 5. P. 249-263.
7. Karve I. P., Taylor J. M., Crack P. J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury //British journal of pharmacology. 2016. V. 173. No. 4. P. 692-702.
8. Michinaga S., Koyama Y. Pathophysiological responses and roles of astrocytes in traumatic brain injury //International journal of molecular sciences. 2021. V. 22. No. 12. P. 6418.
9. Liu Z. et al. Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke //Glia. 2014. V. 62. No. 12. P. 2022-2033.
10. Mondello S. et al. Blood-based protein biomarkers for the management of traumatic brain injuries in adults presenting to emergency departments with mild brain injury: a living systematic review and meta-analysis //Journal of neurotrauma. 2021. V. 38. No. 8. P. 1086-1106.
11. Michinaga S., Koyama Y. Pathophysiological responses and roles of astrocytes in traumatic brain injury //International journal of molecular sciences. 2021. V. 22. No. 12. P. 6418.
12. Shahim P. et al. Time course and diagnostic utility of NfL, tau, GFAP, and UCH-L1 in subacute and chronic TBI. Neurology. 2020. V. 95. No. 6. P. e623–36.

13. Guedes V.A. et al. Exosomal neurofilament light: A prognostic bio- marker for remote symptoms after mild traumatic brain injury //Neurology. 2020. V 94. No.23. P. e2412–23.
14. Su E. et al. Increased CSF concentrations of myelin basic protein after TBI in infants and children: absence of significant effect of therapeutic hypothermia //Neurocritical care. 2012. V. 17. P. 401-407.
15. Rubenstein R. et al. Novel mouse tauopathy model for repetitive mild traumatic brain injury: evaluation of long-term effects on cognition and biomarker levels after therapeutic inhibition of tau phosphorylation //Frontiers in neurology. 2019. V. 10. P. 124.
16. Pandey S. et al. A prospective pilot study on serum cleaved tau protein as a neurological marker in severe traumatic brain injury // British journal of neurosurgery. 2017. V. 31. No.3. P. 356–63.
17. Park S. H., Hwang S. K. Prognostic value of serum levels of S100 calcium-binding protein B, neuron-specific enolase, and interleukin-6 in pediatric patients with traumatic brain injury //World neurosurgery. 2018. V. 118. P. e534-e542.

**Сведения об авторах**

***Прохорычева Анна Алексеевна**, аспирант, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия. Эл. почта: a.prokhorycheva@gmail.com*

***Завалева Елена Валентиновна,** к.м.н, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия, Эл. почта: Zavaleva_EV@nrcki.ru*

***Будько Александр Игоревич**, аспирант, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия.Эл. почта: Budko_AI@nrcki.ru*

***Трашков Александр Петрович**, к. м. н., заместитель руководителя ККНБИКС-пт по научной работе, НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия. Эл. почта: Trashkov_AP@nrcki.ru*

**Information about author**

***Prokhorycheva Anna A.**, PhD student National Research Center «Kurchatov Institute» Moscow, Russian Federation. E-mail: a.prokhorycheva@gmail.com*

***Zavaleva Elena Valentinovna,** Ph.D., National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia, El. mail: Zavaleva_EV@nrcki.ru*

***Budko Alexander Igorevich** PhD student National Research Center «Kurchatov Institute» Moscow, Russian Federation*
*E-mail: Budko_AI@nrcki.ru*

***Trashkov Alexander P.**, PhD Doctor of (Med.) Sciences. Deputy Head KC NBICS -nature-like technologies for scientific work, National Research Center «Kurchatov Institute» Moscow, Russian Federation. E-mail: Trashkov_AP@nrcki.ru*

УДК 612.118.221.2:616.071
ГРНТИ 760 000
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.187-192

**И.А. Куликова[1], Т.И. Мурашкина[2], Е.А. Бадеева[2], И.Л. Чередник[1], И.И. Павлюченко[1], Ю.А. Васильев[1], Т. В. Истомина[3], Е.Ю. Плотникова*, Ю.Ю.Васильев*, М.С. Теренина[1]**

[1]Кубанский государственный медицинский университет,
[2]Пензенский государственный университет,
[3] НИУ «МЭИ»
*ГБУЗ Роддом г. Краснодар МЗ КК

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ КРОВИ

*В статье разобран маршрут определения групп крови начиная от извлечения источников для изготовления стандартных изогемагглютинирующих сывороток, эритроцитов и моноклональных антител (цоликлонов анти – А и анти - В) до получения заключения о групповой принадлежности крови реципиента или донора. Рассматривается возможность внедрения в практику инновационного метода определения групповой*

*принадлежности крови.*

***Ключевые слова:*** *группа крови, коэффициент преломления, волоконно – оптический рефрактометрический измерительный преобразователь*

УДК612.118.221.2:616.071
ГРНТИ 760 000

**I.A. Kulikova[1], T.I. Murashkina[2], E.A. Badeeva[2], I.L. Cherednik[1], I.I. Pavlyuchenko[1], Yu.A. Vasiliev[1], T. V. Istomina[3], E.Y.Plotnikova*, Yu.Yu. Vasiliev*M.S. Terenina[1]**

[1]Kuban State Medical University, Krasnodar
[2]Penza State University, Penza
[3]NRU "MEI"
*GBUZ Maternity Hospital Krasnodar MZ KK, Krasnodar

## AN ALTERNATIVE APPROACH TO DETERMINING BLOOD GROUP AFFILIATION

*The article examines the route for determining blood groups, starting from the extraction of sources for the manufacture of standard isohemagglutinating serums, erythrocytes and monoclonal antibodies (anti –A and anti-B coliclones) to obtaining a conclusion on the group affiliation of the recipient's or donor's blood. The possibility of introducing an innovative method for determining blood group affiliation into practice is being considered.*

***Keywords****: blood type, refractive index, fiber – optic refractometric measuring transducer*

**Введение.**

В основе группой несовместимости крови реципиента и донора лежит гемолиз агглютинированных эритроцитов реципиента под влиянием их физической деформации, активации системы комплимента или поглощения фагоцитирующими клетками миелобластного ряда, в особенности, лейкоцитами, вследствие закупорки ими мелких кровеносных сосудов при образовании агглютинационных пар. Исходя из этого, на данный момент времени определение групповой принадлежности крови базируется на реакции агглютинации – склеивании эритроцитов при взаимодействии одноименных агглютиногенов (А, В), находящихся на мембране эритроцитов, и агглютининов (α, β) плазмы крови с образованием конгломератов – выше упомянутых агглютинационных пар [1]. Кровь доноров и реципиентов в норме подразделяют на четыре основные группы по системе АВ0 в зависимости от наличия или отсутствия антигенов А и В. Прежде чем осуществлять переливание, необходимо определить группу крови реципиента и группу крови донора для оценки их совместимости и, тем самым, исключения возможности агглютинации [2]. Но является ли конечной точной прогресса подход, используемый для поставленной цели на данный момент времени?

**Цель работы.**

Изложение необходимости в альтернативном подходе к определению групп крови реципиента и донора. Авторы считают актуальным разработку портативного волоконно – оптического рефрактометрического измерительного преобразователя для определения групп крови, рассматривают возможность внедрения прибора в практику.

**Материалы и методы.**

Теоретическая основа статьи базируется на Приказах министерства здравоохранения РФ по порядку проведения проб на индивидуальную совместимость, инструкции изготовления стандартных изогемагглютинирующих сывороток для определения групп крови системы АВ0. Практическая часть статьи опирается на собственные исследования преломляющей способности различных сред волоконно- оптическим способом.

**Полученные результаты.**

На данный момент установление групповой принадлежности крови происходит по трём основным методикам:

1. с применением стандартных изогемагглютинирующих сывороток (прямой способ);

2. с применением стандартных изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов (перекрёстный способ);

3. с применением моноклональных антител (цоликлонов анти – А и анти - В).

Рассмотрим первый способ определения групп крови с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток. При этом способе в крови устанавливают наличие или отсутствие агглютиногенов и, исходя из этого, делают заключение о групповой принадлежности исследуемой крови. Путь стандартной изогемагглютинирующей сыворотки от получения источников для её приготовления до её непосредственного применения затрагивает значительное количество инстанций и, соответственно, характеризуется немалой длительностью, расходом сырья и, как следствие, требует соответствующей оснащённости материально – технической базы для её производства. Стандартные изогемагглютинирующие сыворотки представляет собой плазму крови, приготовленную из крови людей и некоторых других жидкостей, лишённых фибриногена, но содержащих все остальные белки, в том числе и соответствующие агглютинины. В качестве субстрата для получения стандартной изогемагглютинирующей сыворотки может использоваться неконсервированная донорская кровь, плазма, плевральный транссудат, асцитическая жидкость при условии содержания в данных материалах достаточного для изготовления сывороток титра групповых антител. После отделения плазмы через процедуру плазмафереза крови от предварительно обследованного донора и постановки всех необходимых серологических проб на пригодность плазмы для изготовления из нее стандартной изогемагглютинирующей сыворотки выдаётся предварительное заключение о её пригодности с учётом скорости наступления агглютинации и титра агглютининов. Перед последующими контролями качества продукта сыворотка консервируется на срок 10-12 дней пригодными для неё консервантами, одни из которых борная кислота из расчета 2-3 г на 100 мл сыворотки или азид натрия 1 г на 1 мл. После производится первый контроль сыворотки, а ещё через 10-12 дней второй контроль сыворотки до розлива. Только после этого осуществляется фильтрование и окрашивание сыворотки с окончательным заключением о пригодности, розливе и паспортизации. Для окрашивания стандартных изогемагглютинирующих сывороток используется чётко регламентированный перечень красителей. Стандартная изогемагглютинирующая сыворотка пригодна к применению лишь в течение 6 месяцев при хранении в холодильнике с температурой 4-8 градусов. Таким образом, к стандартной изогемагглютинирующей сыворотке предъявляется множество требований, начиная от физико-химических свойств, заканчивая условиями хранения, а также её использования. Сыворотка считается пригодной к использованию, когда: её групповой и титровальный состав полностью соответствует указанному на этикетке; первые признаки агглютинации появляются в течение первых 30 секунд; состав не оказывает на эритроциты гемолизирующего действия; соблюдается её прозрачность, законсервированность, окрашенность в светло-голубой, красный, желтый цвета в зависимости от группы. Температура окружающего воздуха во время определения группы крови должна придерживаться в пределах 15-25°С. Время ожидания окончательных результатов – 5 минут [3].

При определении группы крови по второму (перекрёстному) способу с помощью стандартных изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов используются одновременно соответственно стандартные сыворотки и стандартные эритроциты. При этом способе так же, как и при первом, определяют наличие или отсутствие агглютиногенов и, кроме того, при помощи стандартных эритроцитов устанавливают наличие или отсутствие групповых агглютининов. Стандартные эритроциты приготавливают из крови доноров с заранее известной группой крови, хранят при 4-8°С. Срок их годности составляет только 2-3 дня. Кровь для исследования берут из вены в сухую пробирку, центрифугируют или оставляют в покое на 20-30 минут для разделения на сыворотку и эритроциты, что может быть не всегда осуществимо вследствие затрудняющих проведение реакции условий внешней среды или ограниченного времени на выдачу заключения

по групповой принадлежности донора или реципиента. Технология проведения данной пробы в разы сложнее, требует больших материально-технических затрат, усугубляется малым сроком годности стандартных эритроцитов и узким температурным диапазоном для их хранения [3].

Существует ещё один способ, несколько отличающийся от первого и второго, при котором антигены А и В определяют с помощью цоликлонов анти-А и анти-В. Цоликлоны анти-А и анти-В являются продуктом гибридомных клеточных линий, полученных в результате слияния мышиных антителообразующих В-лимфоцитов с клетками мышиной миеломы. В качестве консерванта для цоликлонов применяется азид натрия в конечной концентрации 0,1%. Срок годности цоликлонов также, как стандартных изогемагглютинирующих сывороток и стандартных эритроцитов ограничен и составляет два года при температуре хранения 2-8 °С. Вскрытый флакон можно хранить при температуре 2-8 °С в закрытом виде в течение одного месяца. Время ожидания результатов при проведении пробы с использованием цоликлонов анти-А и анти-В – 3 минуты [3].

Наш научный коллектив считает возможным разработку для определения групп крови портативного волоконно-оптического рефрактометрического измерительного преобразователя, принцип работы которого базируется на волоконно-оптическом способе определения коэффициента преломления исследуемой крови реципиента или донора. При производстве портативного волоконно-оптического рефрактометрического измерительного преобразователя в качестве ресурсов не используются субстраты человеческого или животного происхождения, срок годности ограничивается износом деталей и самого прибора, что оказывается значительно выше, чем у вышеупомянутых реагентов.

**Выводы.**

Существует ряд ошибок при определении групп крови. Ошибки, касающиеся несоблюдения температурного режима, заключаются в том, что при температуре в помещении ниже 15-17°С может произойти ложная (холодовая) агглютинация, возникающая через 5-15 мин после смешивания крови с сывороткой, хлопья эритроцитов при холодовой агглютинации не такие стойкие и могут исчезнуть при добавлении капли теплого физиологического раствора. При высокой же температуры окружающей среды (28° С и выше) реакция агглютинации начинается поздно или слабо выражена, вследствие чего может остаться незамеченной. Важно соблюдать правильные пропорции цоликлонов, сывороток и крови, для верного результата капля сыворотки или цоликлона должна быть в 5-10 раз больше капли крови, в противном случае агглютининов может не хватить для полноценного связывания агглютиногенов крови и реакции не произойдёт. Результаты могут оказаться неверными при истечении срока годности сывороток, эритроцитов или цоликлонов или неправильном их хранении. Необходимо помнить, что срок формирования агглютиногенов А и В в эритроцитах плода составляет 2-3 месяца, агглютинины α и β в плазме крови ребенка формируются после рождения. Ошибочный порядок расположения стандартных сывороток или эритроцитов в штативах, ошибочный порядок нанесения их на пластинку, загрязнение или применение мокрых пипеток, пластинок, палочек, а также использование недоброкачественных стандартов, например, загрязненной или частично высохшей сыворотки, которая может вызвать неспецифическую реакцию агглютинации также могут привести к ложным результатам исследования. Отступление от изложенных правил может привести к ошибочным заключениям о групповой принадлежности исследуемой крови.

Техническим результатом разрабатываемого научно-исследовательским коллективом изобретения является высокая точность измерения показателя преломления исследуемой жидкости; относительная простота конструкции (в которой отсутствует сложная оптическая система и сложные процедуры юстировки); существенное снижение массогабаритных характеристик измерительного преобразователя.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: на данном этапе процесс определения группы крови начиная от извлечения источников для изготовления стандартных изогемагглютинирующих сывороток, эритроцитов и моноклональных антител (цоликлонов анти – А и анти – В) до получения заключения о групповой принадлежности крови реципиента или донора представляет из себя сложную процедуру, затрагивающую значительное количество инстанций с последовательным применением всевозможных трудоёмких и затратных технологий, соответственно, характеризующуюся немалой длительностью, расходом сырья и, как следствие, требует адекватной оснащённости материально-технической базы.

Предлагаемое нами устройство портативного волоконно-оптического рефрактометрического измерительного преобразователя, в своём функционировании не имеет тесной привязанности к определённым узким диапазонам абиотических факторов окружающей среды: температурного режима, влажности, давления, осадков, движения воздушных масс. Хранения в местностях, отдалённых от привычных нам условий, предоставляемых современной цивилизацией, не зависит от использования холодильных установок и прочих поддерживающих подходящие условия содержания аппаратуры, что может быть особо актуально в настоящее время [4].

**Литература.**

1. Медицинская физиология по Гайтону и Холлу / Дж.Э. Холл / Пер. с англ.; Под ред. В.И. Кобрина, М.М. Галагудзы, А.Е. Умрюхина. 2-е изд., испр. и доп. — М.: Логосфера, 2018. — 1328 с. : ил. : 21,6 см. ISBN 978-5-98657-060-0.
2. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 октября 2020 г. N 1134н "Об утверждении порядка медицинского обследования реципиента, проведения проб на индивидуальную совместимость, включая биологическую пробу, при трансфузии донорской крови и (или) ее компонентов".
3. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 января 1998 г. № 2 "Об утверждении инструкций по иммуносерологии".
4. Патент № 2796797 C2 Российская Федерация, МПК G01N 21/43, G01B 11/00. Волоконно-оптический способ определения коэффициента преломления прозрачного вещества и реализующий его волоконно-оптический рефрактометрический измерительный преобразователь: № 2021130405: заявл. 18.10.2021: опубл. 29.05.2023 / Е. А. Бадеева, В. А. Бадеев, Т. И. Мурашкина [и др.]. – EDN QKJYBW.

**Сведения об авторах**

***Куликова Ирина Александровна***
*студентка лечебного факультета*
*Кубанский государственный медицинский университет Краснодар, Россия*
*Эл. почта: dockulikowa@yandex.ru*

***Мурашкина Татьяна Ивановна***
*д.т.н., профессор, профессор кафедры «Приборостроение»*
*Пензенский государственный университет*
*Пенза, Россия*
*Эл. почта: timurashkina@mail.ru*

***Бадеева Елена Александровна***
*д.т.н., доцент, профессор кафедры «Радиотехника и радиоэлектронные системы»*
*Пензенский государственный университет*
*Пенза, Россия*
*Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru*

**Information about author**

***Kulikova Irina Aleksandrovna***
*student of the Faculty of Medicine Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: dockulikowa@yandex.ru*

***Murashkina Tatiana Ivanovna***
*Doctor of Technical Sciences, Professor, Professor of the Department of "Instrument Engineering"*
*Penza State University*
*Penza, Russia*
*E-mail: timurashkina@mail.ru*

***Badeeva Elena Aleksandrovna***
*Doctor of Technical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Radio Engineering and Radio Electronic Systems*
*Penza State University*
*Penza, Russia*
*E-mail: badeeva_elena@mail.ru*

***Чередник Ирина Леонидовна***
*д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной физиологии*
*Кубанский государственный медицинский университет Краснодар, Россия*
*Эл. почта: CherednikIL@ksma.ru*
***Павлюченко Иван Иванович***
*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, декан лечебного факультета*
*Кубанский государственный медицинский университет Краснодар, Россия*
*Эл. почта: Pavluchenkoii@ksma.ru*
***Васильев Юрий Анатольевич***
*ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины*
*Кубанский государственный медицинский университет Краснодар, Россия*
*Эл. почта: yurii-59@mail.ru*
***Истомина Татьяна Викторовна***
*д.т.н., профессор кафедры Основ радиотехники НИУ «МЭИ», 89032281613.*
*E-mail:* ***istom@mail.ru***
***Плотникова Екатерина Юрьевна***
врач-неонатолог
ГБУЗ Роддом г. Краснодар МЗ КК, Краснодар, Россия
***E-mail: cat.roll@yandex.ru***
***Теренина Мария Сергеевна***
преподаватель кафедры нормальная физиология
Кубанский государственный медицинский университет
Краснодар, Россия
***Эл. почта: mari_terenina@inbox.ru***

***Cherednik Irina Leonidovna***
*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Normal Physiology*
*Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: CherednikIL@ksma.ru*
***Pavlyuchenko Ivan Ivanovich***
*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department, Dean of the Faculty of Medicine*
*Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: Pavluchenkoii@ksma.ru*
***Vasiliev Yuri Anatolyevich***
*Assistant of the Department of Public Health, Healthcare and History of Medicine*
*Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: yurii-59@mail.ru*
***Istomina Tatyana Viktorovna***
*Doctor of Technical Sciences,*
*Professor of the Department of Fundamentals of Radio Engineering, NRU "MEI"*
*89032281613, E-mail:* ***istom@mail.ru***
***Plotnikova Ekaterina Yurievna***
neonatologist
GBUZ Maternity Hospital Krasnodar MZ KK, Krasnodar, Russia
***E-mail: cat.roll@yandex.ru***
***Terenina Maria Sergeevna***
Teacher of the Department of Normal Physiology
Kuban State Medical University
Krasnodar, Russia
***E-mail: mari_terenina@inbox.ru***

УДК 616-079.3
ГРНТИ 76.13.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.192-195

**И.А. Куликова[1], Т.И. Мурашкина[2], Е.А. Бадеева[2], И.Л. Чередник[1], И.И. Павлюченко[1], Ю.А. Васильев[1], М.С. Теренина[1] Е.Ю. Плотникова[3], Васильев Ю.Ю.[3]**
[1]Кубанский государственный медицинский университет,
[2]Пензенский государственный университет,
[3]ГБУЗ Роддом г. Краснодар МЗ КК,

## ПУПОВИНА – ОБЪЕКТ ДИАГНОСТИКИ

*Обоснована необходимость повышения точности и надежности оценки физических параметров плода во время родов путём перехода к объективным показателям в обозначенной области. Объективные показатели позволяют собирать и анализировать большие объемы данных, делая возможным выявление скрытых тенденций и шаблонов, которые могут быть пропущены при субъективных оценках. Улучшенная точность диагностики и снижение погрешностей позволит обеспечить раннее выявление отклонений и принятие своевременных мер для снижения рисков неблагоприятных исходов у плода и новорожденного.*

***Ключевые слова:*** *давление, скорость кровотока, гипоксия, датчик, волоконно–оптический рефрактометрический измерительный преобразователь*

UDC 618.38:616-079.4
GRNTI 760 000

**I.A. Kulikova[1], T.I. Murashkina[2], E.A. Badeeva[2], I.L. Cherednik[1], I.I. Pavlyuchenko[1], Yu.A. Vasiliev[1], M S.Terenina[1], Yu.Yu.Vasiliev[3] E.Y. Plotnikova[3]**
[1]Kuban State Medical University, Krasnodar
[2]Penza State University, Penza
[3]GBUZ Maternity Hospital Krasnodar MZ KK, Krasnodar

## THE UMBILICAL CORD IS THE OBJECT OF DIAGNOSIS

*The necessity of improving the accuracy and reliability of the assessment of the physical parameters of the fetus during childbirth by switching to objective indicators in the designated area is substantiated. Objective indicators allow you to collect and analyze large amounts of data, making it possible to identify hidden trends and patterns that may be missed in subjective assessments. Improved diagnostic accuracy and reduced errors will ensure early detection of abnormalities and timely measures to reduce the risks of adverse outcomes in the fetus and newborn.*

***Keywords**: pressure, blood flow rate, hypoxia, sensor, fiber optic refractometric measuring transducer*

**Введение**

Среди важнейших этиологических факторов, играющих ключевую патогенетическую роль в развитии заболеваемости и смертности детей неонатального возраста, лидируют гипоксически – ишемические повреждения мозга плода [1]. По этой причине крайне важна своевременная, объективная и точная диагностика состояний, возникших вследствие кислородного голодания головного мозга плода, что позволит обеспечить раннее выявление отклонений и принятие своевременных мер по нивелированию роли данных состояний в развитии возможных неблагоприятных исходов у плода и новорожденного.

Объективные показатели, на основании оценки физических показателей состояния плода и новорожденного по новым современным методикам, позволяют собирать и анализировать большие объемы данных, делая возможным выявление скрытых тенденций и шаблонов, которые могут быть пропущены при субъективных оценках. Улучшенная точность диагностики и снижение погрешностей позволит обеспечить раннее выявление отклонений и принятие своевременных мер для снижения рисков неблагоприятных исходов у плода и новорожденного.

**Цель работы -** обоснование необходимости повышения точности и надежности оценки физических параметров плода во время родов путём перехода к объективным показателям.

**Материалы и методы**

В качестве теоретической базы использовались данные из различных источников литературы, найденных в базах данных CyberLeninka, E-library, MEDLINE/PubMed по ключевым словам: "давление", "гипоксия", "датчик", "скорость кровотока". Были выбраны те работы, которые содержали информацию о связи между гипоксией и чувствительностью к ней различных диагностических методов. Также исследователи обратили внимание на влияние скорости кровотока на развитие гипоксических состояний и их диагностику. Практическая часть статьи опирается на собственные исследования в области измерения давления различных сред и структур волоконно-оптическим способом.

**Полученные результаты**

На данный момент один из распространённых методов диагностики причин гипоксически-ишемических состояний головного мозга плода направлен на исследование кровообращения в сосудах пуповины и матки и основывается на ультразвуковом исследовании, отличающимся от обычного тем, что создание двухмерного цветного изображения происходит за счёт обработки аппаратом ультразвуковых волн, отражённых от передвигающихся объектов, в данном случае – элементов кровеносного русла, а не от

неподвижных тканей, что приводит к значительному изменению частоты отражённых лучей. Метод позволяет специалистам оценить скорость и направление кровотока в исследуемых сосудах, их проходимость и состояние сосудистого русла в целом, выявить наличие, блокирующих кровоток плода, отклонений, непосредственно зависящих от эффективности работы плаценты, состояния и работы кровеносной системы женщины в период беременности [2]. Окончательное формирование плаценты происходит, начиная с 20-й недели беременности, соответственно, проведение допплерометрического исследование раньше этого срока нецелесообразно и не может выступать в роли диагностического критерия в следствие вариабельности получаемых значений, а наиболее информативным исследование является в период интенсивного роста плода, который происходит с 27-й по 34-ю неделю беременности. Оценка результатов обследования при проведении допплерометрии происходит с помощью анализа следующих показателей: систолодиастолическое отношение (СДО), индекс резистентности (ИР), пульсационный индекс (ПИ). Систолодиастолическое отношение – отношение максимальной и минимальной скорости кровотока артерии пуповины. Индекс резистентности – отношение разности между максимальной (систолической) и минимальной (диастолической) скоростями кровотока и максимального ее значения. Пульсационный индекс – отношение разницы между максимальной (систолической) и минимальной (диастолической) скоростями кровотока по данному сосуду к средней величине скорости кровотока по сосуду в систолу и диастолу. Полученные показатели перечисленных отношений и индексов сравниваются с референтными значениями относительной нормы, и на основе полученных отклонений от стандартных значений известных признаков происходит оценка состояния кровообращения плода [2].

**Выводы**

Научный коллектив считает возможным и целесообразным измерение максимальных (систолических) и минимальных (диастолических) показателей давления крови на стенку артерии пуповины на момент рождения до и после пересечения пуповины, т.к. в норме, после рождения ребёнка кровоток по сосудам пуповины сохраняется в течение 5-20 минут. Сразу после рождения ребёнка пуповина пересекается между зажимами, а кровь из пупочной вены используется только лишь для определения группы крови и резус-фактора новорождённого. Перевод полученных в ходе измерения значений в показатели систолодиастолического отношения, индекса резистентности и пульсационного индекса удобно тем, что вне зависимости от взаиморасположения деталей датчика нивелируется давление самой пуповины на датчик, т.к. вес пуповины не учитывается, а учитывается лишь разность или отношение максимальной (систолической) и минимальной (диастолической) скорости кровотока.

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

- впервые предложено измерять максимальную (систолическую) и минимальную (диастолическую) скорости кровотока посредством измерения давления на стенку пуповинной артерии волоконно-оптическим способом [3];
- на основе полученных при измерениях значений давления на стенку пуповинной артерии до и после пересечения пуповины можно диагностировать степень отделения плаценты в третьем периоде родов, что может помочь в принятии решения о дальнейшей тактике действия, возможного применения ручного отделения последа.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ураков, А. Л. Инфракрасная термометрия предлежащей части головы плода в потужном периоде родов как метод диагностики гипоксически-ишемических повреждениий головного мозга / А. Л. Ураков, Н. А. Уракова // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 6. – С. 168. – EDN TODMOR.
2. Значение оценки состояния плода в конце беременности с использованием

компьютерной кардиотокографии и ультразвуковой допплерометрии / Ш. Б. Баранов, Л. Б. Брагина, О. В. Лобанова, Д. В. Сидякина // Вестник Ивановской медицинской академии. – 2007. – Т. 12, № 3-4. – С. 143-144. – EDN KWFGBP.

3. Патент № 2741274 C1 Российская Федерация, МПК G01L 13/00, A61C 19/04. Волоконно-оптический датчик силы мышц языка – давления языка на небо и способ его сборки : № 2020111257 : заявл. 19.11.2019 : опубл. 22.01.2021 / Е. А. Бадеева, Т. И. Мурашкина, Ю. А. Васильев [и др.]. – EDN YORYZY.

**Сведения об авторах**

***Куликова Ирина Александровна***
*студентка лечебного факультета*
*Кубанский государственный медицинский университет*
*Краснодар, Россия,Эл. почта: dockulikowa@yandex.ru*

***Мурашкина Татьяна Ивановна***
*д.т.н., профессор, профессор кафедры «Приборостроение»*
*Пензенский государственный университет*
*Пенза, Россия*
*Эл. почта: timurashkina@mail.ru*

***Бадеева Елена Александровна***
*д.т.н., доцент, профессор кафедры «Радиотехника и радиоэлектронные системы»*
*Пензенский государственный университет*
*Пенза, Россия*
*Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru*

***Чередник Ирина Леонидовна***
*д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной физиологии*
*Кубанский государственный медицинский университет*
*Краснодар, Россия*
*Эл. почта: ilch2009@rambler.ru*

***Павлюченко Иван Иванович***
*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, декан лечебного факультета*
*Кубанский государственный медицинский университет*
*Краснодар, Россия,Эл. почта: Pavluchenkoii@ksma.ru*

***Васильев Юрий Анатольевич***
*ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины*
*Кубанский государственный медицинский университет,Краснодар, Россия*
*Эл. почта: yurii-59@mail.ru*

***Теренина Мария Сергеевна***
*преподаватель кафедры нормальная физиология, Кубанский государственный медицинский Университет Краснодар, Россия* Эл. почта: mari_terenina@inbox.ru

***Плотникова Екатерина Юрьевна***
*врач-неонатолог*
*ГБУЗ Роддом г. Краснодар МЗ КК, Краснодар, Россия*
*E-mail: cat.roll@yandex.ru*

***Васильев Юрий Юрьевич***
*врач-анестезиолог*
*ГБУЗ Роддом г. Краснодар МЗ КК, Краснодар, Россия,Эл. почта:* vasilevyura@mail.ru

**Information about author**

***Kulikova Irina Aleksandrovna***
*student of the Faculty of Medicine Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: dockulikowa@yandex.ru*

***Murashkina Tatiana Ivanovna***
*Doctor of Technical Sciences, Professor, Professor of the Department of "Instrument Engineering"*
*Penza State University*
*Penza, Russia*
*E-mail: timurashkina@mail.ru*

***Badeeva Elena Aleksandrovna***
*Doctor of Technical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Radio Engineering and Radio Electronic Systems*
*Penza State University*
*Penza, Russia,E-mail: badeeva_elena@mail.ru*

***Cherednik Irina Leonidovna***
*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Normal Physiology*
*Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: ilch2009@rambler.ru*

***Pavlyuchenko Ivan Ivanovich***
*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department, Dean of the Faculty of Medicine*
*Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: Pavluchenkoii@ksma.ru*

***Vasiliev Yuri Anatolyevich***
*Assistant of the Department of Public Health, Healthcare and History of Medicine*
*Kuban State Medical University*
*Krasnodar, Russia*
*E-mail: yurii-59@mail.ru*

***Terenina Maria Sergeevna***
Teacher of the Department of Normal Physiology
Kuban State Medical University
Krasnodar, Russia, E-mail: mari_terenina@inbox.ru

***Plotnikova Ekaterina Yurievna***
*neonatologist*
*GBUZ Maternity Hospital Krasnodar MZ KK, Krasnodar, Russia*
*E-mail: cat.roll@yandex.ru*

***Vasiliev Yuri Yurievich***
*Anesthesiologist*
*GBUZ Maternity Hospital Krasnodar MZ KK, Krasnodar, Russia,E-mail: vasilevyura@mail.ru*

УДК 57.577
ГРНТИ 34.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.196-199

**Вершинина Е.А., Маряшкина Т.В., Казаков А.А., Демкин В.В.**
НИЦ «Курчатовский институт»
ООО «НаноДиагностика»

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ *LACTOBACILLUS MULIERIS* В ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЕ ЖЕНЩИН

*Впервые проведена оценка распространенности нового вида лактобактерий L. mulieris в вагинальной микробиоте женщин с использованием инновационной мультиплексной ПЦР-тест-системы для выявления и дифференциальной идентификации двух видов лактобактерий - L. jensenii и L. mulieris.*
***Ключевые слова:*** *лактобактерии, L. mulieris, L. jensenii, вагинальная микробиота, биоразнообразие, ПЦР*

**Vershinina E.A., Maryashkina T.V., Kazakov A.A., Demkin V.V.**
National Research Center «Kurchatov Institute»
Nanodiagnostics LLC

# IDENTIFICATION OF *LACTOBACILLUS MULIERIS* IN FEMALE VAGINAL MICROBIOTA

*For the first time, the prevalence of a new species of lactobacilli L. mulieris was assessed in the vaginal microbiota of women using an innovative multiplex PCR test system for the detection and differential identification of two species of lactobacilli - L. jensenii and L. mulieris.*
***Keywords:*** *lactobacteria, L. mulieris, L. jensenii, vaginal microbiota, biodiversity, PCR*

**Введение.**

В норме урогенитальная микробиота женщины характеризуется преобладанием видов *Lactobacillus* [1, 2,]. Считается, что лактобактерии защищают экосистему своего обитания, задействуя несколько механизмов: конкурентное устранение патогенных микроорганизмов, модуляцию иммунного ответа хозяина, выработку антибактериальных соединений, таких как молочная кислота, перекись водорода и бактериоцины, тем самым снижая риск развития инфекций, передаваемых половым путем, и развития бактериального вагиноза [3, 4]. Самыми распространенными видами лактобактерий в вагинальной и мочевой микробиотах являются виды *L. crispatus, L. iners, L. gasseri, L. jensenii* [1, 2,]. Индивидуальная роль разных видов лактобактерий в поддержании здоровья урогенитальной системы женщины и особенности их распространения в человеческой популяции остаются неясными и продолжают быть предметом исследования. Недавно группу урогенитальных лактобактерий пополнил еще один вид. В образце мочи был иденгтифицирован новый вид *Lactobacillus,* получивший название *L. mulieris* [5]. Штаммы *L. mulieris* генетически близки виду *L. jensenii* и их обнаружение преимущественно связано с мочевыводящими путями женщины. Последующий анализ показал, что часть штаммов, первоначально квалифицированных как *L. jensenii*, должны быть отнесены к виду *L. mulieris* [5]. В связи с этим возникает необходимость в дифференциальной переоценке распространенности *L. jensenii* и *L. mulieris* в вагинальной микробиоте женщин с учетом изменения в таксономической классификации лактобактерий. Исследования, направленные на переоценку распространенности *L. mulieris* и *L. jensenii* в вагинальных микробиотах женщин, к настоящему времени неизвестны.

**Цель работы.**

Цель данного исследования состояла в предварительной оценке распространенности нового вида лактобактерий *L. mulieris* в вагинальных мазках женщин с использованием инновационной мультиплексной ПЦР-тест-системы, способной дифференциально идентифицировать два вида лактобактерий - *L. jensenii* и *L. mulieris*.

**Материалы и методы.**

В работе использовали вагинальные мазки, взятые от пациенток с бактериальным

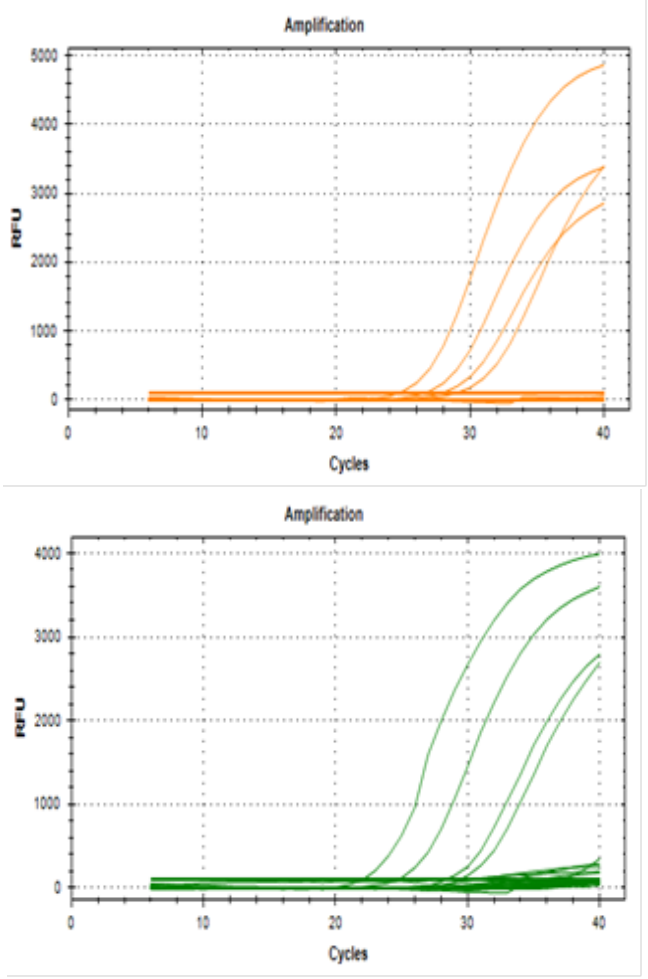
вагинозом (27 образцов), от клинически здоровых женщин (10 образцов), архивные «слепые» урогенитальные мазки, поступившие в лабораторию ООО «НаноДиагностика» для проведения ПЦР-диагностических исследований по различным показаниям (44 образца).

Выделение ДНК из клинического материала проводили с использованием набора «ЭкспрессДНК» («Нанодиагностика»). Анализ образцов методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием двух тест-систем: «Лактоиндекс» и система для определения и типирования *L. jensenii* и *L. mulieris* («Нанодиагностика»). Система «Лактоиндекс» позволяет в мультиплексном формате определять общее содержание бактерий, общее содержание лактобактерий, и на этом основании рассчитывать относительной содержание лактобактерий. Система для мультиплексного определения ДНК *L. jensenii* и *L. mulieris* обеспечивает специфичное определение бактерий в соответствии со своим названием. В качестве положительных контролей использовали синтетические однонитевые ДНК, воспроизводящие последовательности специфических ампликонов. ПЦР проводили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США).

**Полученные результаты.**

Первоначально клинические образцы тестировали на наличие лактобактериальной ДНК с помощью системы «Лактоиндекс». Положительные на этом этапе пробы были затем проанализированы с использованием системы, типирующей *L. jensenii* и *L. mulieris.* Образцы ПЦР- флуорограмм положительных проб представлены на рисунке 1.

***Рисунок 1. Кривые амплификации образцов, положительных на ДНК L. mulieris (слева) и L. jensenii (справа)***




В общей сложности были проанализированы 81 образец, которые включали в себя пробы от пациенток с бактериальным вагинозом, от клинически здоровых женщин, и архивные образцы от женщин, по различным причинам проходившим ПЦР-диагностику урогенитальных органов. Во всех категориях образцов были обнаружены и *L. jensenii,* и

*L. mulieris.* Положительными одновременно на оба вида лактобактерий образцов не было. Соотношение *L. jensenii,* и *L. mulieris* было приблизительно одинаковым во всех выборках образцов и колебалось от 14 до 40% в зависимости от выборки. Более детальные статистические выкладки на текущем этапе делать нецелесообразно ввиду малочисленности выборок и разного их качества: свежевыделенные и архивные препараты ДНК. Количественное содержание *L. jensenii,* и *L. mulieris* значительно варьировало в пределах от 20 до 35 порогового цикла амплификации.

**Выводы.**

Разработанная система мультиплексного определения и типирования вагинальных лактобактерий *L. mulieris и L. jensenii* эффективно выявляет данные микроорганизмы в клиническом материале (вагинальных мазках). Полученные нами данные свидетельствуют, что *L. mulieris* является таким же типичным представителем вагинальной микробиоты человека, как и *L. crispatus, L. iners, L. gasseri, L. jensenii*. Распространение этого вида сравнимо по частоте с распространением вида *L. jensenii*.

**Заключение.**

Полученные данные показывают, что *L. mulieris* следует учитывать при разработке методов диагностики вагинальных лактобактерий. Кроме того, при изучении вклада различных видов лактобактерий в обеспечение устойчивого равновесия в вагинальной экосистеме следует учитывать и роль *L. mulieris*.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: Впервые исследовано распространение нового вида *L. mulieris* в вагинальных микробиотах. *L. Mulieris.* Вид *L. mulieris* является таким же типичным представителем вагинальной микробиоты человека, как и *L. crispatus, L. iners, L. gasseri, L. jensenii,* что следует учитывать при разработке методов диагностики и при изучении вклада различных видов лактобактерий в обеспечение устойчивого равновесия в вагинальной экосистеме.

**Литература.**

1. Демкин В.В. Видовое разнообразие лактобактерий вагинального микробиома: как посмотреть // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018. Т. 36. – №. 3. – С. 3-12.
2. Pearce M.M., Hilt E.E., Rosenfeld A.B., Zilliox M.J., Thomas-White K., Fok C., Kliethermes S., Schreckenberger P.C., Brubaker L., Gai X., Wolfe A.J. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence // *mBio.* 2014. V. 5. No. 4. P. 1-12.
3. Летяева О. И. Микробиом влагалищного биотопа: от нормы до патологии // Русский медицинский журнал. 2020. Т. 28. №. 12. С. 72–77.
4. Ene A., Banerjee S., Wolfe A.J., & Putonti C. Exploring the genotypic and phenotypic differences distinguishing Lactobacillus jensenii and Lactobacillus mulieris // mSphere. 2023. V. 8. No. 4. P. e00562-22.
5. Rocha J., Botelho J., Ksiezarek M., Perovic S.U., Machado M., Carriço J.A., ... & Peixe L. Lactobacillus mulieris sp. nov., a new species of Lactobacillus delbrueckii group // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2020. V. 70, No. 3. P. 1522-1527.

**Сведения об авторах**

***Вершинина Елена Артемовна,***
*студент, Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева*
*Москва, Россия*
*Эл. почта elenvershe@mail.ru*

**Information about author**

***Vershinina Elena Artemovna,***
*student, Russian Chemical-Technological University. D. I. Mendeleeva*
*Moscow, Russia*
*E-mail: elenvershe@mail.ru*

***Маряшкина Татьяна Викторовна,***
*биотехнолог,*
*ООО «Нанодиагностика»*
*Москва, Россия*
*Эл.почта maryashtanya@mail.ru*
***Казаков Андрей Аркадьевич,*** *ведущий инженер, ресурсный центр клеточных и генных технологий*
*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,*
*Москва, Россия*
*Эл.почта andrey20079@mail.ru*
***Демкин Владимир Витальевич***
*канд.мед.наук., руководитель ресурсного центра клеточных и генных технологий,*
*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,*
*Москва, Россия*
*Эл.почта vdemkin51@yandex.ru*

***Maryashkina Tatyana Viktorovna****,*
*biotechnologist, Nanodiagnostics LLC*
*Moscow, Russia*
*E-mail: maryashtanya@mail.ru*

***Kazakov Andrey Arkadievich****,*
*leading engineer, resource center for cell and gene technologies*
*National Research Center "Kurchatov Institute",*
*Moscow, Russia*
*E-mail: andrey20079@mail.ru*
***Vladimir Vitalievich Demkin***
*PhD, Head of Resource*
*Center for Cell and Gene Technologies,*
*National Research Center "Kurchatov Institute",*
*Moscow, Russia*
*E-mail: vdemkin51@yandex.ru*

УДК 575.17:599.9
ГРНТИ 34.23.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.199-204

**И. Г. Удина[1], А. С. Грачева[1], М.А. Губина[2], Ю.А. Васильев[3], О. Л. Курбатова[1]**
[1] Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва
[2] Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск
[3] Кубанский государственный медицинский университет

## ГАПЛОГРУППЫ Y-ХРОМОСОМЫ У СТАРШЕГО ПОКОЛЕНИЯ МОСКВЫ И НОВОСИБИРСКА

*Для старшего поколения Москвы и Новосибирска не выявлено достоверных различий по распределению гаплогрупп Y-хромосомы (типичных для русского генофонда [1, 2]), исключая таковые по частоте «южных по происхождению» гаплогрупп, проникающих в генофонд за счет миграции, что обусловливает необходимость создания отдельных референтных баз данных для каждого мегаполиса.*

***Ключевые слова:*** *Новосибирск, население, мегаполис, миграция, генофонд, гаплогруппы Y-хромосомы, референтные базы данных.*

**I. G. Udina[1], A. S. Gracheva[1], M.A. Gubina[2], Yu. A Vasiliev[3], O.L. Kurbatova[1]**
[1] N.I. General Genetics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow
[2] Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Department of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk
[3] Kubanskii State Medical University, Krasnodar

## HAPLOGROUPS OF Y-CHROMOSOME IN THE SENIOR GENERATIONS OF MOSCOW AND NOVOSIBIRSK

*For the senior generations of Moscow and Novosibirsk, no significant differences by the distribution of haplogroups of Y-chromosome (typical for the Russian gene pool [1, 2]) were revealed, excluding those by «Southern by origin» haplogroups, penetrating into gene pool by migration, that indicates necessity of development separate reference databases for each*

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

**Введение**

Современные ДНК-технологии позволяют решать задачи по ДНК-идентификации личности и установлению родства. Вероятность случайного совпадения генотипа по ДНК-маркерам с генотипом другого человека в популяции вычисляется на основе данных о частотах ДНК-маркеров в конкретной популяции, для чего и создаются референтные базы данных. Для идентификации личности и установления родства используют панели из аутосомных STR-маркеров, а также молекулярные маркеры мтДНК и Y-хромосомы [3-6]. Принадлежность к определенной гаплогруппе определяется по присутствию ключевой нуклеотидной замены (SNP) или нескольких в конкретных позициях Y-хромосомы [7]. В процессе передачи Y-хромосомы в поколениях происходит накопление спектра SNP, а также сцепленных STR-маркеров, что позволяет по STR-генотипу определять принадлежность к определенной гаплогруппе с использованием специально разработанных алгоритмов в предикторах гаплогрупп Y-хромосомы [8].

Население мегаполисов можно отнести к популяциям смешанного типа с характерными особенностями генетико-демографических процессов [9]. Основным фактором динамики генофонда населения мегаполиса является миграция [10].

**Целью нашего исследования** является рассмотрение особенностей профиля частот гаплогрупп Y-хромосомы в населении старшего поколения Москвы и Новосибирска для изучения особенностей генофондов мегаполисов в Европейской части и Сибири до начала современных потоков мигрантов с Кавказа и Средней Азии.

**Материалы и методы.**

В 2001-2004 гг. проведено исследование жителей Новосибирска (*N*=117) на базе медицинских учреждений, включающее генетико-демографическое анкетирование и сбор крови. Средний возраст мужчин составил 57.1±0.6 лет. Для Москвы изучена старшая выборка мужского населения (*N*=73) со средним возрастом 50.3±2.2, собранная в 2001 г. [1]. Таким образом, выборки для двух мегаполисов состоят из представителей старшего поколения, родившихся до начала современной интенсивной миграции с Кавказа и из Средней Азии после распада Советского Союза (1991 г.).

ДНК из биологических образцов выделена стандартным методом с применением набора реактивов фирмы «Изоген» (Москва). Генотипирование образцов ДНК по 18 STR Y-хромосомы (*DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS19, DYS385A, DYS385B, DYS456, DYS437, DYS438, DYS447, DYS448, DYS449, DYS391, DYS392, DYS393, DYS439, DYS635* и *DYS576*) проведено на лабораторной базе ООО «Гордиз» (Москва) с последующим установлением принадлежности выявленного STR-генотипа к гаплогруппе Y-хромосомы с помощью предиктора - Whit Athey's Haplogroup Predictor [8]. Статистический анализ проведен в программах «WinPepi», «GenAlEx 6,5», и MS Excel. От каждого лица, включенного в выборку, получено информированное согласие на использование биологического образца (крови) и генетико-демографических данных в анонимном виде в популяционном исследовании.

**Полученные результаты.**

Более 91% гаплогрупп Y-хромосомы по STR гаплотипу с помощью использованного предиктора определено с вероятностью 100%. Для остальных случаев дополнительно привлекали другие доступные в Интернете предикторы. Практически во всех случаях достигли определения гаплогруппы с вероятностью не менее 99%. Распределение гаплогрупп Y-хромосомы у жителей Москвы и Новосибирска в целом соответствует русскому генофонду с наиболее распространенными гаплогруппами *R1a, R1b, E1b1b1, N, I1, I2* с превалированием гаплогруппы *R1a* (табл. 1) [11].

Для изученной выборки мужского населения г. Новосибирска характерно

практическое отсутствие в генофонде «южных по происхождению» гаплогруппы Y-хромосомы (*G2a, G2c, J1, J2, L, O2, O3, Q, R2* и *T*), ранее выявленных в Москве и Санкт-Петербурге для более молодых поколений с частотой 21 и 16%, соответственно [1, 2] (табл. 1). Следует отметить, что из перечня «южных по происхождению» гаплогрупп мы исключили гаплогруппу C3, так как она распространена с высокой частотой помимо народов Центральной Азии и у отдельных народов Сибири [12]. Следовательно, для населения Новосибирска в силу его географического положения не может быть рассмотрена как «южная по происхождению гаплогруппа». В Новосибирске гаплогруппа C3 (M217) выявлена у одного жителя. Из всего спектра этих гаплогрупп выявлены только *J1* и *J2* с суммарной частотой (2.6 %), что обусловлено принадлежностью рассматриваемой выборки к старшему поколению и практическим отсутствием в этом поколении мегаполиса мигрантов с Кавказа и из Средней Азии.

***Таблица 1. Частоты крупных гаплогрупп Y-хромосомы в изученных выборках из старшего поколения населения Москвы и Новосибирска [1]***

| Гаплогруппа | Новосибирск | | Москва | |
|---|---|---|---|---|
| | *N* | *f* | *N* | *f* |
| *E1b1b* | 5 | 0.043 | 1 | 0.014 |
| *I1* | 9 | 0.077 | 4 | 0.055 |
| *I2* | 14 | 0.119 | 6 | 0.082 |
| *N* | 15 | 0.127 | 13 | 0.178 |
| *R1a* | 65 | 0.547 | 38 | 0.520 |
| *R1b* | 6 | 0.053 | 3 | 0.041 |
| C3 | 1 | 0,008 | 0 | 0 |
| «Южные по происхождению» | 3 | 0.026 | 8 | 0.110 |
| Всего: | 117 | 1.00 | 73 | 1.00 |

Различий в частотном профиле гаплогрупп Y-хромосомы между старшим поколением Новосибирска и Москвы не выявлено, что подтверждает и оценка Rst. Однако, в отличие от выборки из Новосибирска, для выборки из Москвы отмечено присутствие «южных по происхождению» гаплогрупп с частотой 11%, представлены четыре гаплогруппы (*J1, J2, T* и *Q*). Для старшего поколения двух мегаполисов установлены достоверные различия по присутствию «южных по происхождению» гаплогрупп (p=0,023, OR=0,21 CI95% 0,04-0,99). Отмеченные особенности выборки из Москвы по сравнению с выборкой из Новосибирска указывают на более раннее проникновение миграционных потоков в мегаполис, которые привносят отдельные «южные по происхождению» гаплогруппы. Полученные оценки хорошо согласуются с данными анкетирования о местах происхождения и этническом составе мигрантов рассматриваемых выборок.

**Выводы.**

Установленные особенности профилей частот гаплогрупп в старших поколениях двух мегаполисов сближают их, но отличны от профилей частот гаплогрупп Y-хромосомы в младшем поколении Москвы [1], что подтверждено оценками *Rst* и генетических расстояний по М. Нею между изученными популяциями. Таким образом, необходимо создавать референтные базы данных по ДНК-маркерам для каждого мегаполиса с учетом возраста жителей, структуры миграции и географического положения [2, 13].

**Заключение**

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

1. В старшем поколении мегаполисов как на территории Европейской части РФ (Москвы), так и на территории Сибири (Новосибирска) отмечено сходство в профилях гаплогрупп Y-хромосомы в целом соответствующих профилю русского генофонда [11].

2. В старших поколениях двух мегаполисов, по сравнению с более молодыми поколениями выявлена относительно более низкая частота «южных по происхождению»

гаплогрупп Y-хромосомы (*G2a, G2c, J1, J2, L, O2, O3, Q, R2* и *T*), характерных для современных потоков мигрантов, которая составила в старшем поколении Москвы 11% и Новосибирска - 2.6%.

3. Полученные данные об особенностях распространения гаплогрупп Y-хромосомы у жителей двух мегаполисов свидетельствуют о необходимости создания референтных баз данных для каждого мегаполиса, так как генофонд мегаполиса меняется под действием миграции, а ее параметры специфичны для каждого мегаполиса и отдельных поколений.

***Авторы благодарят жителей г. Новосибирска, принявших участие в анкетировании и предоставивших свои биологические образцы для исследования. Исследование одобрено Этическим комитетом ИОГен РАН. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.***

***Исследование проведено в рамках темы государственного задания ИОГен РАН «Исследования полиморфизма на клеточном, организменном и популяционном уровне как основа создания генетических технологий» (№ 0092-2022-0001).***

**Литература.**

1. Удина И. Г., Грачева А. С., Курбатова О. Л. Частоты гаплогрупп Y-хромосомы и процессы миграции в трех поколениях жителей Москвы // Генетика. 2022. Т. 58. №11. С. 1325-1333. DOI:10.31857/S001667582110121. (Udina I.G., Gracheva A.S. and Kurbatova O.L. Frequencies of Y-chromosome Haplogroups and Migration processes in three generations of Moscow Residents // Russ. J. Genet. 2022. Vol. 58. N 11. P. 1325-1333. DOI: 10.1134/s1022795422110114)
2. Удина И. Г., Грачева А. С., Боринская С. А., Курбатова О. Л. Особенности распространения гаплогрупп Y-хромосомы в населении Санкт-Петербурга в связи с проблемой создания референтных баз данных // Генетика. 2023. Т. 59. № 11. С. 1319–1325. (Udina I. G., Gracheva A. S., Borinskaya S. A., and Kurbatova O. L. Distribution Peculiarities of Y-Chromosome Haplogroups in the Population of St. Petersburg in Connection with the Problem of Creation of Reference Databases // Russian Journal of Genetics. 2023. V. 59. N. 11. P. 1216–1221. ISSN 1022-7954. DOI: 10.1134/S1022795423110169)
3. Цыбовский И.С., Веремейчик В.М., Котова С.А. , Крицкая С.В., Евмененко С.А., Удина И.Г. Создание судебной референтной базы данных по 18 аутосомным STR для ДНК-идентификации в Республике Беларусь // Генетика. 2017. № 2. С. 249-258. DOI: 10.7868/S0016675817020138. (Tsybovskii I.S., Veremeichik V.M., Kotova S.A., Kritskaya S.V., Evmenenko S.A., Udina I.G. Developing Forensic Reference Database by 18 Autosomal STR for DNA Identification in Republic of Belarus // Russian Journal of Genetics. 2017. V. 53. N. 2. P. 275–284. DOI: 10.1134/S1022795417020132)
4. Willuweit S., Roewer L. The new Y chromosome haplotype reference database // Forensic Sci. Int. Genet. 2015. V.15. P. 43-48.
5. Parson W., Dör A. EMPOP - a forensic mtDNA database // Forensic Sci. Int. Genet. 2007. V.1. No. 2. P. 88-92.
6. Удина И. Г., Грачева А. С., Курбатова О. Л. Научное и прикладное значение анализа изменчивости Y-хромосомы для криминалистики, этнодемографических исследований и исторических реконструкций // Социальное пространство. 2023. Т. 9. № 1. DOI: 10.15838/sa.2023.1.37.7 (Udina I.G., Gracheva A.S., Kurbatova O.L. Scientific and applied significance of the analysis of Y-chromosome variation for criminalistics, ethnodemographic studies and historical reconstructions // Social Area. 2023. V.9. N. 1. DOI: 10.15838/sa.2023.1.37.7)

7. Human Y-chromosome DNA haplogroup. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Human_Y-chromosome_DNA_haplogroup (дата обращения: 29.03.2024).
8. Whit Athey's Haplogroup Predictor. Haplogroup Predictor (hprg.com) (дата обращения: 29.03.2024).
9. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Веремейчик В.М. Прудникова А.С., Атраментова Л.А., Цыбовский И.С., Удина И.Г. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов в связи с проблемой создания генетических баз данных // Генетика. 2013. Т. 49. № 4. С. 513-522. DOI: 10.7868/S0016675813040085 (Kurbatova O.L., Pobedonostseva E.Y., Prudnikova A.S., Veremeichik V.V., Atramentova L.A., Tsybovskii I.S., Udina I.G. Genetic demography of populations of three megalopolises in relation to the problem of creating genetic databases // Russian Journal of Genetics. 2013. Т. 49. № 4. С. 448-456. doi. 10.1134/S102279541304008X)
10. Курбатова О.Л., Янковский Н.К. Миграция – основной фактор популяционной динамики городского населения России // Генетика. 2016. Т. 52. № 7. С. 831-851. (Kurbatova O.L., Yankovsky N.K. Migration as the Main Factor of the Russia's Urban Population Dynamics // Russian J. Genetics. 2016. V. 52. №7. - P. 726–745.) doi: 10.7868/S0016675816070067)
11. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на русской равнине. – М: Луч, 2007. – 416 с.
12. Балаганская О.А., Дамба Л.Д., Жабагин М.К., Агджоян А.Т., Юсупов Ю.М., Сабитов Ж.М., Богунов Ю.В., Балаганский А.Г., Султанова Г.Д., Долинина Д.О., Падюкова А.Д., Схаляхо Р.А., Маркина Н.В., Букин А.Г., Лавряшина М.Б., Балановская Е.В., Балановский О.П. Монгольский след в генофонде народов вдоль степной полосы Евразии // Современные проблемы науки и образования. 2016. №4. URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=24910 (дата обращения: 19.04.2024).
13. Карта географического распространения гаплогрупп Y-хромосомы на территории Евразии. URL: https://i.imgur.com/4rsFqdk.jpg (дата обращения: 29.03.2024).

**Сведения об авторах**

***Удина Ирина Геннадьевна***
*д.б.н., доцент, г.н.с., рук. группы популяционной иммуногенетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.*
*119991 Москва, ул. Губкина 3. http://www.vigg.ru/*
*Сл. тел. 8 (499) 1354226.*
*Моб. +7 9032774178*
*E-mail: irina_udina@mail.ru*

***Грачева Алеся Сергеевна***
*к.б.н., с.н.с. лаборатории популяционной генетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Москва 119991, ул. Губкина д.3, ИОГен РАН. http://www.vigg.ru/ Тел.сл. (499)1355111; Моб. +7 9150494412*
*E-mail: palesa@yandex.ru*

***Губина Марина Александровна***
*к.б.н., с.н.с. Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук. Новосибирск, 630090, пр.ак. Лаврентьева, 10, https://www.icgbio.ru/ тел. моб. +7 9139344328*
*E-mail: marina@bionet.nsc.ru*

**Information about author**

***Udina Irina Gennadyevna***
*doctor of biology sciences, chief researcher, head. of the group of population immunogenetics of Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, 119991, Gubkin Str., 3*
*E-mail: irina_udina@mail.ru*

***Gracheva Alesya Sergeevna***
*PhD, senior researcher of lab. population genetics of Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, 119991, Gubkin Str., 3*
*E-mail: palesa@yandex.ru*

***Gubina Marina Alexandrovna***
*PhD, senior researcher, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Russian Federation, 630090, Novosibirsk, Prospekt Lavrentyeva 10*
*E-mail: marina@bionet.nsc.ru*

***Васильев Юрий Анатольевич***
*ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины ФГБОУ ВО «Кубанский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России, Краснодар, 350063, ул. Седина, 4., https://www.ksma.ru/ тел. +7 8612686229.*
*E-mail: yurii-59@mail.ru*
***Курбатова Ольга Леонидовна***
*д.б.н., г.н.с. лаборатории популяционной генетики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Москва 119991, ул. Губкина д.3, ИОГен РАН. http://www.vigg.ru/ Тел.сл. (499)1355111; Моб. +7 9150570962*
*E-mail: okurbat@list.ru*

***Vasiliev Yuri Anatolievich***
*assistant of the Department of public health, health and medical history of Kuban State Medical University, Krasnodar, 350063, Sedin Str., 4*
*E-mail: yurii-59@mail.ru*

***Kurbatova Olga Leonidovna***
*doctor of biology sciences, chief researcher of lab. population genetics of Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, 119991, Gubkin Str., 3*
*E-mail: okurbat@list.ru*

УДК: 57.085.23
ГРНТИ 34.19
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.205-209

**Л.Р. Гринчевкая[1], Д.И. Салихова[1], Т.Х.Фатхудинов[1], Д.В. Гольдштейн[2]**
[1]НИИ молекулярной и клеточной медицины медицинского института РУДН,
[2]ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова»,

## РОЛЬ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В АНГИОГЕНЕЗЕ

*Заболевания, связанные с нарушением кровоснабжения органов и тканей, являются одной из распространенных причин смертности в мире. Несмотря на их высокую частоту встречаемости, эффективность существующих способов терапии остается недостаточной, поэтому важно заниматься поиском новых способов терапии ишемизированных тканей.*

***Ключевые слова**: ангиогенез, глиальные клетки-предшественники, сосудистая сеть, эндотелиальные клетки линии EA.hy926, кондиционированная среда.*

**L.R. Grinchevskaia[1], D.I. Salikhova[1], T.K. Fatkhudinov[1], D.V. Goldshtein[2]**
[1]Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN Medical Institute,
[2]Research Center for Medical Genetics

## THE ROLE OF GLIAL PROGENITOR CELLS IN ANGIOGENESIS

*Diseases associated with impaired blood supply to organs and tissues are one of the common causes of mortality in the world. Despite their high frequency of occurrence, the effectiveness of existing therapies remains insufficient, so it is important to search for new ways of therapy of ischemic tissues.*

***Keywords:** angiogenesis, glial progenitor cells, vascular network, endothelial cells EA.hy926, conditioned medium*

**Введение.**

Ангиогенез – это строго регулируемый процесс, определяемый взаимодействием проангиогенных и антиангиогенных факторов, в ходе которого происходит формирование новых сосудов [1, с. 97–125; 2, с. 7643-7663]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, болезни, связанные с нарушением кровоснабжения органов и тканей, являются одной из наиболее распространённых причин смертности и инвалидизации населения. В частности, известно, что при нарушении кровоснабжения головного мозга инвалидами становится порядка 60% пациентов, а частота летального исхода достигает 30% [3, с. 1-12]. Хотя подобные заболевания, как упоминалось выше, являются достаточно распространенными, на сегодняшний день эффективность существующих препаратов остается недостаточной, именно поэтому особое внимание уделяется изучению вопросов ангиогенеза, кровоснабжения органов и тканей, а также поиску новых эффективных способов терапии ишемических болезней.

В последние десятилетия активно разрабатывается так называемая концепция терапевтического ангиогенеза, которая подразумевает совокупность методов, направленных на восстановление микроциркуляторного русла. При этом особое внимание уделяется изучению возможности применения стволовых клеток (СК) и их кондиционированных сред (КС) в качестве терапевтического средства для ишемизированных тканей [4, с. 6779; 5, с. 3131-3149; 6, с. 411-424].

**Цель работы.**

Целью данной работы является изучение ангиогенных свойств глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

**Материалы и методы.**

В ходе проведения исследования использовали две основные клеточные культуры: глиальные клетки-предшественники (ГКП), полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК), и эндотелиальная клеточная линия EA.hy926, являющаяся гибридомой первичной культурой эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека и карциномы легкого человека A549.

Для приготовления кондиционированной среды глиальных клеток-предшественников (КС-ГКП) осуществляли смену полной среды на среду без сыворотки, клетки культивировали в течение 12 часов, после чего отбирали полученную КС, которую в дальнейшем использовали в экспериментах. Во всех экспериментах в качестве положительного контроля использовали питательную среду с добавлением фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в концентрации 50 нг/мл, а также выделяли группу отрицательного контроля - культивирование клеток в питательной среде без добавления дополнительных факторов роста и КС.

Косвенную оценку пролиферативной активности клеток EA.hy926 осуществляли с помощью МТТ-теста при различных концентрациях КС-ГКП: 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 25 мкг/мл. Направленную миграцию эндотелиальных клеток EA.hy926 по градиенту хемоаттрактантов оценивали с использованием Transwell-системы. При этом анализировали миграционную способность EA.hy926 как по отношению к ГКП, так и к КС-ГКП (5 мкг/мл). Клетки EA.hy926, которые вносили в верхнюю камеру Transwell-системы, были предварительно мечены с помощью красного флуоресцентного красителя PKH26. Также изучали влияние КС-ГКП и ГКП на формирование сосудистой сети при моделировании ангиогенеза на специальном матриксе базальной мембраны (Corning Matrigel). Для этого в лунки вносили гель, на который после полимеризации наслаивали клетки. КС-ГКП вносили в концентрации 5 мкг/мл, а для изучения влияния самих ГКП в лунки высевали клетки линии EA.hy926 и ГКП в соотношении 1:1 (ГКП+EA.hy926). Наблюдение за формированием сосудистой сети проводили в течение полутора месяцев. Статистическая обработка результатов проводилась в программе SigmaPlot 14.0, построение графиков осуществляли в программе GraphPad Prism 8.0.

**Полученные результаты.**

Согласно результатам МТТ-теста уровень пролиферативной активности клеток линии EA.hy926 варьировался в зависимости от концентрации КС-ГКП. Было показано, что КС-ГКП в концентрациях 1 мкг/мл и 5 мкг/мл оказывает положительное влияние на пролиферацию клеток: в указанных экспериментальных группах интенсивность пролиферации была в 1,5 раза выше, чем в контроле. При этом концентрация КС-ГКП 25 мкг/мл, напротив, оказывала ингибирующее воздействие на пролиферацию клеток, снижая ее активность почти в 2 раза по сравнению с контрольными лунками, что, предположительно, связано с относительно высокой концентрацией, входящих в состав КС высокомолекулярных белков. В то же время добавление VEGF способствовало увеличению пролиферативной активности в 3 раза относительно контроля (рис. 1).

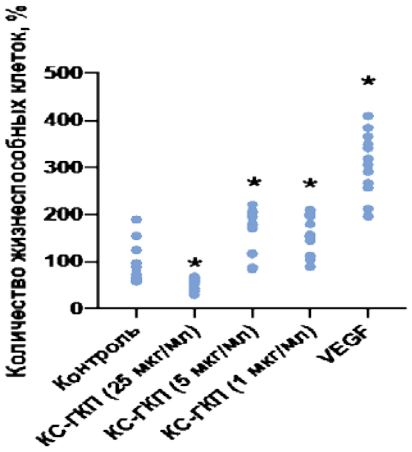



***Рис. 1. Пролиферативная активность клеток эндотелиальной линии EA.hy926 (%). Данные представлены в виде точечной диаграммы (*p<0,05, One Way ANOVA, тест Хольма-Сидака).***

Изучение миграционной способности клеток EA.hy926 показало, что в составе КС-ГКП присутствуют определенные факторы, выступающие в качестве хемоаттрактантов по отношению к эндотелиальным клеткам. В частности, уже через сутки после начала эксперимента в нижней камере Transwell-систем в группе с ГКП наблюдали больше мигрировавших клеток, чем в контрольной группе. В то время, как в группе КС-ГКП с концентрацией 5 мкг/мл значимые отличия начали появляться через 72 часа наблюдения. А в группе с добавлением VEGF количество мигрировавших клеток было сопоставимо с их количеством в контрольной группе на протяжении всего эксперимента (рис. 2).

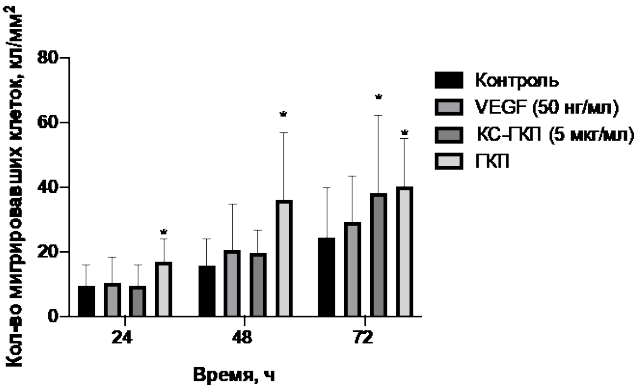



***Рис. 2. Миграция клеток линии EA.hy926: количественная оценка направленной миграции, данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. *p<0,05 по сравнению с группой контроля.***

При моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны in vitro через 4 часа во всех экспериментальных группах наблюдали формирование первичной тубулярной сети. При этом наибольшее количество точек ветвления обнаруживали в группе с добавлением VEGF. Вместе с тем добавление КС не оказывало влияния ни на количество точек ветвления, ни на длину формирующихся отростков, однако увеличивало скорость разборки первичной тубулярной сети. Формирование последней в группе ГКП+EA.hy926 происходило следующим образом: образовывались более крупные участки ветвления, но их количество было меньше, а средняя длина отростков была больше, чем в остальных 3 группах (рис. 3). Через 48 часов во всех экспериментальных группах появлялись кластеры клеток, из которых в дальнейшем происходило формирование вторичной тубулярной сети. Через 7 дней во всех группах наблюдали появление центров спрутинга – центров разрастания клеток в ранее образовавшихся кластерах. Морфологические различия между экспериментальными группами выявляли через 14

дней с момента начала эксперимента. При этом наиболее ярко выраженная вторичная сеть наблюдали в группе ГКП+EA.hy926: в центрах спрутинга были заметны длинные ветвистые отростки, отходящие от ранее сформировавшихся кластеров клеток. В то же время в группах VEGF и КС-ГКП формировалась вторичная сеть, которая представляла собой достаточно крупные кластеры клеток с небольшими отростками (рис.3).

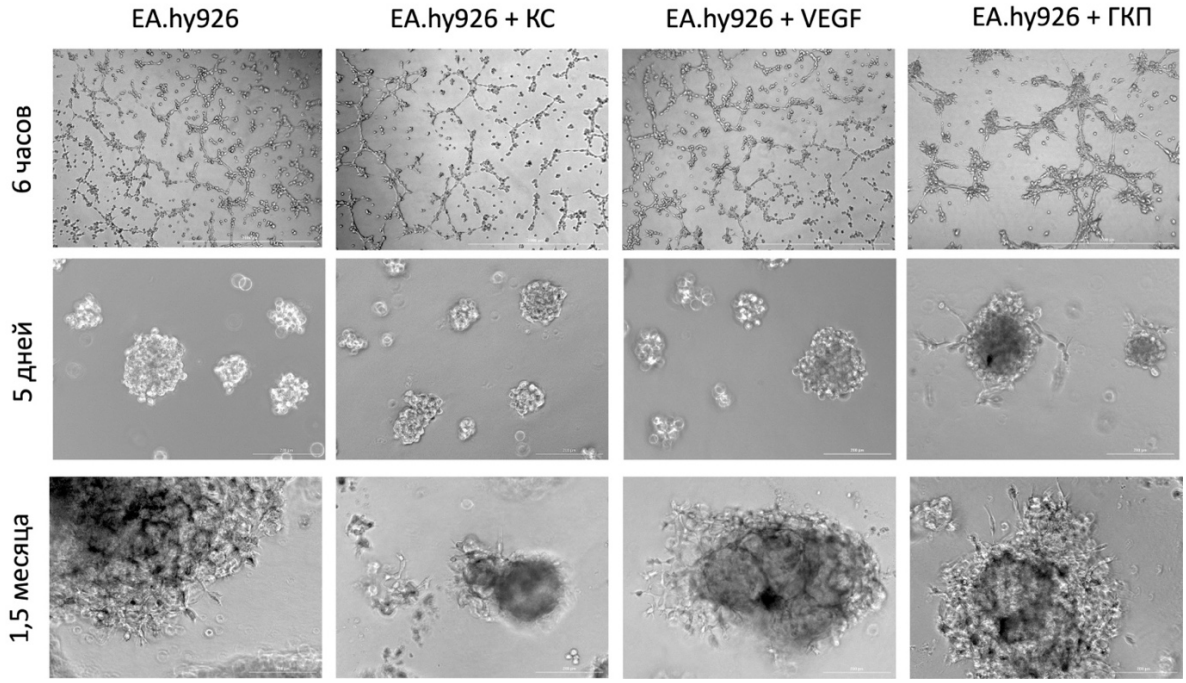



***Рис. 3. Тубулярная структура, сформированная клетками эндотелиальной линии EA.hy926 через 6 часов (фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 1 мм); формирование трехмерных кластеров с капилляроподобными структурами на матриксе базальной мембраны через 5 дней и 1,5 месяца (фазово-контрастная микроскопия, масштабный отрезок 200 μм).***

**Выводы.**

Таким образом, КС-ГКП оказывает положительное воздействие на пролиферативную активность эндотелиальных клеток линии EA.hy926 при концентрациях 1 и 5 мкг/мл, а при концентрации КС-ГКП 25 мкг/мл, напротив, наблюдается ингибирование пролиферации клеток. Как КС-ГКП, так и ГКП способствуют направленной миграции клеток. При этом положительный эффект ГКП заметен уже через сутки после начала эксперимента, а КС-ГКП – на третьи сутки. Кроме того, при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембран in vitro ГКП способствуют формированию более крупной тубулярной сети, КС-ГКП не оказывает подобного эффекта. При концентрации КС-ГКП 5 мкг/мл происходит более быстрое уменьшение площади раневой поверхности в модели «раны монослоя» in vitro.

**Заключение.**

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

1) были впервые исследованы ангиогенные свойства ГКП и КС-ГКП;
2) было показано, что КС-ГКП в определенных концентрациях оказывает положительное воздействие на пролиферацию клеток, а также на их способность к миграции;
3) было показано, что КС-ГКП не ускоряет процесс формирования первичной и вторичной тубулярной сети при моделировании ангиогенеза в матриксе базальной мембраны in vitro, однако способствует более быстрой разборке первичной тубулярной сети;

4) было показано, что ГКП, напротив, способствуют формированию относительно крупной тубулярной сети с длинными отростками и крупными точками ветвления, что, предположительно, связано с юкстакринным взаимодействием ГКП и EA.hy926.

***Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № КБК 075 0110 47 1 S7 24600 621) по теме «Разработка новых лекарственных средств для терапии неврологических заболеваний»***

**Литература.**

1. Veith A.P. et al. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing // Adv. Drug Deliv. Rev. 2019. Vol. 146. P. 97–125.
2. Darweesh R.S., Ayoub N.M., Nazzal S. Gold nanoparticles and angiogenesis: molecular mechanisms and biomedical applications // Int. J. Nanomedicine. 2019. Vol. Volume 14. P. 7643–7663.
3. Ceornodolea A.D., Bal R., Severens J.L. Epidemiology and Management of Atrial Fibrillation and Stroke: Review of Data from Four European Countries // Stroke Res. Treat. 2017. Vol. 2017. P. 1–12.
4. Zhang F.-L. et al. Organoids transplantation attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice through L-Malic acid-mediated M2 macrophage polarization // Nat. Commun. 2023. Vol. 14, № 1. P. 6779.
5. Lee T.-L. et al. Conditioned medium from adipose-derived stem cells attenuates ischemia/reperfusion-induced cardiac injury through the microRNA-221/222/PUMA/ETS-1 pathway // Theranostics. 2021. Vol. 11, № 7. P. 3131–3149.
6. Lim S.W. et al. Alleviation of renal ischemia/reperfusion injury by exosomes from induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells // Korean J. Intern. Med. 2022. Vol. 37, № 2. P. 411–424.

**Сведения об авторах**

***Гринчевская Лидия Равилевна***
*лаборант-исследователь, НИИ молекулярной и клеточной медицины Медицинского института РУДН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: lidia.khaerdinova@gmail.com*

***Салихова Диана Ирековна,***
*к.б.н., заведующая лабораторией клеточных биотехнологий, НИИ молекулярной и клеточной медицины Медицинского института РУДН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: diana-saliikhova@bk.ru*

***Фатхудинов Тимур Хайсамудинович***
*д.м.н., заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского института РУДН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: fatkhudinov-tkh@rudn.ru*

***Гольдштейн Дмитрий Вадимович***
*д.б.н., заведующий лабораторией генетики стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. Н.П. Бочкова»*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: dvgoldshtein@gmail.com*

**Information about author**

***Grinchevskaia Lidiia Ravilevna***
*Research assistant, Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN Medical Institute*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: lidia.khaerdinova@gmail.com*

***Salikhova Diana Irekovna***
*PhD, Head of the Laboratory of Cellular Biotechnology, Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN Medical Institute*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: diana-saliikhova@bk.ru*

***Fatkhudinov Timur Khaysamudinovich***
*Doctor of Science, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology of the RUDN Medical Institute*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: fatkhudinov-tkh@rudn.ru*

***Goldshtein Dmitry Vadimovich***
*Doctor of Science, Head of the Laboratory of Stem Cell Genetics, Research Centre for Medical Genetics*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: dvgoldshtein@gmail.com*

УДК 004.9:577.112
ГРНТИ 34.55
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.210-216

**Е.К. Полищук**
«ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

## ПРЕИМУЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ИНСТРУМЕНТОВ *IN SILICO* ПРИ АНАЛИЗЕ ХАРАКТЕРИСТИК ПРОТЕГРИНА-1

*В статье обсуждается применение биоинформатических ресурсов при оценке характеристик Протегрина-1 и путей его трансформации под воздействием ферментов. In silico инструменты эффективны при скрининговых исследованиях потенциала и свойств биоактивных пептидов и могут быть применены для изучения путей их извлечения, однако имеют некоторые ограничения.*

***Ключевые слова:*** *биоинформатика, биоактивные пептиды, токсичность, горечь, стабильность, абсорбция, ферментативное расщепление.*

**E.K. Polishchuk**
V.M. Gorbatov Federal Research Center of Food Systems
of the Russian Academy of Sciences

## BENEFITS AND CONSTRAINTS OF *IN SILICO* TOOLS FOR ANALYZING PROTEGRIN-1 CHARACTERISTICS

*The paper discusses the application of bioinformatics resources in assessing the characteristics of Protegrin-1 and its transformation pathways under the influence of enzymes. In silico tools are effective for screening studies of the potential and properties of bioactive peptides and can be used to study the pathways of their extraction, but they have some limitations.*

***Keywords****: bioinformatics, bioactive peptides, toxicity, bitterness, stability, absorption, enzymatic cleavage.*

### Введение.

Биоактивные пептиды (БП) участвуют в передаче сигналов в нервной, иммунной, эндокринной, параэндокринной и других регуляторных системах живых организмов [1, с. 7]. Пептиды могут обладать антигипертензивной, иммуностимулирующей, противомикробной, гиполипидемической, антиоксидантной и др. активностью [2, с. 315]. Некоторые из них встречаются в организме в нативном виде, другие – могут высвобождаться из молекул-предшественников путем направленного протеолиза [3, с. 30]. В то же время существует множество БП, обладающих биологической активностью и не являющихся «классическими» пептидными биорегуляторами [1, с. 7], которые образуются в организме виде «теневого фона» из экзогенных белковых предшественников [3, с. 30]. Для получения набора БП с разной направленностью действия проводят протеолиз, например, коллагена, гемоглобина, казеина и т.д [2, с. 316]. БП также могут быть синтезированы искусственно, однако в зависимости от конечной цели их применения необходимо понимать, какими свойствами они будут обладать.

Область биоинформатики добилась значительного прогресса, включая новые разработанные алгоритмы и модели, веб-серверы, программное обеспечение, позволяющие оценить биологическую активность, механизмы взаимодействия, биодоступность, аллергенность и другие свойства БП. Наиболее популярными инструментами для этих целей являются такие онлайн-ресурсы, как UniProtKB (https://www.uniprot.org/), BIOPEP-UWM (https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep/start_biopep.php), ADMETlab (https://admetmesh.scbdd.com/), которые могут предоставить обобщенную информацию о БП. Существует множество баз данных (БД), посвященных отдельным категориям БП: антимикробным (APD3, CAMPR3, AMPer), растительным (PlantPepDB, MFPPDB), антигипертензивным (AHTPDB), противовирусным (AVPdb) и т.д. Тем не менее, доступ к

некоторым БД и онлайн-ресурсам может быть ограничен в настоящее время.

Ученые предлагают различные алгоритмы использования биоинформатических инструментов [4], [5, с. 291], [6, с. 9], [7, с. 10], однако унифицированного механизма исследования БП не существует, ввиду их различной природы и целей конечного применения. Зачастую исследование БП методами in silico останавливается на этапе оценки их качественных характеристик, однако довольно мало исследований, посвященных оценке устойчивости и стабильности БП до и после их извлечения из природного источника.

**Цель работы.**

Оценить характеристики биоактивного пептида с помощью инструментов in silico анализа на примере Протегрина-1, антимикробного пептида (АМП) *Sus scrofa*. Рассмотреть возможность его расщепления ферментами пищеварения и собственными ферментами post mortem в организме *Sus scrofa*.

**Материалы и методы.**

Информацию о структуре, заряде и механизме действия Протегрина-1 получали в базе данных антимикробных пептидов APD3 (https://aps.unmc.edu/). Потенциал биологической активности оценивали с помощью онлайн-инструмента PeptideRanker (http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/) – сервера для прогнозирования биоактивных пептидов на основе новой нейронной сети N-to-1. Направленность биологического действия оценивали с помощью APD3, DRAMP Database (http://dramp.cpu-bioinfor.org/), а также с использованием платформы CSM-peptides (https://biosig.lab.uq.edu.au/csm_peptides/). Инструмент PepSMI (https://www.novoprolabs.com/tools/convert-peptide-to-smiles-string) был использован для преобразования аминокислотной последовательности в строку SMILES, которую затем анализировали в ADMETlab 2.0 (https://admetlab3.scbdd.com/server/evaluation).

Токсичность оценивали с помощью ресурса ToxinPred (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html). Метод SVM (Swiss-Prot) based с пороговым значением 0.0 был выбран для скрининга неспецифической цитотоксичности. Аллергенность оценивали с помощью веб-сервера AlgPred 2.0 (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/algpred2/index.html), порог был установлен на уровне 0.5. Горечь пептидов оценивали с помощью онлайн-предиктора iBitter-SCM (https://camt.pythonanywhere.com/iBitter-SCM), пороговое значение устанавливали на уровне 333,0.

Период полураспада в крови анализировали с помощью веб-сервера PlifePred (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/plifepred/index.php), в среде пищеварительной системы человека – с помощью веб-сервера HLP (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/hlp/). Если период полураспада в секундах был менее 0.1, стабильность пептида классифицировали как низкую, от 0.1 до 1.0 с – среднюю, выше 1.0 с – высокая.

Далее изучали возможность высвобождения пептида из препропептидного предшественника под воздействием ферментов. Для поиска предшественников пептида применяли инструмент PeptideSearch (https://www.uniprot.org/peptide-search). В расширенных параметрах поиска выбирали опцию «Search UniProt Reviewed (Swiss-Prot) only», далее их проверяли с помощью инструмента PeptideCutter (https://web.expasy.org/peptide_cutter/) на предмет расщепления ферментами пищеварения (пепсин, трипсин) и собственными ферментами Sus scrofa (нейтрофильная эластаза и возможные инициаторы автолитического расщепления белков post mortem (каспаза-3 и -6, энтерокиназа)).

**Полученные результаты.**

Протегрин-1 является довольно хорошо изученным антимикробным пептидом, обнаруженным в лейкоцитах *Sus scrofa* [8, с. 9]. В соответствии с APD3 Протегрин-1 имеет бета-складчатую структуру из 18 аминокислотных остатков, заряд = 7, а механизм его действия основан на порообразовании. Согласно PeptideRanker вероятность активности Протегрина-1 составляет 0,872435; при вероятности ≥ 0.8, принято считать, что

пептид обладает биологической активностью. Основным недостатком этого инструмента является то, что он не дает подробной информации о типе и степени биологической активности.

Согласно данным APD3 Протегрин-1 активен в отношении грамположительных бактерий (*S. aureus* ATCC 33591 (MRSA), минимальная ингибирующая концентрация (МИК) = 2 мкг/мл), грибов (*C. albicans* ATCC 10231, МИК = 8 мкг/мл), вирусов (HSV-1, HSV-2, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней). Согласно DRAMP Database, обладает антимикробным действием и проявляет активность против грамположительных (*S. aureus*, МИК = 64 мкг/мл; *S. epidermidis*, МИК = 2 мкг/мл) и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, МИК = 64 мкг/мл). По данным CSM-peptides данный пептид может обладать также антиангиогенным, противовоспалительным и противовирусным действием, однако в литературе сообщалось также о противоопухолевом действии Протегрина-1 [9, с. 45].

В Таблицах 1 и 2 отражены результаты *in silico* анализа Протегрина-1, проведенного с помощью инструментов ToxinPred, AlgPred 2.0, iBitter-SCM, PlifePred, HLP и ADMETlab 2.0.

***Таблица 1. In silico анализ токсичности, аллергенности, горечи и стабильности Протегрина-1***

| | **ToxinPred** | **AlgPred 2.0** | **iBitter-SCM** | **PlifePred** | **HLP** |
|---|---|---|---|---|---|
| | Нетоксичный | Не вызывает аллергию | Горький, Score = 427.12 | Высокая стабильность, 843.81 с | Средняя стабильность, 0,245 с |
| Пороговое значение | 0.0 | 0.5 | 333.0 | > 1 с | от 0.1 до 1.0 с |

ToxinPred на основании значений гидрофобности, гидрофильности, амфипатичности аминокислотной последовательности пептида рассчитывает вероятность его неспецифической токсичности [10, с. 434], согласно анализу данного инструмента, Протегрин-1 не является токсичным пептидом. ADMETlab 2.0 направлен на более детальную оценку токсичности: возможны повреждения клеток печени и дыхательных путей при приеме Протегрина-1. В литературе также сообщалось, что Протегрин-1 способен лизировать эритроциты человека [9, с. 46].

AlgPred 2.0 имеет ограничение и может анализировать только пептиды, содержащие более 10 аминокислот [11, с. 3423]. Согласно анализу, Протегрин-1 не является аллергенным пептидом. Тем не менее, использование данного пептида в пищевой промышленности, к примеру, в качестве консерванта, может быть ограничено из-за его вкусовых качеств – показатель горечи был равен 427.12 баллам, что существенно превышало пороговое значение.

Период полураспада Протегрина-1 в крови составил 843,81 секунд, что свидетельствует о его высокой стабильности. Известно, что данный пептид является компонентом врожденного иммунитета Sus scrofa и обнаруживается в лейкоцитах [8, с. 9], поэтому может характеризоваться высокой стабильностью. Стабильность Протегрина-1 в среде пищеварительной системы была средней – 0,245 по данным HLP, а согласно ADMETlab 2.0, пептид характеризовался низкой абсорбцией в кишечнике (Табл. 2), вероятность которой составляет < 30%.

Как видно из Таблицы 2, ADMETlab 2.0 предоставляет довольно развернутую оценку характеристик исследуемого пептида, включая специфические виды токсичности, а также дает подробную информацию о способности вещества проходить через различные барьеры организма, образовывать связи с белками плазмы, абсорбироваться разными типами клеток и т.д. Такой анализ позволяет научно обосновать дальнейшее применение пептида.

*Таблица 2. Токсичность, распределение и абсорбция Протегрина-1 в организме по данным ADMETlab 2.0*

| Токсичность | | | |
|---|---|---|---|
| **Свойство** | Вероят-ность | Решение | Комментарий |
| **hERG Blockers** | 0,002 | ● | Не оказывает токсического действия на сердце |
| **H-HT** | 0,962 | ● | Гепатотоксичен для человека |
| **AMES Toxicity** | 0,061 | ● | Не является мутагенным |
| **Rat Oral Acute Toxicity** | 0,122 | ● | Не обладает острой токсичностью при пероральном применении у крыс |
| **Пороговая токсическая доза для человека (FDAMDD)** | 0,556 | ● | Не токсичен при данном значении |
| **Кожная сенсибилизация** | 0,157 | ● | Не является сенсибилизатором |
| **Канцерогенность** | 0,009 | ● | Не является канцерогеном |
| **Раздражение слизистой оболочки глаз** | 0,0 | ● | Не является раздражителем |
| **Респираторная токсичность** | 0,886 | ● | Является респираторным токсикантом |
| **Распределение в организме** | | | |
| **Связывание с белками плазмы, %** | 54,36 | ● | Оптимально: < 90%. Лекарства с высокой степенью связывания с белками могут иметь низкий терапевтический индекс. |
| **Распределение объема, л/кг** | 0,369 | ● | Оптимально: 0,04-20 л/кг. |
| **Проникновение через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ)** | 0,003 | ● | Не проникает через ГЭБ |
| **Фракция, несвязанная в плазме (Fu), %** | 22,38 | ● | Рекомендуемые показатели:<br>Низкий: <5%; Средний: 5~20%; Высокий: >20%<br>Обладает высокой проникающей способностью через мембраны клетки |
| **Абсорбция** | | | |
| **Caco-2 проницаемость** | -7,421 | ● | Низкая проницаемость<br>Оптимальное значение: выше -5,15 log единиц |
| **MDCK проницаемость** | $1 \times 10^{-6}$ | ● | Низкая проницаемость |
| **Pgp-ингибитор** | 0,0 | ● | Не является ингибитором Р-гликопротеинов |
| **Pgp-субстрат** | 1,0 | ● | Субстрат Р-гликопротеинов |
| **Абсорбция в кишечнике** | 1,0 | ● | Вероятность абсорбции ниже 30% |
| **$F_{20\%}$** | 1,0 | ● | Биодоступность <20% |
| **$F_{30\%}$** | 1,0 | ● | Биодоступность <30% |
| **$F_{50\%}$** | 1,0 | ● | Биодоступность <50% |

По итогам поиска в PeptideSearch для Протегрина-1 был обнаружен один препропептидный предшественник, результаты расщепления ферментами которого представлены в Таблице 3. Стоит отметить, что инструмент PeptideCutter не предполагает возможного фолдинга и/или агрегации белка-предшественника, которое могло бы ограничить доступ ферментов, поэтому в реальных условиях расщеплений может быть меньше,

чем в смоделированных.

Ферменты пищеварения оказывают сильное влияние на расщепление предшественника Протегрина-1, затрагивая в том числе и зрелую последовательность, в то время как собственные ферменты *Sus scrofa* (каспазы-3,-6 и энтерокиназа) не воздействуют на него вовсе. Полученные результаты влияния пищеварительных ферментов на Протегрин-1 соотносятся с данными о его средней стабильности в условиях пищеварительной системы. Тем не менее, если цель состоит в применении пептида в пищевой промышленности в качестве технического вспомогательного средства с антимикробными свойствами, полученные результаты можно считать положительными, ведь пероральный прием Протегрина-1 не окажет негативного влияния на организм человека.

***Таблица 3. Высвобождение Протегрина-1 из препропептидного предшественника под воздействием ферментов***

| **Ферменты пищеварения Homo sapiens** | |
|---|---|
| **Пепсин (pH>2)** | **Трипсин** |
| METQRASL\|C\|L\|GRW\|SL\|W\|L\|L\|L\|L\|A\|L\|VVPSASAQA\|L\|S\|Y\|REAV\|L\|RAVDRL\|NEQS-SEAN\|L\|Y\|RL\|LE\|L\|DQPPKADEDPGTPKPVS\|F\|TVKETVCPRPTRQPPEL\|CD\|F\|KENGRVKQCVGTVT\|L\|DQIKDPL-DITCNEVQGVRGGRL\|CY\|CRRRFCVCVGRG | METQR\|ASLCLGR\|WSLWLLLLALVVPSASAQALSY-REAVLR\|AVDRLNEQSSE-ANLYR\|LLELDQPPKADEDPGTPKPVSFTVKETVCPRPTR\|QPPELCDFK\|ENGR\|VK\|QCVGTVTLDQIK\|DPL-DITCNEVQGVR\|GGR\|LCYCRRRFCVCVGR\|G |
| **Ферменты Sus scrofa** | |
| **Каспаза-3** | **Каспаза-6** |
| METQRASLCLGRWSLWLLLLALVVPSASAQALSY-REAVLRAVDRLNEQSSE-ANLYRLLELDQPPKADEDPGTPKPVSFTVKETVCPRPTRQPPELCDFKENGRVKQCVGTVTLDQIKDPLDITCNEVQGVRG-GRLCYCRRRFCVCVGRG | METQRASLCLGRWSLWLLLLALVVPSASAQALSY-REAVLRAVDRLNEQSSE-ANLYRLLELDQPPKADEDPGTPKPVSFTVKETVCPRPTRQPPELCDFKENGRVKQCVGTVTLDQIKDPLDITCNEVQGVRG-GRLCYCRRRFCVCVGRG |
| **Энтерокиназа** | **Нейтрофильная эластаза** |
| METQRASLCLGRWSLWLLLLALVVPSASAQALSY-REAVLRAVDRLNEQSSE-ANLYRLLELDQPPKADEDPGTPKPVSFTVKETVCPRPTRQPPELCDFKENGRVKQCVGTVTLDQIKDPLDITCNEVQGVRG-GRLCYCRRRFCVCVGRG | METQRA\|SLCLGRWSLWLLLLA\|LV\|V\|PSA\|SA\|QA\|LSY-REA\|V\|LRA\|V\|DRLNEQS-SEA\|NLYRLLELDQPPKA\|DEDPGTPKPV\|SFTV\|KETV\|CPRPTRQPPELCDFKENGRV\|KQCV\|GTV\|TLDQIKDPL-DITCNEV\|QGV\|RGGRLCYCRRRFCV\|CV\|GRG |

***Примечание:** | **- сайт расщепления в препропептидной молекуле; зрелый пептид отмечен желтым цветом***

Нейтрофильная эластаза *Sus scrofa* расщепляла препропептидный предшественник Протегрина-1, причем с высвобождением зрелой последовательности, тем самым активируя ее. Это объясняется локализацией пептида и соответствует его природному механизму высвобождения. *In silico* прогнозирование воздействия ферментов позволяет не только оценить переваримость, потенциальную стабильность и сопоставленную с ней эффективность при применении в зависимости от целей, но также помочь в подборе методов для интенсификации извлечения пептидов из их предшественников [12, с. 134].

**Выводы.**

Существует большое количество биоинформатических инструментов для прогнозирования характеристик БП, они используют разные механизмы и алгоритмы анализа, включая машинное обучение, нейросети, имеющиеся литературные данные. Часто при совмещении результатов анализа, полученных из разных ресурсов, можно заметить несовпадения и противоречия. Для повышения эффективности инструментов *in silico* по-прежнему необходимы дальнейшая разработка программного обеспечения, больше экспериментальных данных и адекватная кластеризация данных. До сих пор их следует рассматривать только как вспомогательные инструменты при скрининге свойств биоактивных пептидов. Тем не менее, биоинформатические ресурсы могут быть чрезвычайно полезны при качественном анализе биоактивных последовательностей перед исследованиями *in vitro* или *in vivo*, в особенности в сочетании с «ручным» биоинформатическим анализом.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: рассмотрен алгоритм *in silico* оценки характеристик биоактивных пептидов, позволяющий оценить биологическое действие, токсичность, стабильность в различных условиях Протегрина-1, а также выявить возможные пути трансформации пептида в процессе пищеварения и *post mortem*. Продемонстрированы ограничения биоинформатических инструментов при сопоставлении результатов анализа, полученных из разных ресурсов. Полученные результаты могут также помочь в разработке методов для интенсификации извлечения биоактивных пептидов из природных источников.

**Финансирование**

***Исследование выполнено за счет гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (Проект № 075-15-2024-483)***

**Литература.**

1. Karelin A.A., Blishchenko E.Y., Ivanov V.T. A novel system of peptidergic regulation // FEBS Letters. 1998. Vol. 428, № 1–2. P. 7–12.
2. Zambrowicz A., Timmer M., Polanowski A., Lubec G., Trziszka T. Manufacturing of peptides exhibiting biological activity // Amino Acids. 2013. Vol. 44, № 2. P. 315–320.
3. Sánchez A., Vázquez A. Bioactive peptides: A review // Food Quality and Safety. 2017. Vol. 1, № 1. P. 29–46.
4. Banić M. et al. An Integrated Comprehensive Peptidomics and In Silico Analysis of Bioactive Peptide-Rich Milk Fermented by Three Autochthonous Cocci Strains // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25, № 4. P. 2431.
5. Тихонов С.Л. Пептидомика: методология оценки функциональной направленности биомолекул на примере пептидов // АПК России. 2023. Т. 30, № 2. С. 290–295.
6. Ramazi S., Mohammadi N., Allahverdi A., Khalili E., Abdolmaleki P. A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools // Database. 2022. Vol. 2022, № 2022, P. 1-17.
7. Santos-Silva C.A. dos et al. Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era // Bioinformatics and Biology Insights. 2020. Vol. 14. P. 1-22.
8. Marco-Ramell A. et al. Biochemical and proteomic analyses of the physiological response induced by individual housing in gilts provide new potential stress markers // BMC Veterinary Research. 2016. Vol. 12, № 1. P. 265.
9. Шамова О.В. и др. Противоопухолевая активность катионного антимикробного пептида из нейтрофилов свиньи Протегрина 1 и его синтетических аналогов // Успехи современного естествознания. 2004. № 3. С. 44–46.
10. Rivero-Pino F., Millan-Linares M.C., Montserrat-de-la-Paz S. Strengths and limitations of in silico tools to assess physicochemical properties, bioactivity, and bioavailability of food-derived peptides // Trends in Food Science & Technology. 2023. Vol. 138. P. 433–440.
11. Tu M. et al. Bioactive hydrolysates from casein: generation, identification, and *in silico* toxicity and allergenicity prediction of peptides // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2018. Vol. 98, № 9. P. 3416–3426.
12. Полищук Е.К., Котенкова Е.А. Прогнозирование действия энзимов для извлечения веществ с антимикробной направленностью действия из организмов Sus scrofa и Bos taurus // Пищевые системы. 2024. Т. 7, № 1. С. 125–136.

**Сведения об авторах**

***Екатерина Константиновна Полищук***
*м.н.с. Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения*
*«ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: e.politchuk@fncps.ru*

**Information about author**

***Ekaterina Konstantinovna Polishchuk***
*Junior Researcher, Experimental Clinic - Research Laboratory of Biologically Active Substances of Animal Origin*
*V.M. Gorbatov Federal Research Center of Food Systems of the RAS*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: e.politchuk@fncps.ru*

УДК:613.29; 615-07; 577-2
ГРНТИ 34.01
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.216-222

**О.В. Багрянцева[1,2], З.Г. Гурэу[2]**
[1]ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»
[2] профессор кафедры гигиены питания и токсикологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова Минздрава России

# АНАЛИЗ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ОЦЕНКИ РИСКОВ БЕЛКОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Анализ методов оценки риска пищевых продуктов, полученных с помощью микробного синтеза, показал, что наибольший риск для здоровья населения представляют белки из-за сложности их очистки. Определены направления совершенствования методических подходов, обеспечивающих безопасность процессов производства таких пищевых продуктов и отсутствие рисков для здоровья населения при их использовании в составе рационов.*

***Ключевые слова:*** *методы оценки риска здоровью, пищевая продукция, требования безопасности, технологические микроорганизмы, белки, ферменты*

**Olga V. Bagryantseva[1,2],**
**Zinaida G. Gureu [1]**
[1] Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology
[2] First Moscow State Medical University. I.M. Sechenov of Health Ministry

# DEVELOPMENT OF METHODOLOGICAL APPROACHES FOR ASSESSING THE RISKS OF PROTEINS PRODUCED USING TECHNOLOGICAL MICROORGANISMS

*An analysis of methods for risks estimation of food obtained using microbial synthesis showed that proteins is greatest risks to public health due to the complexity of its purification. Directions for improving methodological approaches have been identified to ensure the safety of the production processes of such food products and the absence of risks to public health when used as part of diets.*

***Key words:*** *methods for assessing health risks, food products, safety requirements, technological microorganisms, proteins, enzymes*

**Введение.** В настоящее время более миллиарда человек во всем мире недоедают из-за нехватки пищевых продуктов. В соответствии с прогнозами, к 2050 году население земли достигнет 9,7 миллиардов человек. В этой связи, растущий дефицит источников продовольствия представляет серьезную проблему. Особую роль в питании играют белки, являющиеся источниками азота и незаменимых аминокислот, которые необходимы для роста, регенерации клеток и синтеза новых структурных белков, ферментов, гормонов в организме, а также целого ряда других биологически активных веществ. Белки, получаемые при помощи методов биотехнологии, используются в пищевой промышленности также в качестве ферментных препаратов, пищевых добавок, ароматизаторов. Это объясняет необходимость увеличения объемов производства белков с использованием альтернативных, менее дорогостоящих методов – при помощи микробного синтеза. Согласно базе данных компаний GFI (Good Food Institute), в настоящее время 88 компаний ориентированы исключительно или преимущественно на производство белков, получаемых с использованием микроорганизмов (микроводорослей, бактериальных культур и простейших грибов). В 2021 прибыль от реализации такой продукции составила 1,69 миллиарда долларов, что на 285% больше, чем в 2020 году [1,2].

В соответствии с установленными требованиями, белки, получаемые с использованием микробного синтеза, не должны содержать в составе жизнеспособных форм и/или ДНК технологических микроорганизмов, транспозонов, токсинов, антибиотиков и других веществ с антибактериальным действием, аллергенов и других метаболитов, вызывающих негативное действие на организм человека [3-6]. Эти требования обусловливают необходимость использования современных методов очистки белков [7], а также совершенствования методологии оценки рисков здоровью населения при их использовании в пищевой промышленности. В этой связи является важным развитие методологии оценки рисков здоровью потребителей белков, производимых с использованием микробного синтеза.

**Цель работы.** Обоснование развития методических подходов оценки риска здоровью населению белков используемых в пищевой промышленности, производимых с использованием микробного синтеза.

**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.

**Полученные результаты.**

Выбор продукционного микроорганизма имеет большое значение в каждом биотехнологическом процессе. В этой связи микроорганизмы для производства пищевых ингредиентов выбираются с учетом потребности в кислороде и выделения тепла во время ферментации, скорости роста, производства недорогих субстратов, толерантности к температуре и pH, генетической стабильности, морфологии роста, составу конечного продукта и структуры, а также с учетом простоты извлечения и очистки белка. Среди природных штаммов микроорганизмов, используемых в пищевой промышленности, самым высоким содержанием белка характеризуются микроводоросли (60–70 мас.%), за ними следуют бактерии (30–80 мас.%), дрожжеподобные грибы (30–50 мас.%) и простейшие грибы (10–20 мас.%)[1].

Придание новых свойств микроорганизмам при помощи методов биотехнологии (направленная селекция, мутации, генетические технологии) способствует значимым образом увеличить объемы производства пищевых ингредиентов. Согласно отчету GFI в 2021 году около 360 миллионов долларов США было инвестировано в исследования в области производства белков с использованием биотехнологических методов. Лидерами в развитии этих производств являются Сингапур, Израиль, Канада, Европа (в частности Дания), США и Китай [1].

Оценка потенциальных рисков здоровью потребителей при использовании пищевой продукции, получаемой при помощи таких микроорганизмов, связана, прежде всего, с оценкой их возможного негативного действия на организм человека, а также продукции токсичных метаболитов и/или биологически активных веществ нового вида (например, нуклеиновых кислот и/или протеинов), которые могут вызывать опасения относительно их влияния на метаболизм, стабильности, биодоступности, аллергенности, влияния на микробиоценоз кишечника [2].

Риски здоровью потребителей при использовании в пищу белков микробиального происхождения могут быть в значительной степени нивелированы в процессе их очистки. Вместе с тем, традиционная очистка белка – сложный процесс включающий, как правило, три этапа: предварительная обработка, грубое фракционирование и тонкое фракционирование. Каждый этап существенно влияет на чистоту, выход и биологическую активность целевых белков. Такая многоступенчатая очистка белков увеличивает риск потери их активности и требует значительных затрат. Сокращение этапов производства безопасных для здоровья человека белков, снижение себестоимости продукции без потери или снижения активности, а также объема их производства являются важнейшими направлениями развития пищевой промышленности [8,9].

Вопросы обеспечения биологической безопасности в Российской Федерации регулируются Федеральным законом от 30 декабря 2020 г. N 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации», Федеральным законом от 5 июня 1996 года № 86-ФЗ (ред. от 02.07.2021) «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности», а также рядом Постановлений Правительства РФ, определяющих правила государственной регистрации такой пищевой продукции, выпуска ее в окружающую среду, государственного контроля за использованием продуктов генетических технологий, требования к коллекциям штаммов-продуцентов. Регламенты безопасного использования в пищевой промышленности технологических микроорганизмов, предназначенных для производства пищевой продукции, приведены в СанПиН 2.3.2.2340-08. Дополнения и изменения N 6 к СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

В соответствии с законодательством Евразийского экономического союза (ЕАЭС) генетически модифицированные организмы и микроорганизмы ранее не используемые в пищевой промышленности, не прошедшие процедуру оценки рисков здоровью человека, относятся к пищевой продукции нового вида. Таким образом, при производстве (изготовлении) продукции из продовольственного (пищевого) сырья, полученного из ГМО микробного происхождения, должны использоваться линии (штаммы) микроорганизмов, прошедшие государственную регистрацию, в ходе которой должны быть представлены сведения, свидетельствующие о ее безопасности для здоровья человека [10]. Требования безопасного применения пищевой продукции биотехнологичекого происхождения установлены Изменением №2 ТР ТС 029/2012 [11] (Утверждены Решением №84 Совета Евразийской экономической комиссии от 29.08.2023), в котором актуализированы требования к ферментным препаратам, а также к технологическим микроорганизмам (природным, мутантным и генетически модифицированным штаммам). Этим документом введено требование присвоения индивидуального кода-номера каждого штамма-продуцента. Впервые введены требования безопасности к пищевым добавкам и вкусоароматическим веществам микробного синтеза.

Вместе с тем, на сегодняшний день законодательством ЕАЭС не предусмотрены регламенты безопасности для нутриентов (белков, пептидов, аминокислот и других биологически активных веществ, пищевых ингредиентов), получаемых с использованием микробного синтеза. Сложившаяся ситуация несет дополнительные риски здоровью населения, вследствие значимой разницы научных знаний, уровня технологического развития и законодательства различных стран, производимых такую продукцию. Кроме того, сложность очистки белков, в том числе ферментных препаратов, пептидов, делает

приоритетным разработку процедур оценки рисков для этой группы пищевой продукции.

Разработанные ранее в РФ требования к процедурам оценки рисков продукции микробного синтеза [12] требуют значительной доработки с учетом международного опыта и стран имеющих большой опыт производства пищевой продукции биотехнологического синтеза, а также их включения в законодательные акты ЕАЭС.

Согласно требованиям Комиссии Кодекс Алиментариус установлены следующие регламенты, определяющие требования безопасного использования пищевой продукции микробного синтеза (Табл. 1).

***Таблица 1 – Регламенты, определяющие безопасность пищевой продукции микробного происхождения в соответствии с международным законодательством***

| № регламента | Наименование руководства |
|---|---|
| CXG 44-2003 | Principles for the Risk Analysis of Foods Derived from Modern Biotechnology/ Принципы анализа риска пищевой продукции, полученной с помощью современной биотехнологии |
| CXG 46-2003 | Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Produced Using Recombiant-DNA Microorganisms/Руководство по проведению оценки безопасности пищевых продуктов, произведенных с использованием микроорганизмов, созданных на основе рекомбинантной ДНК |
| CXG 74-2010 | Guidelines on Performance Criteria and Validation of Methods for Detection, Identification and Quantification of Specific DNA Sequences and Specific Proteins in Foods/Руководство по критериям эффективности и валидации методов обнаружения, идентификации и количественного определения специфических последовательностей ДНК и специфических белков в пищевых продуктах |
| CXG 76-2011 | Compilation of Codex texts relevant to the labelling of foods derived from modern biotechnology/Сборник текстов Кодекса, касающихся маркировки пищевых продуктов, полученных с помощью современной биотехнологии. |

В Европейском Союзе безопасность пищевой продукции, получаемой биотехнологическими методами, регулируется Постановлением ЕС No 528/2012 [13]. Перечень данных (сведений) представляемых производителем, необходимых для оценки безопасности пищевых добавок, ферментных препаратов и пищевых ароматизаторов приведен в Постановлением ЕС No 562/2012 [14]. Постановлением ЕС No 234/2011 установлены требования к процедурам оценки безопасности пищевых добавок, ферментных препаратов и пищевых ароматизаторов [15]. Европейским агентством по безопасности пищевой продукции (EFSA) разработано и утверждено более 30 нормативных документов, устанавливающих требования безопасности производства и использования пищевой продукции, кормов, средств защиты растений и ветеринарных средств, получаемых с использованием микроорганизмов [16]. По мере поступления новых научных данных и технологий эти требования совершенствуются.

Аналогичные требования к процедурам оценки рисков пищевой продукции, в том числе белков, установлены в развитых странах (США, Канаде, Австралии и др.) [www.fda.gov/, www.canada.ca/en/health-canada.html, www.foodstandards.gov.au/food-standards-code и др.].

Вместе с тем, EFSA в настоящее время планирует актуализировать эти руководства в части [16]:

• категоризации продукции микробиального происхождения. Предлагается разделить их не на 4, а на 3 категории: первая категория, не содержащая рекомбинантной ДНК и жизнеспособных клеток, вторая категория, содержащая рекомбинантную ДНК,

но не имеющая жизнеспособных клеток, и третья категория. содержащие жизнеспособные клетки (в том числе рекомбинантную ДНК);

• требований к производственным процессам: анализа возможности продукции токсичных метаболитов в процессе ферментации, совершенствования способов очистки пищевой продукции микробного синтеза с учетом возможности образования фагов, включающих гены трансмиссии, кодирующих свойства вирулентности, антибиотикоустойчивости, аллергенности, способности к токсинообразованию технологическими микроорганизмами;

• совершенствования методов анализа содержания технологических микроорганизмов в готовом для употребления продукте, а также загрязнения пищевой продукции ксенобиотиками микробиального происхождения;

• совершенствование методических подходов оценки токсикологической безопасности пищевой продукции, получаемой с использованием природных, мутантных и ГМ штаммов микроорганизмов, в том числе при помощи методов биоинформатики (*in silico*), секвенирования ДНК, ПЦР анализа, культур клеток (*in vitro*) и методов экспериментальных исследований с использованием подопытных животных (*in vivo*);

• оценки влияния технологических микроорганизмов и бактериофагов, пищевой продукции микробиального происхождения на микробиом кишечника (включая исследование влияния микробиома на метаболизм и иммунный статус макроорганизма).

Проводимые в последние годы ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» исследования ферментных препаратов и пищевых добавок белковой природы, производимых с использованием мутантных и ГМ штаммов микроорганизмов, были направлены на решение аналогичных задач. Полученные результаты будут учтены в процессе разработки методических рекомендаций, устанавливающих порядок исследований пищевой продукции микробного синтеза. Ввиду высоких рисков здоровью потребителя, наиболее жесткие требования должны быть установлены в отношении требований безопасного использования пищевой продукции на основе белков и пептидов, аминокислот.

**Выводы.**

Анализ требований к процессам производства и процедуре оценки рисков белков, пептидов и ферментных препаратов, получаемых при помощи микробного синтеза, позволил определить направления актуализации методов и процедур, обеспечивающих безопасное использование такой продукции в пищевой промышленности РФ и ЕАЭС.

**Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новым является анализ методических подходов, обеспечивающих безопасность пищевой продукции микробиального происхождения в процессе ее производства и использования в качестве пищевых ингредиентов в пищевой промышленности.

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

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

**Литература.**

1. Baji, B., Vucurovi D., Vasi D., Jevt Mucibabi R., Dodi S. Biotechnological Production of Sustainable Microbial Proteins from Agro-Industrial Residues and By-Products//Foods. 2023. V.12.107. https://doi.org/10.3390/ foods12010107.
2. Quintieri L., Nitride C., De Angelis E., Lamonaca A., Pilolli R. et al. Alternative Protein Sources and Novel Foods: Benefits, Food Applications and Safety Issues/ Nutrients. 2023. V.15, 1509. https://doi.org/10.3390/nu15061509.
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. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use//EFSA Journal.- 2011; V.9(6):2193; http://www.efsa.europa.eu/
5. Aggett P., Aguilar F., Crebelli R. et al. Guidance on safety evaluation of sources of nutrients and bioavailability of nutrient from the sources // EFSA Journal. 2018. V. 16,N 6. Article ID 5294. 35 p.; doi: 10.2903/j.efsa.2018.5294.
6. Методические указания. МУК 2.3.2. 1830-04. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов. М.2004. 56 с.
7. Du M, Hou Z, Liu L, Xuan Y, Chen X, Fan L, Li Z and Xu B Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology /Front. Bioeng. Biotechnol.2022. V. 10:1028691. doi: 10.3389/fbioe.2022.1028691.
8. Du M., Hou Z., Liu L., Xuan Y., Chen X.et al. Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology/Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. V.10:1028691. doi: 10.3389/fbioe.2022.1028691.
9. Qing R., Hao S., Smorodina E., Jin D., Zalevsky A., Zhang S. Protein Design: From the Aspect of Water Solubility and Stability//Chem. Rev. 2022.V. 122. P.14085−14179. doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c0075.
10. Технический регламент таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011).
11. Технический регламент таможенного союза «Требования безопасности пищевых добавок. ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» (ТР ТС 029/2011).
12. Методические указания МУ 2.3.2.1935-04 «Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием генетически модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генетически модифицированные аналоги», М. 2004.45 с.
13. Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products
14. 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.
15. 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 authorisation procedure for food additives, food enzymes and food flavourings.
16. More S., Bampidis V., Benford D., Bragard C., Halldorsson T. et al. Evaluation of existing guidelines for their adequacy for the food and feed risk assessment of microorganisms obtained through synthetic biology. EFSA Scientific Committee//EFSA Journal. 2022. V.20(8):7479, doi: 10.2903/j.efsa.2022.7479.

**Сведения об авторах**

***Ольга Викторовна Багрянцева,***
*доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» 109240, Устьинский пр-д, д.2/14,*
*Москва, Россия,*
*профессор кафедры гигиены питания и токсикологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова Минздрава Москва, Россия,*
*Эл. почта: bagryantseva@ion.ru*

**Information about author**

***Olga V. Bagryantseva,***
*Dr of Biological Sciences, Leading Researcher of Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology, 109240,*
*Moscow, Russian Federation;*
*First Moscow State Medical University. I.M. Sechenov of Health Ministry, 119991*
*Moscow, Russian Federation*
*e-mail: bagryantseva@ion.ru*

***Зинаида Геннадиевна Гурэу,***
*аспирант ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, Москва, Устьинский пр-д, д.2/14,*
*Москва, Россия,*
*Эл. почта: gurzinaida1395@gmail.com*

***Zinaida G. Gureu,***
*postgraduate, Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology, 109240,*
*Moscow, Russian Federation;*
*e-mail: gurzinaida1395@gmail.com*

УДК 34.15.27
ГРНТИ 34.23
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.222-225

**И. Мохаммад, А. Мохамед, Н. Диб, Г.Д. Отинов, Е.И. Кошель**
Университет ИТМО

## ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ СБОРКА ВЫСОКОГОМОЛОГИЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

*В статье обсуждаются путь получение высокогомологичного гена паучего шелка ADF4 из Araneus diadematus. Процесс синтеза этого гена de novo представляет собой не только процесс ПЦР-сборки, но и детального анализа последовательности гена и его оптимизации для синтеза в E. coli. В работе представлена последовательность действий для сборки последовательностей обладающей высокой гомологией.*
***Ключевые слова:*** *генная инженерия, полимеразная цепная сборка, синтез генов de novo.*

**E. Mouhammad, A. Mohamed, N. Deeb, G.D. Otinov, E.I. Koshel**
ITMO University

## POLYMERASE CHAIN ASSEMBLY OF HIGHLY HOMOLOGOUS SEQUENCES

*This paper discusses the pathway for obtaining a highly homologous gene of spider silk ADF4 from Araneus diadematus. The process of de novo synthesis of this gene is not only a process of PCR assembly, but also a detailed analysis of the gene sequence and its optimisation for synthesis in E. coli. This paper presents a sequence of actions for the assembly of sequences with high homology.*
***Keywords****: genetic engineering, polymerase chain assembly, de novo gene synthesis.*

**Введение**.

Процесс сборки полимеразной цепи - основной метод получения рекомбинантных белков, основанный на синтезе генов *de novo*. Этот процесс основан на предварительной фрагментации последовательности гена *in silico* на короткие фрагменты с перекрывающимися областями для их объединения. Алгоритмы фрагментации генных последовательностей могут справиться с фрагментацией последовательностей с несбалансированным GC, наличием нескольких повторов, изменяя температуру отжига и длину фрагмента [1,2]. Однако, синтез генов с высоким уровнем гомологии внутри самого гена является трудоемкой задачей. Эта проблема детальнее раскрывается при синтезе гена паучего шелка *ADF4*.

В ранних работах получения этого белка в клетках *E. coli* [3] опирались лишь на белковую последовательность. Процесс представляется таким: разбивали всю последовательность белка на участки с высокой гомологией, провели выравнивание всех гомологичных участков внутри белка, использовали консунсусную последовательность для перевода в нуклеотидную и синтезировали этот участок *de novo* и приняли ее как за один

участок белка. Таким образом, если белок состоял из N участков, то консенсусную последовательность необходимо повторить N раз, что отразилось на создании экспрессионного вектора. Важной особенностью этого подхода явилось не полная сборка гена, а лишь повторение ре-транслята консенсуса белковой последовательности. Безусловно, этот способ прекрасно справляется с поставленной задачей, а также в очередной раз демонстрируют мощность технологии продукции рекомбинантных белков. Однако, остается вопрос каким образом переводить белковую последовательность в нуклеотидную с минимальной потерей эффективности синтеза, как влияет перенос синтеза такого сложного белка из специализированных клеток в клетки *E. coli*.

Для решения этих вопрос необходимо разработать последовательность работы для быстрой сборки целых последовательностей генов *de novo*. В данной работе мы попытаемся описать процесс полного синтеза гена для экспрессии в *E. coli* BL21 (DE3).

**Цель работы.**

Описание полного процесса синтез гена *ADF4 de novo* для экспрессии в *E. coli* BL21 (DE3).

**Материалы и методы.**

Нуклеотидная последовательность гена *ADF4* была разделена на 8 частей на основании гомологичности участков. Проводили множественное выравнивание последовательности гена с использованием MAFFT v. 7 [4]. Размер каждого участка находился в передел 150 п.о. для удобного синтеза олигонуклеотидов. Так как для всех 8 последовательностей невозможно использовать реакцию ПЦР с перекрыванием, была предпринята попытка сборки *in silico* при помощи реакции Golden Gate [5]. Сборку *in silico* и подбор последовательностей осуществляли в вэб-сервисе Bencling. Важное замечание, сначала необходимо объединить фрагменты 1-4, 5-6, 7-8 после чего получится объединить эти 3 фрагмента в цельную последовательность, каждое объединение проверено при использовании Golden Gate.

Разбиение каждой последовательности нуклеотидов проводили при помощи программы DNAWorks v. 3.2.4 [1] в Google Colab, длина олигонуклеотида от 45 от 50 нуклеотидов, температура отжига от 60 ºC до 68 ºC, концентрация моновалентных катионов 50 мМ, концентрация ионов магния 2 мМ. Вариант с самым минимальным результатом использовали в работе.

Для каждого из участок были подобраны фланкирующие праймеры, содержащие на 5’ концах последовательности сайта узнавания рестриктазы *Bsa* I.

ПЦР сборку проводили в 2 этап. Первый этап: 1x Taq Buffer with KCl (Thermo Fisher, США), 0,2 мМ dNTP (Евроген, Россия), 0,1 мкМ каждого нуклеотида, 2,5 U Taq и 0,25 U Pfu полимераз, 2 мМ MgCl2. MgCl2 добавляли после достижения смесью температуры 95 ºC в амплификаторе BioRad T100 (BioRad, США). Протокол ПЦР: 95 ºC – 5 мин., следующие 30 циклов: 95 ºC – 15 сек., 60 ºC – 20 сек., 68 ºC – 30 сек. Второй этап, 1x Taq Buffer with KCl (Thermo Fisher, США), 0,2 мМ dNTP (Евроген, Россия), 0,25 мкМ фланкирующих праймеров, 2,5 U Taq и 0,25 U Pfu полимераз, 2 мМ MgCl2, в качестве матрицы используется разведенная в 100 раз смесь 1-го раунда сборки (на каждые 20 мкл ПЦР смеси 2-го раунда сборки – 1 мкл разбавленного продукта 1-го раунда сборки).

Полученные фрагменты клонировали при помощи набора CloneJET (Thermo Fisher, США) в соответствии протоколом производителя. *E. coli* XL-1 Blue трансформировали лигазными смесями. ПЦР-скрининг колоний проводили с использованием ScreenMix (evrogen, Россия) согласно протоколом производителя.

**Полученные результаты.**

Последовательность гена была поделена на 8 частей, согласно множественному выравниванию в MAFFT v. 7. Каждая из частей была разбита на олигонуклеотиды для ПЦР сборки программы DNAWorks v. 3.2.4 (см. материалы и методы). Фланкирующие последовательности праймеров были подобраны для каждой части с учетом объединения их в одной реакции Golden Gate. Однако, такое деление лишь условно и

экспериментальная сборка будет происходить в несколько этапов: сначала будут объединены фрагменты 1-4, 5-6, 7-8, после чего объединение этих 3 фрагментов будет проведено с использованием Golden Gate.

Сборку частей гена проводили при помощи полимеразной цепной сборки. Важно отметить, что при сборке важно использовать буфер, содержащий KCl. При использовании буфера с $(NH_4)_2SO_4$ ни один из фрагментов не был собран. Для выявления клонов, не содержащих ошибки в последовательностях, было взято по 4 клона на секвенирование, согласно рекомендациям описанным в работе By и соавторов [2].

**Выводы.**

На данном этапе были собраны последовательности всех 8 частей гена *ADF-4* с использованием полимеразной цепной сборки. Была создана библиотека фрагментов для секвенирования по Сэнгеру.

**Заключение**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: общая последовательность действий к синтезу генов с высокой гомологией. Так изначально необходимо разбить всю белковую последовательность на гомологичные участки. Провести процедуру Golden Gate сборки *in silico*, чтобы убедиться в возможности объединения частей гена в одну реакцию или несколько последовательных реакций. Разбить финальные последовательности частей на олигонуклеотиды. Важно отметить, что в последовательность части может уже входить сайт узнавания рестриктазы для Golden Gate.

**Литература.**

1. Hoover D.M., Lubkowski J. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis // Nucleic Acids Res. 2002. Vol. 30, № 10. P. e43.
2. Wu G. et al. Simplified gene synthesis: A one-step approach to PCR-based gene construction // Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 124, № 3. P. 496–503.
3. Teulé F. et al. A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning // Nat Protoc. 2009. Vol. 4, № 3. P. 341–355.
4. Katoh K. et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform // Nucleic Acids Research. 2002. Vol. 30, № 14. P. 3059–3066.
5. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability | PLOS ONE [Electronic resource]. URL: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0003647 (accessed: 18.02.2024).

**Сведения об авторах**
***Илин Мохаммад***
*Магистрант 1 года обучения*
*Университет ИТМО*
*Санкт-Петербург, Россия*
*Эл. почта: mouhammed_ellen@scamt-itmo.ru*
***Аль-Аббас Мохамед***
*Аспирант 1 года обучения*
*Университет ИТМО*
*Санкт-Петербург, Россия*
*Эл. почта: alabbass@scamt-itmo.ru*
***Наируз Диб***
*Университет ИТМО*
*Аспирант 2 года обучения*
*Санкт-Петербург, Россия*
*Эл. почта: deeb@scamt-itmo.ru*

**Information about author**
***Ellen Mouhammad***
*1st year Master student*
*Университет ИТМО*
*Saint-Petersburg, Russian Federation*
*E-mail: mouhammed_ellen@scamt-itmo.ru*

***Al-Abbass Mohamed***
*1st year PhD student*
*Университет ИТМО*
*Saint-Petersburg, Russian Federation*
*E-mail: alabbass@scamt-itmo.ru*
***Nairouz Deeb***
*Университет ИТМО*
*2nd year PhD student*
*Saint-Petersburg, Russian Federation*
*E-mail: deeb@scamt-itmo.ru*

***Георгий Дмитриевич Отинов***
*Университет ИТМО*
*Аспирант 2 года обучения*
*Санкт-Петербург, Россия*
*Эл. почта: otinov@scamt-itmo.ru*
***Елена Ивановна Кошель***
*к.б.н., доц., зав. лабораторией молекулярной диагностики*
*Университет ИТМО*
*Санкт-Петербург, Россия*
*Эл. почта: koshel@scamt-itmo.ru*

***Georgy Dmitrievich Otinov***
*2nd year PhD student*
*Университет ИТМО*
*Saint-Petersburg, Russian Federation*
*E-mail: otinov@scamt-itmo.ru*
***Koshel Elena Ivanovna***
*Университет ИТМО*
*PhD, assistant professor, head of molecular diagnostic lab*
*Saint-Petersburg, Russian Federation*
*E-mail: koshel@scamt-itmo.ru*

УДК 574.64-0.36 + 628.355
ГРНТИ 34.27.49
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.225-229

**Я.В. Саванина,**
МГУ имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет.

## ИНТЕНСИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ САМООЧИСТКИ В УСЛОВИЯХ ЗАЛПОВОГО СБРОСА.

*В статье изучаются возможности создания биогибридных материалов на основе смешанно-раздельной культуры цианобактерий и гетеротрофных бактерий, выделенных из загрязненных сред, и их использования в условиях сверхнормативных загрязнений.*
***Ключевые слова:*** *цианобактерии, бактерии, иммобилизованные культуры, водная токсикология, биологическая очистка, микропластик.*

**Y. V. Savanina**
School of Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University

## NTENSIFICATION OF BIOLOGICAL SELF-CLEANING UNDER CONDITIONS OF SLOPE DISCHARGE.

*The article studies the possibilities of creating biohybrid materials based on a mixed-separate culture of cyanobacteria and heterotrophic bacteria isolated from polluted environments, and their use in conditions of excess pollution.*
***Keywords****: cyanobacteria, bacteria, immobilized cultures, water toxicology, biological treatment, microplastic,*

### Введение

Круговорот веществ в природе включает их трансформацию, расщепление и синтез. Загрязнение (антропогенное, техногенное) – чисто человеческие понятия. Задача очистки состоит в том, чтобы вернуть позаимствованные вещества в биосферу, изъяв и переработав то, что может нанести ей вред. Материалы и сооружения биологической очистки cke;fnсредством трансформации трудноразлагаемых веществ в биодоступные. К основным загрязнителям природных вод относятся тяжелые металлы, углеводороды, в последние десятилетия к ним вплотную приближаются эвтрофикационное и пластиковое загрязнение [1, 2].. В условиях сверхнормативных загрязнений – аварийный залповый сброс загрязнителей, избыточные осадки, таяние снега и возрастающие в последние годы паводки - необходимо применение дополнительных средств. В больших городах уборка снега, поступающего в снеготопку и далее в очистные сооружения (+18º) «разбивает» нагрузку. Паводковые же воды помимо накопленных техногенных загрязнителей могут содержать сельскохоз-яйственные пестициды, отходы и сточные воды, поскольку

коммунальные очистные сооружения города не справляются с многократно повышенным объемом воды. Добавляются и хлорсодержащие вещества, применяемые для дезинфекции.

**Цель работы.**

Изучить возможность получения материала для биологической очистки загрязненных сред при внезапном увеличении нагрузки (залповый сброс, разлив рек) на основе диффузионной культуры цианобактерий с гетеротрофными бактериями, выделенными из загрязненных сред.

**Материалы и методы.**

Использовали культуры нитчатых цианобактерий *Nostoc sp.*,и *Anabaena sp.* из коллекции кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и бактериальные ассоциации, выделенные из загрязненных местообитаний [3].

Выращивали культуры и проводили эксперименты на минеральной среде «С» в периодическом суспензионном и периодическом диффузионном (далее в тексте «периодическом» и «диализном» соответственно) режимах культивирования цианобактерий. В ассоциативной (смешанно-раздельной) культуре автотрофный компонент помещали внутрь диализного мешка, а гетеротрофные бактерии - во внешний объем. В качестве диализных мешков использовали пищевую целлофановую прозрачную оболочку диаметром 25 мм.

Для выделения бактериальных ассоциаций из загрязненных сред использовали 5-7 дневную диализную культуру, во «внешнюю» среду вносили аквариумный грунт, грунт из промышленного водоема, почву с бензоколонки.

В качестве модельных загрязнителей использовали эвтрофицированную воду, растворы тяжёлых металлов и частицы микропластика двух видов – аптечный препарат на гелевой основе и размолотые частицы твёрдого пластика (до 1 мм), а также их смеси [3, 4].

В качестве носителей использовали целлофановую оболочку, марлю, микроцеллюлозу (Cellulose microcrystallic «Ankir-B»), хитозан, LipoSan ULTRA®), нетканый укрывной материал (17 г/м$^2$) и частицы микропластика.

Для концентрации иммобилизованных бактерий использовали центрифугирование.

Уровень детоксикации среды оценивали по остаточному содержанию действующего вещества в среде, а также с использованием диализной тест-культуры *Synechococcus* 6301 [3, 5].. Количество частиц микропластика в среде определяли при микроскопировании.

**Полученные результаты.**

Очистные сооружения моделируют естественные процессы, происходящие в почве и водоёмах, усиливая их эффективность. К основным методам интенсификации очистки можно отнести аэрацию, иммобилизацию и целенаправленное формирование микробных ассоциаций.

Аэрация способствует интенсификации окисления органических веществ.

Иммобилизацию можно рассматривать как физическое разделение биокатализатора (клеток или ферментов) и растворителя, при котором молекулы субстрата и продукта могут легко обмениваться между фазами. Данный подход совмещает в себе сорбцию и концентрирование загрязняющего вещества на твердофазной подложке вблизи иммобилизованных бактериальных клеток, что делает его более доступным для последующего окислениями [6,7 ]. Для иммобилизации используются как органические, так и неорганические материалы. Существующие в настоящее время органические полимерные носители можно разделить на два класса: природные полимеры и синтетические полимерные носители. Из природных полимеров в качестве носителей были использованы полисахаридные – целлюлоза, хитозан, агар. В качестве синтетического полимерного носителя использовался укрывной материал (волокна ПВХ) Иммобилизованная культура

характеризуется сниженной скоростью роста и фотосинтеза при сохранении высокой скорости метаболизма [3, 6].

Ферментное разнообразие микробных ассоциативных систем способствует детоксикации стоков от загрязнений сложного состава .

Диффузионная (диализная) культура представляет собой одну из разновидностей культуры иммобилизованных клеток. При данном типе культивирования клетки микроорганизмов находятся в мешке из полупроницаемой мембраны, погруженном в не менее чем 10-кратный объем «внешней среды». Благодаря этому обеспечивается непрерывное поступление питательных веществ и отток метаболитов, ингибирующих клеточное деление. Свободному прохождению молекул токсикантов (как и других веществ с молекулярной массой до 8-10 kDa) диализная мембрана не препятствует. [3].

Использование диализных систем облегчает как выделение устойчивых штаммов из природных субстратов, так и подбор компонентов для смешанных культур. При разделении двух групп микроорганизмов полупроницаемой мембраной их взаимодействие осуществляется на уровне продуктов метаболизма: цианобактерии выделяют кислород и органические вещества, которые поддерживают рост бактерий и способствуют накоплению ионов и взвесей металлов в ближайшем окружении клеток; бактерии в свою очередь обеспечивают окисление, восстановление и осаждение токсикантов. Ингибирующий эффект, связанный с межклеточными контактами отсутствует: в природных ассоциациях суммарный гетеротрофный компонент, обеспечивающий ферментное разнообразие, составляет 0,1–1%, при диализном культивировании доля бактерий – до 10-20% [3].

Цианобактериально-бактериальная ассоциация способствует достаточно полной детоксикации водной среды от смешанных стоков, содержащих металлы и ряд органических веществ [3]. В существующей искусственно созданной экосистеме – активном иле,– связывающая поверхность составляет до 100 $м^2$/г сухой массы, Гранулы, размером < 1 мм состоят из множества клеток микроорганизмов, объединенных биополимерным гелем в хорошо защищенное и организованное структурно-функциональное целое – хлопья. Как и выделенных нами ассоциациях из загрязненных местообитаний, наиболее многочисленны бактерии р. Pseudomonas – до 80%. В геле содержатся главным образом полисахариды (молекулярный вес 20000-1000000 и выше), основная роль в их образовании принадлежит капсульной бактерии Zoogloea ramigera, близкой по свойствам к псевдомонадам [7]. Связывающая поверхность цианобактериальной ассоциации равна поверхности диализной мембраны.

Мелкие взвешенные трудноразлагаемые частицы в значительной степени представлены «микропластиком». В настоящее время этот термин означает частицы синтетических полимеров или сополимеров, размером от нм до 5 мм. [2, 2]. Эти частицы накапливаются главным образом в поверхностном слое воды, частично обнаруживаются и в донном осадке, а также в растениях, животных, биологических жидкостях людей, питьевой воде [7]. От 3 до 12 миллиардов частиц размером от 100 нм до 6 мкм переходит в жидкость из одного чайного пакетика при заваривании. При этом не существует ни чётких методик по определению таких частиц, ни способов очистки от них. Установки по очищению сточных вод проходят до 10-30% неразлагаемых частиц, наиболее распространенными загрязнителями этого типа являются частицы бисфенола А и полистирола [2, 9].

Для повышения эффективности очистки от взвешенных в водной среде мелких частиц смешанно-раздельной культурой необходимы 1) максимальная связывающая поверхность, 2) возможность связывать достаточно крупные частицы, которые не пропускают поры диализной плёнки, 3) минимизация межклеточных контактов между цианобактериями и бактериальными ассоциациями (сохраняя взаимодействие на уровне экзометаболитов).

В диализном мешке накапливаются преимущественно высокомолекулярные полисахариды, а низкомолекулярные диффундируют во внешний объем. В пересчете на

общий объем к достижению стационарной фазы биомасса диализной культуры в 2,5-3 раза выше, чем в периодической (в пересчёте на объём мешка - в десятки раз); а содержание хлорофилла превышает таковое в периодической культуре в 6 раз. .В результате диффузионная культура цианобактерий представляет собой вязкую суспензию: концентрация углеводов в диализном мешке 6 раз выше, чем снаружи (и в 3 раза - чем в периодической культуре). Как и полисахариды клеточной оболочки, диффузионный слой экзополисахаридов выполняет барьерную функцию между организмом и окружающей средой, в частности, связывая химически активные или трудноразлагаемые вещества. В экспериментах исследуемый раствор, содержащий частицы геля (~0,5 мм) очищался за 15-60 мин на ~90%, фиксировались только отдельные частицы, основная масса их оседала на поверхности диализного мешка. При использовании фрагментов мешка наблюдается аналогичный эффект – частицы микропластика и цианобактерии связываются высокомолекулярными полисахаридами с образованием рыхлых хлопьевидных скоплений - флокул и оседают на дно. [4].

Для выделения бактериальных ассоциаций из загрязненных местообитаний культура цианобактерий выращивалась в течение недели, затем во внешнюю среду помещали грунт из загрязненных местообитаний, через 2-5 сут наблюдалось помутнение среды, при микроскопировании обнаруживались бактерии. Далее во «внешнюю» среду вводили модельные частицы микропластика (пыль полистирола (< 1 мм) и аптечный гель), выдерживали 1-2 сут, после чего извлекали диализный мешок и концентрировали бактериальную взвесь центрифугированием. На 1-2 сутки наблюдалась поверхностная колонизация бактериальными ассоциациями как «округлых», сферических или аморфных частиц геля, так и «абразивных» фрагментов размолотого пластика.

Для получения полисахаридной суспензии цианобактерии выращивали в мешках 2-3 недели. Полисахариды способствуют сохранению воды и поддерживают жизнеспособность клеток при хранении. Далее целлофановая оболочка с обрастаниями разрезалась на фрагменты, а суспензия наносили на подложки из природных и синтетических полимеров, либо смешивали с 2% агаром [5] и после застывания протирали через ячейки 1 мм. Суспензия на подложках (включая целлофановую мембрану) подсушивалась на воздухе при комнатной температуре, затем на него наносилась взвесь, содержащая колонизированные частицы пластика (так уменьшается площадь непосредственных клеточных контактов цианобактерий и бактерий), после чего полученный материал можно было хранить в холодильнике (+5$^{o}$) до использования. Гранулы также смешивались со взвесью. Проверку детоксикации стоков проводили в колбах (750 мл) или прозрачных пластиковых бутылях (1.5 л). «Лент» или квадратов общей площадью 5 см$^2$ было достаточно для очистки 0, 5 л воды от различных вариантов смешанных токсикантов. Наиболее удобны в использовании марля и нетканый материал, менее – гранулы (агар, микроцеллюлоза, хитозан). После связывания загрязнителей флоккулы оседают быстрее, чем клетки на подложке.

Природные полимеры – целлюлоза (марля, микроцеллюлоза, целлофан), хитозан ц разлагаются при компостировании, Целлофановая мембрана разлагается быстрее всего - при биотестировании природных вод содержащих бактерии, разрушающие целлюлозу) диализный мешок с цианобактериями разрывался под собственным весом при попытке извлечь его (более 3-7 дней) или на границе водной и воздушной среды (при фиксации мешка на стеклянной трубке для отбора проб) [4] Укрывной материал состоит из полипропиленовых волокон, склеенных высокой температурой, он не разлагается, но удобен в использовании и не мешает при компостировании.

**Выводы.**

Проанализирована возможность получения материала для биологической очистки загрязненных сред при внезапном увеличении нагрузки (залповый сброс, разлив рек) на основе диффузионной культуры нитчатых цианобактерий с гетеротрофными бактериями, выделенными из загрязненных сред. Показано, что очистка от

распространённых в городской среде токсикантов – тяжёлых металлов, эвтрофикационных загрязнителей и частиц микропластика осуществляется достаточно эффективно. Наибольший эффект при очистке стоков сложного состава наблюдался при использовании смешанно-раздельной культуры цианобактерий, иммобилизованных на подложках из природных или синтетических полимеров или в гранулах агара, и бактериальных ассоциаций, связанных с частицами микропластика .При данном типе культивирования соблюдаются основные условия – максимальная связывающая поверхность, повышенное количество экзополисахаридов, участвующих в связывании и обезвреживании токсикантов, сохранение смешанно-раздельного состояния культуры, обеспечивающего наиболее эффективное взаимодействие автотрофного и гетеротрофного компонента и использование способности бактерий к колонизации частиц микропластика.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Материал, полученный на основе ианобактериальный ассоциации с гетеротрофными бактериями может применяться при очистке воды от загрязнителей, в том числе при внезапном увеличении токсической нагрузки. К числу достоинств материала можно отнести :максимальную связывающую поверхность, повышенное количество экзополисахаридов, участвующих в связывании и обезвреживании токсикантов, и способствующих сохранению культуры цианобактерий до применения и использование способности бактерий к колонизации частиц микропластика для сохранения смешанно-раздельного состояния культуры, обеспечивающего наиболее эффективное взаимодействие автотрофного и гетеротрофного компонента.

**Литература.**


1. Янин Е.П. Ремедиация территорий, загрязненных химическими элементами: общие подходы, правовые аспекты, основные способы (зарубежный опыт). Проблемы окружающей среды и природные ресурсы: обзорная информация/ ВИНИТИ РАН. 2014. № 3. С.3-105.
2. Eriksen, M., Lebreton, L., Carson, H., Thiel, M., Moore, C., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. and Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250 000 tons afloat at sea. *PLoS ONE 9*, e111913. https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0111913
3. Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. Диализное культивирование цианобактерий. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2008. № 2. С. 16-25.
4. Саванина Я.В., Барский Е.Л., Фомина И.А., Лобакова Е.С. **2**019. Загрязнение водной среды микропластиком: воздействие на биологические объекты, очистка//ИТНОУ. № 2. С. 54-58.
5. Саванина Я.В., Барский Е.Л., Фомина И.А., Лобакова Е.С. Диализная культура цианобактерий в биомониторинге качества водной среды. Материалы XXV Международн. конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». М.: ООО «Новые информационные технологии». 2016. С. 249-261.
6. Васильева С.Г.,. Лобакова Е.С.,. Лукьянов А.А. 2016. Применение иммобили-зованных водорослей в биотехнологии // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. М.: Изд-во Моск. ун-та. № 3. С. 65-72.
7. Тимакова Д.Н., Ксенофонтов Б.С. Использование активного ила в качестве биофлокулянта // Universum: Химия и биология : электрон. научн. журн. 2016.



**Сведения об авторах**

***Янина Вячеславовна Саванина,***
*кандидат биол. наук., инж.*
*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,*
*биологический факультет,Эл. почта: v.savanin@gmail.com*

**Information about author**

***Yanina Viatcheslavovna Savanina***
*PhD, School of Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University*
*E-mail: v.savanin@gmail.com*

УДК 575.83
ГРНТИ 34.23.01
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.230-234

**С.В.Шестаков[1,2], Е.А.Карбышева[1]**
[1]Кафедра генетики МГУ имени М.В.Ломоносова
[2]Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН

# К ОБСУЖДЕНИЮ ГИПОТЕЗ О ПРОИСХОЖДЕНИИ ЖИЗНИ

*В рамках гипотезы о дискретном происхождении архей и бактерий рассмотрены сведения о радикальных различиях между этими доменами в мембранных липидах, процессе репликации и некоторых других клеточных системах. На основе этой информации предложена нетривиальная трактовка проблемы происхождения жизни: предполагается, что жизнь могла зарождаться на Земле неоднократно и асинхронно (во времени) в локально-разных геохимических зонах, различающихся по физико-химическим условиям, зависящим от многих природных факторов.*

***Ключевые слова:*** *происхождение жизни, археи, бактерии, абиотические синтезы, мембранные фосфолипиды, протоклетки*

**S.V.[1,2]Shestakov, E.A.[1] Karbysheva**
[1]M.Lomonosov Moscow state university, genetic department
[2] N.Vavilov Institute of general genetics Russian Academy of Sciences

# ON DISCUSSING HYPOTHESES RELATED TO THE ORIGIN OF LIFE

*In the frame of hypothesis on discrete origin of archea and bacteria a radical differences between these domains are considered: it concerns membrane phospholipids, replication apparatus and some other cell systems. Based on this information nontrivial view on the problems of the origin of life is presented. As supposed life on Earth might have arised multiple times and asynchronously in various local geochemical zones with different physico-chemical conditions dependent on many natural factors*

***Keywords:*** *Life origin, archaea, bacteria, abiotic synthesis, membrane phospholipids, protocells*

Обсуждение проблем происхождения жизни на Земле имеет виртуальный характер из-за отсутствия надежных сведений о геохимических процессах в эпоху формирования облика планеты и в период зарождения жизни (более 4х миллиардов лет назад). Не представляется возможным осуществить экспериментальную проверку гипотез о том, каким образом происходил переход от абиотических синтезов к образованию первичных протоклеток. Эти гипотезы базируются на логических построениях, дающих простор для выбора аргументов и интерпретаций, отражающих, как правило, интересы участников дискуссии в определенной области знаний (биохимии, микробиологии, генетики, биоинформатики и др.). Обсуждение ведется под знаком (если не гипнозом) двух общепринятых догматических постулатов:

1) жизнь на Земле зародилась однократно и поэтапно эволюционировала через серию «узких горлышек» отбора до современных видов организмов;

2) все многообразные формы организмов имеют общее происхождение из одного условного корня. Эта концепция выражена в представлениях о LUCA (гипотетический универсальный общий предок, из которого возникли первичные домены — археи и бактерии).

В данном очерке в ракурсе критического отношения к этим консенсусным постулатам кратко изложена ранее высказанная нами гипотеза о дискретном происхождении архей и бактерий [1]. В этой гипотезе допускается возникновение предпосылок независимого происхождения двух этих доменов в ходе добиологических процессов абиогенеза, а не в результате расхождения ветвей архей и бактерий на уровне LUCA. Такой подход основан на концепции «химической эволюции» [2], согласно которой развитие (прото) метаболизма предшествовало становлению систем

самокопирования/репликации, генетического кодирования и аппарата трансляции [3].

Получили развитие представления о том, что истоки метаболизма современных организмов были заложены в абиогенезе в результате сопряжения химических синтезов и образования упорядоченных цепочек химических реакций, составляющих «химические экосистемы» [3], эволюционирующие путем избирательного ускорения аутокаталитических процессов и кооперативного взаимодействия различных химических сетей [2]. Такие события происходили до появления LUCA [4], природа которого имеет различные трактовки в понятиях молекулярной филогеномики: а) LUCA как клетка с развитым геномом и метаболизмом, подверженная эволюции по схемам Дарвиновского отбора; б) как консорциум протоклеток (прогенот) [5,6] эволюционирующий как целое сообщество за счет интенсивных горизонтальных обменов метаболитами и генетическими элементами между протоклетками.

В принципиальном для эволюционной биологии вопросе о том, почему и каким образом произошла дихотомия доменов, особое внимание уделено анализу различий между археями и бактериями в структуре и стереоспецифичности мембранных фосфолипидов. У архей такие липиды содержат изопреновую группу, соединенную с глицерол-1-фосфатом, а у бактерий стереохимически противоположный глицерол-3-фосфат связан с жирной кислотой. Синтез глицерол-специфичного остова катализируется у архей и бактерий негомологичными дегидрогеназами различного филогенетического происхождения [7]. На основе этих сведений было высказано предположение о том, что бактерии и археи могли возникнуть независимо из внеклеточного предка в процессе формирования у него фосфолипидов различного типа. Сходные представления разрабатывались и другими авторами, предложившими гипотезу о зарождении предшественников клеток в неорганических ячейках морских гидротермальных зон, где липидоподобные структуры могли участвовать в организации протометаболизма и систем энергетического обеспечения [8]. Рассматривались варианты дивергенции доменов из клеточного LUCA, обладавшего гетерохиральными мембранами [9,10]. Однако идеи о расхождении архей и бактерий в результате селекции на монохиральность мембран при сегрегации линий клеток или редукционных преобразований LUCA не получили экспериментального подтверждения [1].

Как происходило замещение абиотического синтеза липидов на ферментативные механизмы остается неясным, но то, что липиды играли первостепенную роль на ранних этапах эволюции, сомнений не вызывает. Они обеспечили условия для концентрирования субстратов химических реакций в замкнутой структуре, в которой происходило развитие протометаболизма и синтез полирибонуклеотидов и пептидов. Химически синтезированные липидные соединения (в частности, жирные кислоты) способны к образованию однослойных мицелл и двуслойных везикул путем репродуктивной самосборки [11]. Везикулы обладают аутокаталитическими свойствами (как липозимы по аналогии с РНК-рибозимами) и оказывают каталитическое действие на разные процессы протометаболизма [12]. Репликация молекул РНК внутри таких везикул явилась важнейшим шагом в строительстве первичных протоклеток [13].

Понимание значимости абиогенного синтеза липидов в процессе формирования протомембран легло в основу концепции «липидного мира» [12], предшествовавшего РНК-миру. Информация о ключевой роли абиотических синтезов липидов не противоречит гипотезе дискретного происхождения первичных доменов, обладающих радикально различными фосфолипидными мембранами. Археи и бактерии различаются также и по ряду других существенных характеристик, которые касаются: 1) структуры и свойств клеточных стенок; 2) систем транспорта, секреции, клеточного деления;

3) белкового состава жгутиков и пилей, ответственных за подвижность клеток;

4) функционирования протеосом, систем деградации дефектных белков; 5) строения АТФаз и трансмембранного механизма генерации энергии; 6) процессов метилирования (археям свойственна система синтеза тетрагидрофолата, связанная с

метаногенезом; у бактерий метаноптерин обслуживает процесс ацетогенеза); 7) набора минорных белков в рибосомном комплексе; 8) ферментов модификации транспортной РНК и факторов инициации трансляции и транскрипции. Особого внимания заслуживает природа различий в аппарате репликации ДНК, заместившей РНК-геномы при переходе от протоклеток к клеточным линиям. У многих белков (праймазы, хеликазы и др.), участвующих в репликации ДНК у архей, нет гомологии с белками, выполняющими подобные функции у бактерий [14]. У многих архей репликазой является белок PolD (у других, как и у эукариот, — PolB), тогда как у бактерий репликация осуществляется исключительно ДНК-полимеразой PolC, не имеющей гомологии с другими ДНК-полимеразами. Исходя из представлений об эволюционно позднем происхождении ДНК (на завершающем этапе РНК-мира) высказано предположение, что различия в системах репликации ДНК возникли в результате эволюционных преобразований в LUCA как клеточной структуры [15]. Но по совокупности многих аргументов более убедительным выглядит утверждение о возможности независимого происхождения систем репликации у архей и бактерий на этапе перехода от прогенот к клеткам [16]. Мы полагаем, что предпосылки расхождения доменов могли формироваться еще в до-LUCA периоде [4], на что указывают молекулярно-филогенетические исследования, свидетельствующие о высоких темпах эволюции на самых ранних ее этапах [17].

В контексте обсуждения путей абиогенных синтезов предложено несколько альтернативных сценариев с разными начальными этапами синтеза органических веществ, участвовавших в становлении протометаболизма. В одной версии водород, используемый для восстановления $CO_2$, выделялся в процессе образования пирита из минерального сульфида железа. В другом сценарии ведущая роль отведена цинку, магнию, на поверхности кристаллов которых происходит восстановление $CO_2$ с образованием муравьиной кислоты, тиометилацетата и различных С-соединений, необходимых для синтеза азотистых оснований и аминокислот. Системы «железо-серного» и «цинкового» мира, а также возможные пути усвоения $CO_2$ в абиогенезе предметно рассмотрены в монографии М.Никитина [18]. Эти сведения указывают на вариативность процессов функционирования химических экосистем в абиогенезе.

Альтернативными являются и основные гипотезы абиотических предпосылок зарождения жизни. Получила распространение гипотеза возникновения жизни в зоне морских гидротермальных источников, где в неорганических железо-сульфидных ячейках в щелочной среде происходило геохимическое образование водорода, служившего донором электронов для восстановления $CO_2$ и генерации энергии, используемой для синтеза органических соединений и становления первичных протоклеток [8]. Согласно другой гипотезе [19] жизнь зародилась в континентальных мелководных водоемах, куда поступал пар из наземных горячих источников и различные химические элементы минерального происхождения. Преимущество второй модели заключается в более благоприятных природных условиях (по сравнению с морской средой) для развития протоклеток. Это относится к температуре, высокому содержанию $CO_2$ в атмосфере, доступности растворимых форм химических элементов (в частности фосфора); наличию пористой поверхности, нужной для сопряжения абиотических процессов, использования солнечной энергии для осуществления фотохимических синтезов.

Гипотезы о происхождении жизни, сопряжении абиогенеза с возникновением протоклеток и первичных доменов прямо связаны с вопросом о природе LUCA (в клеточной или доклеточной форме). По существу, LUCA является абстрактным понятием — это не физическая структура, а скорее процесс, в ходе которого через горизонтальные переносы и кооперативное взаимодействие протоклеток в консорциуме происходит их усложнение и автономизация [20]. Такое понимание сущности LUCA позволяет признать возможным возникновение на старте эволюционного процесса нескольких независимых вариантов LUCA, некоторые из которых развивались, а другие элиминировались [21,22]. В этом смысле логично предполагать, что в геохимически различных нишах

могли возникнуть LUCA различного типа. Таким образом допускается множественность актов зарождения жизни, зависящих от локальных физико-химических условий, определяющих пути формирования протометаболизма и, соответственно, свойства возникающих протоклеток. Из признания множественности актов зарождения жизни вытекает вывод об асинхронности этих событий во времени (возможно предшественники архей и бактерий возникли в разные периоды). На основе дедуктивных размышлений можно полагать, что жизнь на Земле зарождалась не один раз и не в одной единственной локации. Это могло происходить на протяжении всего периода существования благоприятных локальных физико-химических условий анаэробного абиогенеза радикально отличавшихся от условий современной биосферы с ее кислородной атмосферой и динамичными биогеохимическими циклами.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие заключения: резюмируя обсуждение гипотез о происхождении жизни можно заключить, что предпосылки возникновения протоклеток (предшественников архей и бактерий) закладывались при формировании систем протометаболизма, различия между которыми зависели от большого числа природных факторов: 1) источников энергии (УФ-радиация, радиоактивность нестабильных изотопов, геохимическое образование водорода и т. д.); 2) наличия, состояния и концентрации химических элементов (сера, железо, цинк и др.), органических соединений (в том числе привнесенных из космоса), различных катализаторов; 3) условий среды - температуры, PH, давления, воды, газов, структуры поверхности, на которой происходило сопряжение химических процессов. Различия в сочетании этих параметров определяли свойства химических «экосистем» и, соответственно, протоклеток различного типа. При переходе от РНК-мира к ДНК-геномам и ферментативным системам метаболизма происходила сегрегация популяций протоархей и протобактерий. Одновременно шли процессы конвергенции, унификации, консолидации, ко-эволюции клеточных систем (генетического кода, аппарата трансляции, генно-метаболических сетей), ответственных за воспроизводство и реализацию генетической информации, определяющей жизнедеятельность организмов.

**Литература.**

1. Шестаков С.В., Карбышева Е.А. О дискретности происхождения архей и бактерий // Эволюция биосферы с древнейших времен до наших дней. 2019. М. ПИН. С.25-35.
2. Melendez-Hevia E., Montero-Gomes N., Montero F. From prebiotic chemistry to cellular metabolism - The chemical evolution of metabolism before Darwinian natural selection // J. Theor. Biol. 2008. V.252. P.505-519.
3. Baum D.A., Peng Z., Dolson E., Smith E., Plum A.M., Gagrani P. The ecology-evolution continuum and the origin of life // J. R. Soc. Interface. 2023. V.20. P.20230346.
4. Cornish-Bowden A., Cardenas M.L. Life before LUCA // J. Theor. Biol. 2017. V.434. P. 68-74.
5. Woese C.R. On the evolution of cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V.99. P.8742-8747.
6. Di Giulio M. The Last Universal Common Ancestor (LUCA) and the ancestors of archaea and bacteria were progenotes // J. Mol. Evol. 2011. V.72. P.119-126.
7. Koga Y., Kyuragi T., Nishihara M., Sone N. Did archaeal and bacterial cells arise independently from noncellular precursors? A hypothesis stating that the advent of membrane phospholipid with enantiomeric glycerolphosphate backbones caused the separation of the two lines of descent // J. Mol. Evol. 1998. V.46. P. 54-63.
8. Martin W., Russel M.J. On the origin of cells: a hypothesis for evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 2003. V.358. P.59-85.

9. Wachtershauser G. From pre-cells to Eukarya — a tale of two lipids // Mol. Microbiol. 2003. V.47. P.13-22.
10. Lombard J., Lopez-Garcia P., Moreira D. The early evolution of lipid membranes and the three domains of life // Nature Rev. Microbiol. 2012. V.10. P.507-515.
11. Pohorille A., Deamer D. Self-assembly and function of primitive cell membranes // Res. Microbiol. 2009. V.160. P.449-456.
12. Segre D., Ben-Eli D., Deamer D.W., Lancet D. The lipid World // Origins of Life, Evol. Biosphere. 2001. V.31. P.119-145.
13. Ricardo A., Szostak J.W. Origin of life on Earth // Sci. American. 2009. V.301(3). P.54-61.
14. Kazlauskas D., Krupovic M., Guglielmini J., Forterre P., Venclovas C. Diversity and evolution of B-family DNA-polymerases // Nucleic Acids Res. 2020. V.48. P.10142-10156.
15. Koonin E.V., Krupovic M., Ishino S., Ishino Y. The replication machinery of LUCA: common origin of DNA replication and transcription // BMC Biol. 2020. V.18. P. 1-8.
16. Di Guilio M. The late appearance of DNA, the nature of LUCA and ancestors of domains of life // Bio Systems. 2021. V.202. N104330.
17. Berkemer S.J., McGlinn S.E. A new analysis of archaea-bacteria domain separation: variable phylogenetic distance and the tempo of early evolution // Mol. Biol. Evol. 2020. V.37. P.2332-2340.
18. Никитин М. Происхождение жизни. От туманности до клетки. Изд. АНФ. М. 2016.
19. Mulkidjanian A.Y., Bychkov A.Y., Dibrova D.Y., Koonin E. Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2012. V.109. P. E821-E830.
20. Woese C.R. A new biology for a new century // Microbial. Mol. Biol. Rev. 2004. V.68. P.173-186
21. De Farias S.T., Jose M.V., Prosdocimi F. Is it possible that cells have had more than one origin // Bio Systems. 2021. V.202. N.104371.
22. Theobald D.L. A formal test of the theory of universal common ancestry // Nature. 2010. V.465. P.219-222.

**Сведения об авторах**

***Сергей Васильевич Шестаков***
*доктор биол. наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: shestakovgen@mail.ru*
***Елена Алексеевна Карбышева***
*кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: karbisheva@mail.ru*

**Information about authors**

***Sergey Vasilievich Shestakov***
*doctor of science (biol.), professor, academician, Main Researcher,*
*M.Lomonosov Moscow state university, genetic department*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: shestakovgen@mail.ru*
***Elena Alekseevna Karbysheva***
*Phd (phd biol.), Leading Researcher*
*M. Lomonosov Moscow state university genetic department,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: karbisheva@mail.ru*

УДК 575.174.015; 616.92
ГРНТИ 76.03.41
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.235-239

**Л.И. Николаева, М.Д. Стучинская, Н.Г. Шевченко, К.Г. Краснослободцев, Е.А. Мукашева, С.В. Трушакова, Е.И. Бурцева.**
Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства Здравоохранения Российской Федерации

## ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *IFNL3* И *IFNL4* С ТЕЧЕНИЕМ COVID-19

*Целью работы было изучение ассоциации отдельных аллельных вариантов полиморфных локусов генов IFNL3 (rs8099917 T/G) и IFNL4 (rs12979860 C/T) с тяжестью течения COVID-19. Достоверной связи отдельных аллельных вариантов и аллелей T/G и C/T данных локусов генов IFNL3 и IFNL4 с тяжестью течения COVID-19 у жителей Московского региона не обнаружено.*

***Ключевые слова:*** *генетический полиморфизм, врожденный иммунитет, IFNL3, IFNL4, течение COVID-19.*

**L.I. Nikolaeva, M.D. Stuchinskaya, N.G. Shevchenko, K.G. Krasnoslobodtsev, E.A. Mukasheva, S.V. Trushakova, E.I. Burtseva.**
N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology Ministry of Health

## STUDYING THE ASSOCIATION OF ALLELIC VARIANTS OF THE GENES *IFNL3* AND *IFNL4* WITH COVID-19

*The purpose of the work was to investigate the association of individual allelic variants of the polymorphic loci of genes IFNL3 (rs8099917 T/G) and IFNL4 (rs12979860 C/T) with the severity of COVID-19. No reliable association was found between individual allelic variants and T/G or C/T alleles of these loci of IFNL3 and IFNL4 with the severity of COVID-19 in residents of the Moscow region.*

***Keywords****: genetic polymorphism, innate immunity, IFNL3, IFNL4, course of COVID-19.*

### Введение

COVID-19 (Coronavirus disease 2019) – респираторное инфекционное заболевание, вызванное вирусом SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), ставшее причиной пандемии 2020-2023 гг. При COVID-19 возможны различные варианты клинического течения болезни: от бессимптомного до тяжелого, иногда завершающегося летальным исходом. В России на 23 апреля 2024 г. умерло 402 817 человек из 24 142 352 зарегистрированных случаев болезни за весь период эпидемии.

Учитывая вариабельность течения COVID-19, уже в 2020 г. были начаты исследования по поиску генетической предрасположенности к более легкому или тяжелому течению болезни. Поскольку при респираторных инфекциях значимую роль играют интерфероны III типа (ИФН-λ), которые обеспечивают защиту слизистых покровов человека от патогенов [1, с. 88-89], стали изучать возможную ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов, влияющих на экспрессию ИФН-λ с тяжестью течения COVID-19. В 2021 г. исследователи из Ирана обнаружили, что среди выздоровевших от COVID-19 достоверно чаще по сравнению с умершими выявлялась аллель C полиморфного локуса гена *IFNL4* (rs12979860 C/T) [2, с. 221]. Авторы рассматривали её как протективную аллель. В этом же году исследователи из Египта выявили связь C-аллеля с более тяжелым течением COVID-19 [3, с. 21185]. Таким образом, по этим данным, C-аллель обладает негативным эффектом. Испанские ученые в 2022 г. обнаружили, что T-аллель полиморфного локуса гена *IFNL4* (rs12979860 C/T) ассоциирована с повышенным риском инфицирования вирусом SARS-CoV-2 [4, с. 830]. В 2023 г. был выполнен мета-

анализ данных из публикаций, и связь между С-аллелью и тяжестью течения COVID-19 не обнаружена [5, с. 6622].

Принимая во внимание противоречивый характер описанных выше данных о роли аллелей С и Т гена *IFNL4,* которые влияют на продукцию ИФН-λ3, нами был выполнен анализ частоты встречаемости отдельных аллельных вариантов полиморфных локусов двух генов *IFNL3* (rs8099917 T/G*)* и *IFNL4* (rs12979860 C/T) у пациентов с различной степенью тяжести клинического течения COVID-19 и у неинфицированных людей.

**Цель работы**

Для решения вопроса о потенциально возможной ассоциации ОНП генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) с клиническим течением COVID-19 было проведено исследование по частоте встречаемости отдельных генотипов и аллелей в группе коренных жителей Московского региона, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 и имеющих разную клинически выраженную тяжесть болезни, относительно не инфицированных участников.

**Материалы и методы**

Образцы крови были собраны в период с октября 2020 г. по март 2024 г. в г. Москва. Все пациенты (n=141) имели вирусологически подтвержденный диагноз COVID-19, тяжесть их состояния при поступлении в клинику оценивали по шкале NEWS2 (National Early Warning System 2). Медиана возраста участников составила 49,0 лет, доля мужчин (n=64) и женщин (n=77) составила 45,4% и 54,6%. Группа сравнения была сформирована из 150 жителей Московского региона, не инфицированных SARS-CoV-2 на момент сдачи крови. Медиана возраста в этой группе – 45,0 лет; доля мужчин (n=81) и женщин (n=69) составила 54,0% и 46,0%. Исследование проводили при добровольном информированном согласии участников. Протокол исследования утвержден этическим комитетом ИКБ №1 г. Москва (протоколы №11/А от 16.10.2020 и №8 от 28.12.2022).

Определение минимального размера количества участников для получения достоверных данных было рассчитано по методике К.А. Отдельновой [6, с. 22]. Допустимое значение составило от 100 до 400 участников, что соответствует запланированной точности исследования 0,2 (умеренное значение). Данное исследование имеет заданную доверительную вероятность 95% и доверительный интервал 5,75.

ДНК участников исследования выделяли из лейкоцитов крови, используя набор реагентов «ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА» и методику производителя (ДНК-технология, Россия). Выявление ОНП генов *IFNL3* (rs8099917 T/G*)* и *IFNL4* (rs12979860 C/T) выполняли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, используя набор реагентов «Иммуногенетика IL28B» и детектирующий амплификатор ДТ 96 (ДНК-технология, Россия).

Анализ достоверности различий между сравниваемыми показателями групп участников был выполнен с использованием пакета программ Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) и с применением четырехпольных таблиц сопряжения и точного метода Фишера, если один из показателей был меньше 10. Различия сравниваемых величин признавали статистически достоверными при $p<0,05$.

**Полученные результаты**

Установлена частота встречаемости аллельных пар по полиморфным локусам генов *IFNL3* (rs8099917 T/G*)* и *IFNL4* (rs12979860 C/T) в группе пациентов с COVID-19 (n=141) и в группе сравнения (n=150). Между сравниваемыми группами не выявлены различия в частоте встречаемости отдельных вариантов генотипов. Данные представлены в таблице 1.

***Таблица 1.***

***Частота встречаемости аллельных вариантов генов IFNL3 (rs8099917 T/G) и IFNL4 (rs12979860 C/T) у пациентов с COVID-19 и в группе сравнения***

| **Группа наблюдения и уровень значимости различий (p)** | **Генотип CC/TT** | **Генотип CT/TG** | **Генотип CT/TT** | **Генотип TT/TG** | **Генотип TT/GG** | **Генотип TT/TT** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Группа пациентов, % (n). N=141 | 46,8 (66) | 25,5 (36) | 18,5 (26) | 7,8 (11) | 0,7 (1) | 0,7 (1) |
| Группа сравнения, % (n). N=150 | 53,3 (80) | 19,3 (29) | 18,0 (27) | 6,0 (9) | 0,7 (1) | 0,7 (1) |
| Значение p | 0,2667 | 0,2092 | 0,9226 | 0,6450 | 0,9999 | 0,9999 |

Следующей задачей был анализ частоты встречаемости отдельных аллельных вариантов в группах пациентов, различающихся по тяжести COVID-19, которую оценивали в баллах, как отмечено в разделе «Материалы и методы». Первую группу составил 21 пациент с бессимптомным течением COVID-19, вторую – 42 пациента с 0-1 баллами (легкое течение), третью – 43 участника с 2-4 баллами (умеренное течение); четвертую – 35 пациентов с 5 баллами и более (тяжелое течение). Результаты анализа представлены в таблице 2.

***Таблица 2.***

***Частота выявления генотипов по полиморфным локусам генов IFNL3 (rs8099917 T/G) и IFNL4 (rs12979860 C/T) в группах с COVID-19***

| **Генотипы и их частота в группах, % (n)** | **Группа 1 (n=21)** | **Группа 2 (n=42)** | **Группа 3 (n=43)** | **Группа 4 (n=35)** | **Значение p** |
|---|---|---|---|---|---|
| CC/TT | 47,6 (10) | 52,4 (22) | 46,5 (20) | 40,0 (14) | >0,05 |
| CT/TG | 28,6 (6) | 23,8 (10) | 23,2 (10) | 28,6 (10) | >0,05 |
| CT/TT | 19,0 (4) | 9,5 (4) | 20,9 (9) | 25,7 (9) | >0,05 |
| TT/TG | 4,8 (1) | 11,9 (5) | 7,1 (3) | 5,7 (2) | >0,05 |
| TT/GG | 0,0 (0) | 2,4 (1) | 0,0 (0) | 0,0 (0) | >0,05 |
| TT/TT | 0,0 (0) | 0,0 (0) | 2,3 (1) | 0,0 (0) | >0,05 |

Достоверных различий в частоте встречаемости отдельных генотипов не обнаружено. Следующей задачей был анализ распределения аллелей во всех группах участников. Данные представлены в таблице 3.

***Таблица 3.***

***Частоты встречаемости отдельных аллелей полиморфных локусов генов IFNL3 (rs8099917 T/G) и IFNL4 (rs12979860 C/T) во всех группах участников***

| **Группы участников** | **C-аллель (ген *IFNL4* (rs12979860 C/T)** | **T-аллель (ген *IFNL4* (rs12979860 C/T)** | **T-аллель (ген *IFNL3* rs8099917 T/G*)*** | **G-аллель (ген *IFNL3* rs8099917 T/G*)*** | **Значение p** |
|---|---|---|---|---|---|
| Группа сравнения (n=150) | 72,0% (216) | 28,0% (84) | 86,0% (258) | 14,0% (42) | >0,05 |
| Пациенты с COVID-19 (n=141) | 68,8% (194) | 31,2% (88) | 82,6% (233) | 17,4% (49) | >0,05 |
| Группа 1 | 71,4% | 28,6% | 83,3% | 16,7% | >0,05 |

| **Группы участников** | **С-аллель (ген *IFNL4* (rs12979860 C/T)** | **Т-аллель (ген *IFNL4* (rs12979860 C/T)** | **Т-аллель (ген *IFNL3* rs8099917 T/G*)*** | **G-аллель (ген *IFNL3* rs8099917 T/G*)*** | **Значение p** |
|---|---|---|---|---|---|
| (n=21) | (30) | (12) | (35) | (7) | |
| Группа 2 (n=42) | 69,0% (58) | 31,0% (26) | 79,8% (67) | 20,2% (17) | >0,05 |
| Группа 3 (n=43) | 68,6% (59) | 31,4% (27) | 84,9% (73) | 15,1% (13) | >0,05 |
| Группа 4 (n=35) | 67,1% (47) | 32,9% (23) | 82,9% (58) | 17,1% (12) | >0,05 |

Как следует из данных таблицы 3, различий в содержании отдельных аллелей в группах всех участников исследования не выявлено, тенденций не обнаружено. Сравнение показателей в группах больных COVID-19 различной тяжести выполнено только между этими группами.

**Выводы**

1. Не обнаружено достоверных различий в частоте встречаемости С- и Т-аллеля в локусе гена *IFNL4* (rs12979860 C/T) при сравнении всех пациентов с COVID-19 и участников группы сравнения и при анализе групп инфицированных пациентов между собой.
2. Не обнаружено достоверных различий в частоте встречаемости Т- и G-аллеля в локусе гена *IFNL3* (rs8099917 T/G*)* при сравнении всех пациентов с COVID-19 и участников группы сравнения и при анализе групп инфицированных пациентов между собой.
3. Не обнаружено достоверных различий в частоте встречаемости отдельных генотипов по локусам генов *IFNL3* (rs8099917 T/G*)* и *IFNL4* (rs12979860 C/T) при сравнении всех пациентов с COVID-19 и участников группы сравнения, а также групп пациентов с различной тяжестью COVID-19.

**Заключение**

***Авторы считают***, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: С- и Т-аллель в локусе гена *IFNL4* (rs12979860 C/T) и Т- и G-аллель в локусе гена *IFNL3* (rs8099917 T/G*)* не ассоциированы ни с заболеванием COVID-19, ни с тяжестью его клинических проявлений у жителей Московского региона.

**Литература**

1. Николаева Л.И., Сапронов Г.В., Куприянов В.В. Роль интерферонов-лямбда в иммунной защите от гриппа // Инфекционные болезни. 2019. № 1. С. 86-92.
2. Rahimi P., Tarharoudi R., Rahimpour A. et al. The association between interferon lambda 3 and 4 gene single-nucleotide polymorphisms and the recovery of COVID-19 patients // Virology Journal. 2021. V. 18. P. 221.
3. Saponi-Cortes J.M.R., Rivas M.D., Calle-Alonso F. et al. IFNL4 genetic variant can predispose to COVID-19 // Scientific Reports. 2021. V. 11. P. 21185.
4. Agwa S.H.A., Kamel M.M., Elghazaly H. et al, Association between interferon-lambda-3 rs12979860, TLL1 rs17047200 and DDR1 rs4618569 variant polymorphisms with the course and outcome of SARS-CoV-2 patients // Genes (Basel). 2021. V. 12(6). P. 830.
5. Zahid W., Farooqui N., Zahid N. et al. Association of interferon lambda 3 and 4 gene SNPs and theia expression with COVID-19 disease severity: a cross-sectional study // Infection and Drug Resistance. 2023. V. 16. P. 6619-6628.

6. Отдельнова К.А. Определение необходимого числа наблюдений в комплексных социально-гигиенических исследованиях // В сборнике трудов медицинского института им. Н.И. Пирогова «Комплексные социально-гигиенические и клинико-социальные исследования». Москва. 1980. С. 18-22.

**Сведения об авторах**

***Людмила Ивановна Николаева***
*доктор биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторией генно-инженерных препаратов НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.*
*Москва, Россия.*
*Эл. почта:L.i.nikolaeva@mail.ru*
***Майя Денисовна Стучинская***
*младший научный сотрудник лаборатории генно-инженерных препаратов НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.*
*Москва, Россия.*
*Эл. почта: mayastaya@mail.ru*
***Надежда Григорьевна Шевченко***
*младший научный сотрудник лаборатории генно-инженерных препаратов НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.*
*Москва, Россия.*
*Эл. почта: dr.nadya@inbox.ru*
***Кирилл Геннадьевич Краснослободцев***
*научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.*
*Москва, Россия.*
*Эл. почта:kkg@mail.ru*
***Евгения Андреевна Мукашева***
*научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.*
*Москва, Россия.*
*Эл. почта: mukasheva_evgeniya@mail.ru*
***Светлана Викторовна Трушакова***
*Кандидат биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.*
*Москва, Россия.*
*Эл. почта: s.trushakova@gmail.com*
***Елена Ивановна Бурцева***
*доктор мед. наук, вед. науч. сотр., зав. лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.*
*Москва, Россия.*
*Эл. почта: elena-burtseva@yandex.ru*

**Information about author**

***Lyudmila Ivanovna Nikolaeva***
*Doctor of Science (Biol.),*
*Head of Laboratory of Gene Engineering Products of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology Ministry of Health.*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: L.i.nikolaeva@mail.ru*
***Maya Denisovna Stuchinskaya***
*Junior Researcher of Laboratory of Gene Engineering Products of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology Ministry of Health.*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: mayastaya@mail.ru*

***Nadezhda Grigorievna Shevchenko***
*Junior Researcher of Laboratory of Gene Engineering Products of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology Ministry of Health.*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: dr.nadya@inbox.ru*

***Kirill Gennadievich Krasnoslobodtsev,***
*Researcher of Laboratory of influenza Etiology and Epidemiology of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology Ministry of Health.*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: kkg@mail.ru*

***Evgenia Andreevna Mukasheva***
*Researcher of Laboratory of influenza Etiology and Epidemiology of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology Ministry of Health.*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: mukasheva_evgeniya@mail.ru*

***Svetlana Victorovna Trushakova***
*PhD (Biol.), Senior Researcher of Laboratory of influenza Etiology and Epidemiology of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology Ministry of Health.*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail:s.trushakova@gmail.com*

***Elena Ivanovna Burtseva***
*Doctor of Science (Med.),*
*Head of Laboratory of influenza Etiology and Epidemiology of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology Ministry of Health.*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail:elena-burtseva@yandex.ru*

УДК 544.1 + 546.72 + 548.3
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.240-245

**Н.А. Санина**
ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН

# МИМЕТИКИ НИТРОЗИЛЬНЫХ ФЕРРЕДОКСИНОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ВАЗОДИЛАТАТОРЫ В РЕАКЦИЯХ С МОДЕЛЬНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ

*В статье представлены данные по изучению взаимодействия ряда оригинальных миметиков нитрозильных [2Fe-2S] ферредоксинов - доноров оксида азота (NO), с модельными биологическими системами (сывороточным альбумином, муцином, гемоглобинами, глутатионом и циклическими нуклеотидами) с использованием современных экспериментальных и теоретических методов.*

***Ключевые слова:*** *NO, нитрозильные комплексы железа, рентгеноструктурный анализ, ТДДФТ, спектроскопия, МТТ тест, бычий сывороточный альбумин, гемоглобин, глютатион, цГМФ, цАМФ*

**N.A. Sanina**
Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of Russian Academy of Sciences

# NITROSYL FERREDOXINS MIMETICS AS PROMISING VASODILATORS IN REACTIONS WITH MODEL BIOLOGICAL SYSTEMS

*The paper presents data on the study of the interaction of original mimetics of nitrosyl [2Fe-2S] ferredoxins as donors of nitric oxide (NO) with model biological systems (serum albumin, mucin, hemoglobin, glutathione and cyclic nucleotides) using modern experimental and theoretical methods.*

***Keywords****: NO, nitrosyl iron complexes, X-ray diffraction analysis, spectroscopy, MTT test, bovine serum albumin, hemoglobin, glutathione, cGMP, cAMP*

## Введение

Важную роль в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, спазмов органов брюшной полости, различных заболеваний легких отводят лекарственным препаратам, вызывающим вазодилатацию кровеносных сосудов. Одним из ключевых факторов, определяющих тонус кровеносных сосудов, является содержание в клетках тканей циклического гуанозинмонофосфата (cGMP) и циклического аденазинмонофосфата (cAMP), которые регулируют выброс внутриклеточных ионов Ca2+, и вызывают расслабление стенок кровеносных сосудов. Концентрация cGMP и cAMP контролируется функционированием ферментов - гуанилатциклазы и аденилатциклазы, которые осуществляют их синтез. Поэтому актуален дизайн оригинальных химических соединений, обладающих способностью к эффективной активации гуанилат-аденилатциклазной системы [1]. Известно, что ферментативная активность растворимой гуанилатциклазы контролируется монооксидом азота (NO) и ее можно регулировать введением экзогенных доноров NO.

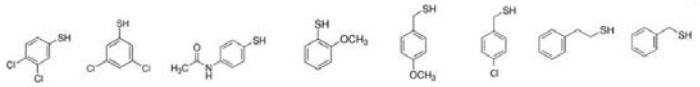
**Цель работы** состояла в разработке методов синтеза ряда миметиков нитрозильных ферредоксинов – доноров NO, исследование механизмов их биотрансформации в растворах, цитотоксичности, а также изучение их способности к модуляции активности циклических нуклеотидов, воздействия на основные белки крови: альбумин и гемоглобин, муцин как основной компонент секрета слизистых желез животных, и реакций с глютатионом.

## Материалы и методы.

В рамках исследований 2023-2024 гг. в ФИЦ ПХФ и МХ РАН разработаны методы синтеза и выделения в виде монокристаллов девяти новых нитрозильных комплексов железа (НКЖ) общей формулы $[Fe_2R_2(NO)_4]$ с R - лигандами ряда тиофенола и

бензентиола (Таблица 1).

Таблица 1. НКЖ на основе ароматических тиофенолилов (**1-4**) и бензентиолилов (**5-8**).

| Тиол(RH) |  | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| № НКЖ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Количество $NO_2^-$, мкМ | 2.40 | 2.60 | 0.08 | 1.20 | 1.08 | 1.40 | 1.06 | 1.07 |

Нитрозильные комплексы **1-8** были получены обменной реакцией тиосульфатных лигандов на ароматические тиолилы в водно-щелочной сред по схеме:

$$2Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4] \xrightarrow{+4Na_2S_2O_3} 4Na_3[Fe(S_2O_3)_2(NO)_2] \xrightarrow{+4RH,4NaOH} 2[Fe_2(R)_2(NO)_4]\downarrow$$

Строение НКЖ установлено методами РСА, ИК-, ЯГР- и ЭПР спектроскопии.

Исследование кинетики накопления нитрит-ионов в растворах НКЖ проводили с использованием реакции Грисса: получении анилинового красителя (максимум поглощения при 540 нм) в результате конденсирования N-(1-нафтил)этилендиамина с предварительно диазотированным сульфаниламидом.

Процессы трансформации НКЖ, в том числе, в присутствии белков, изучали с помощью метода спектроскопии поглощения по анализу кинетических зависимостей изменения оптической плотности в максимуме спектров поглощения комплексов.

Методом квантово-химического моделирования с использованием программы Gaussian 09 (версия D) с помощью гибридного функционала tpssh и базисного набора 6-311++G**//6-31G* с учетом сольватации растворе в рамках модели поляризуемого континуума (PCM) проведен анализ путей трансформации НКЖ путем полной оптимизации геометрии комплексов 1-8, промежуточных и конечных продуктов, вычислена энергетика предполагаемых реакций и произведено моделирование теоретических УФ-Вид спектров (с помощью TDDFT расчетов). Данная методика применена для исследования распада НКЖ в буфере, а также для анализа реакции взаимодействия комплекса с глутатионом. Для бычьего сывороточного альбумина (БСА) были построены теоретические спектры с учетом аминокислотного окружения предполагаемого центра связывания (Cys34 и His39).

Для изучения механизма связывания НКЖ с бычьим сывороточным альбумином также анализировали тушение собственной триптофановой флуоресценции белка (регистрирация в диапазоне 300–400 нм) на флуоресцентном спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США). Константа связывания вычислена из концентрационной зависимости интенсивности флуоресценции, которую строили в модифицированных координатах Штерна-Фольмера. Радиус Ферстера определен с помощью вычисления интеграла перекрывания спектров флуоресценции триптофана белка и спектра поглощения образующегося продукта – белок-связанного НКЖ.

Исследование цитотоксического действия НКЖ 1-8 выполнялось на клетках Vero с использованием МТТ-тестирования.

Определение изменения уровня циклических нуклеотидов проводили на наборах ELISA Kit for Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP) и ELISA Kit for Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) согласно методике [2].

**Полученные результаты.**

Комплексы **1-8** - нейтральные биядерные тетранитрозильные комплексы железа “μ-S” структурного типа. В них каждый атом железа связан с другим атомом железа, с двумя μ-атомами серы и двумя атомами азота двух групп NO, а мостиковый атом серы

представляет собой атом серы тиофенолила (для НКЖ **1-4**) или бензентиолила (для НКЖ **5-8**). Атомы железа находятся в искаженной тетраэдрической конфигурации с максимальным отклонением угла NO-Fe-NO до 120.12(19)º. Наблюдается удлинение длин связей Fe-N и N-O на 0.01 Å, а также связи C-S на 0.07 Å в комплексах **5-8** по сравнению с комплексами **1-4**. Длины связей Fe-S в комплексах **5-8** прочнее, чем в комплексах **1-4**. Длины связей C-S гетероциклов всех исследуемых соединений превышают значения длины двойной связи C=S (1.684 Å), т.е. ароматические лиганды координируются к атому железа в тиольной форме. Анализ длин связей в структурном фрагменте $\{Fe(NO)_2\}$ всех комплексов показал их незначительные различия. В $\{Fe(NO)_2\}$ фрагменте возможно внутреннее диспропорционирование вплоть до полного окисления/восстановления NO групп. Частичное окисление/восстановление в Fe-NO фрагменте возможно в силу легкого прямого $d_{Fe}\rightarrow\pi^*_{NO}$ и обратного донирования, которое сопровождается сокращением/удлинением Fe-N и, соответственно, удлинением/сокращением N-O связей, что подтверждается РСА данными.

По данным ИК спектроскопии полосы поглощения колебаний групп NO лежат в области 1822 $см^{-1}$-1702 $см^{-1}$ (таблица 2), что свидетельствует об увеличении частичного отрицательного заряда на NO и высокой нуклеофильной активности НКЖ **1-8**. При этом увеличивается вклад π-связывания, что приводит к ослаблению связи N–O и положение полос поглощения NO в ИК-спектрах соединений **1-8** коррелирует с длинами связей NO, полученных из данных РСА.

Таблица 2. Значения $\nu_{NO}$ и параметров Мессбауэровских спектров (T=296 K) для НКЖ **1-8**.

| НКЖ | $\nu_{NO}$,$см^{-1}$ | $\delta_{Fe}$, мм/с | $\Delta E_Q$, мм/с | Γ, мм/с | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | + | - |
| **1** | 1740 | 0.091(1) | 1.029(1) | 0.285(1) | |
| **2** | 1822,1728 | 0.087(1) | 1.115(1) | 0.241(2) | |
| **3** | 1750,1725 | 0.070(2) | 1.046(4) | 0.257(5) | |
| **4** | 1803,1716 | 0.087(1) | 1.115(1) | 0.241(2) | |
| **5** | 1753,1702 | 0.046(1) | 0.921(2) | 0.243(3) | 0.264(3) |
| **6** | 1772,1725 | 0.058(1) | 1.048(2) | 0.229(3) | |
| **7** | 1808,1737 | 0.064(1) | 1.038(2) | 0.275(2) | |
| **8** | 1763,1715 | 0.064(1) | 0.993(1) | 0.248(2) | 0.229(1) |

Анализ данных РСА и ЯГР спектроскопии показал, что в комплексах, наблюдается уменьшение значений изомерного сдвига при переходе от **1-4** к **5-8** (таблица 2), что коррелирует с увеличением среднего расстояния Fe–S (~ на 0.01 Å) в **5-8** и означает, что **5-8** должны быть более устойчивы растворах, чем **1-4**, т.к. при гидролизе комплексов этого семейства НКЖ происходит разрыв связи F-S с освобождением соответствующего тиолиганда [3].

По данным ЭПР-спектроскопии, в кристаллическом состоянии все комплексы диамагнитны. Спектры ЭПР растворов НКЖ **1-4** в ДМСО характеризуются пятью линиями сверхтонкой структуры (СТС), обусловленной взаимодействием неспаренного электрона с двумя эквивалентными ядрами азота (рисунок 2) и имеют характеристические особенности белковых моноядерных ДНКЖ с g = 2.03. Это согласуется с разрывом связи Fe-S и распадом биядерных НКЖ на моноядерные ДНКЖ, которые сохраняют свою структуру в течение ~1,5 часов (это комплексы **1-4** с электроноакцепторными заместителями), в отличии от комплексов **5-8** (с электронодонорными заместителями), для которых сигналы ЭПР наблюдаются только спустя 1,5 -20 часов после начала эксперимента.

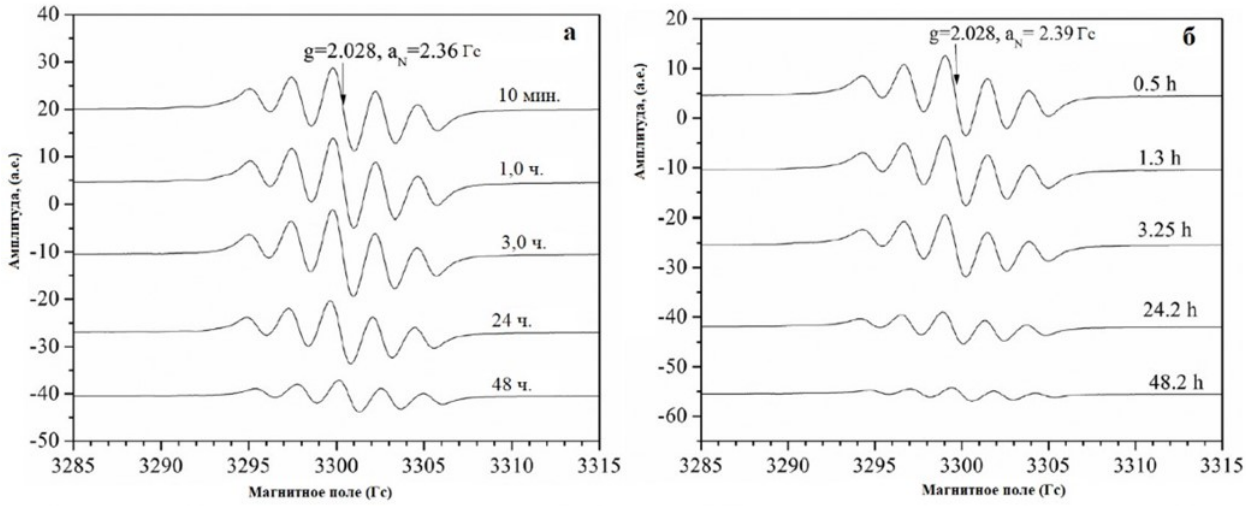



Рисунок 2. Спектры ЭПР продукта разложения НКЖ **1** в ДМСО в анаэробных (а) и аэробных условиях (б).

Установлено, что накопление нитрит-ионов в растворах **1-4** идет эффективнее, чем у **5-8**: при этом НКЖ **1** демонстрирует наибольшую активность (максимальное $[NO_2^-]$ = ~ 3.00 мкМ). НКЖ **3** и **4**, демонстрируют меньшую NO-донорную активность (максимальное $[NO_2^-]$ = ~ 1,5 мкМ). Комплексы с бензентиолилами **5-8** более устойчивы в координирующих растворителях, чем комплексы **1-4** и также проявляют меньшую NO-донорную активность: максимальное $[NO_2^-]$ ~ 1,4 мкМ наблюдается для НКЖ **6**.

Таблица 3. Дозы IC50 для НКЖ через 72 часа действия на клетки линии Vero.

| № | IC50, мкМ | |
|---|---|---|
| | НКЖ | Тиол комплекса (RH) |
| 1 | 216.23 ± 2.16 | 22.76 ± 2.76 |
| 5 | 111,77±8,50 | >1500 |
| 6 | 236,58±7,51 | >1500 |

Обнаружено, что все комплексы являются более цитотоксичными, чем исходные тиолы (за исключением НКЖ **1** и его тиола), что еще раз подтверждает гипотезу о том, что основной вклад в цитотоксичность НКЖ вносят нитрозильные интермедиаты - продукты распада и биоконверсии этих комплексов [4]. Следует отметить, что токсичность исследованных в настоящей работе НКЖ с бензентиолилами в 4-9 раз ниже, чем НКЖ с тиофенолилами. В таблице 3 представлены значения IC50 для нецитотоксичных НКЖ, которые были исследованы в реакциях с модельными биологическими системами.

Исследован механизм биотрансформации НКЖ **1** в растворах ДМСО, буферных растворах, а также в биологических системах [5]. В ДМСО НКЖ **1** распадается на моноядерные НКЖ, которые генерируют NO. Обнаружено образование высокомолекулярного продукта в результате связывания НКЖ **1** с БСА (константа Штерна–Фольмера $2{,}1 \times 10^5\ M^{-1}$). В этом случае НКЖ **1** становится пролонгированным NO-донором. Столь долгосрочный эффект нами наблюдался впервые. Аналогично, в системе с оксигемоглобином образование NO происходит медленнее; УФ-видимые спектры показывают постепенное образование метгемоглобина. С другой стороны, восстановленный глутатион мало влияет на NO-донорную активность, несмотря на факт, что в системе наблюдается замещение лиганда и образуется биядерный железо-нитрозильный продукт. Муцин связывает комплекс **1**, и механизм разложения НКЖ **1** вприсутствии этого фермента иной. Таким образом, эти белки и глутатион способны участвовать в трансформации комплекса **1** и модулировать его свойства как потенциального лекарственного средства. Интересные результаты получены для комплексов **5** и **6** в растворе БСА: в реакционной

смеси комплексов с БСА не появляются новые полосы в области 390 нм. Это может свидетельствовать об отсутствии в системе высокомолекулярного нитрозильного комплекса с алифатическими тиолигандами, как это наблюдалось для НКЖ **1**.

Изучено влияние **1,5** и **6** на две ферментативные системы - аденилатциклазу и растворимую гуанилатциклазу. Показано [2], что НКЖ **1** в экспериментах *in vitro* вызывает увеличение концентрации цАМФ и цГМФ в 2.4 и 4.5 раза, соответственно (при концентрации НКЖ **1** 0.1 мМ). Лиганд, 3,4-дихлортиофенол, оказывал менее выраженный эффект на аденилатциклазу. НКЖ **6** по сравнению с НКЖ **5** оказывает более выраженное влияние на функции ферментов. Уровень цАМФ увеличивается в 2.7 раз в смеси с **6** и в 1.8 раз в смеси с **5** по сравнению с контролем (при концентрации НКЖ $10^{-5}$ М). Уровень цГМФ в смеси с комплексом **6** увеличивается в 1.7 раз при концентрации НКЖ $10^{-5}$ М. Интересно, что в концентрации $10^{-4}$ М комплексы не оказывают значительного влияния на уровни циклических нуклеотидов: в случае комплекса **5** уровень цГМФ в клетках уменьшается в 2 раза по сравнению с контролем. Мы связываем это с цитотоксичностью НКЖ **5**. Т.о., оптимальное действие комплексы **5** и **6** оказывают в меньшей концентрации.

**Выводы.**

Выявленные в результате исследований соединения-лидеры (НКЖ**1** и НКЖ**6**) являются потенциальными препаратами, обладающими вазо- и бронходилатирующими свойствами и могут быть рекомендованы для дальнейших *in vivo* исследований.

**Заключение** Автор считает, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые изучены корреляции “структура-активность” новых доноров NO - миметиков нитрозильных [2Fe-2S] ферредоксинов в реакциях с модельными биологическими системами и разработан подход к дизайну перспективных соединений для NO химиотерапии заболеваний, обусловленных эндотелиальной дисфункцией.

**Литература.**

1. Kobalava Zh.D., Lazarev P.V. Nitric oxide - soluble guanylate cyclase - cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in the pathogenesis of heart failure and search for novel therapeutic targets // Cardiovascular Therapy and Prevention. 2021.Vol.20. №.6. P.3035.
2. Мазина Л.М., Новикова В.О., Покидова О.В., Санина Н.А. Влияние нитрозильного комплекса железа с 3,4-дихлортиофенолилами на уровень циклических нуклеотидов in vitro // Бюлл. Эксп. биологии и медицины. 2024. Т. 177. № 2. С. 78-182.
3. Pokidova O.V., Emel´yanova N.S., Shkondina N.I., Kotel´nikov A.I., Syrtsova L.A., Sanina N. A. Aldoshin S.M., Features of the decomposition of the neutral nitrosyl iron complexes with aryl-containing thiolate ligands in various solvents. Reaction with glutathione// Russ.Chem. Bull. 2017. Vol. 66. P. 821-827.
4. Sanina N.A., Sulimenkov I.V., Emel’yanova N.S., Konyukhova A.S., Stupina T.S., Balakina A.A., Terent’ev A.A., Aldoshin S.M. Cationic dinitrosyl iron complexes with thiourea exhibit selective toxicity to brain tumor cells in vitro // Dalton Trans. 2022. Vol. 51. P. 8893-8905
5. Pokidova O.V., Novikova V.O., Emel’yanova N.S., Kormukhina A.Yu., Kulikov A.V., Utenyshev A.N., Lazarenko V.A., Ovanesyan N.S., Starostina A.A., Sanina N.A. A nitrosyl iron complex with 3.4-dichlorothiophenolyl ligands: synthesis, structures and its reactions with targets – carriers of nitrogen oxide (NO) in vivo // Dalton Transaction. 2023. Vol. 52. P. 2641–2662.

**Сведения об авторах**

***Наталия Алексеевна Санина***
*доктор хим. наук, профессор. зав.отделом*
*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН*
*Черноголовка, Российская Федерация*
*Эл. почта: sanina@icp.ac.ru*

**Information about author**

***Nataliya Alekseevna Sanina***
*Doctor of Science (Chem.), Professor,*
*Head of Department*
*Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russian*
*Chernogolovka, Russian Federation*
*E-mail: sanina@icp.ac.ru*

УДК 544.1 + 546.72 + 548.3
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.245-250

**Н.А. Санина**
ФГБУН Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН

# НОВОЕ СЕМЕЙСТВО ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА (NO) С ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

*В статье представлены данные по синтезу нитрозильных комплексов железа с 1,2,4-триазол-3-тиолилами – новых ингибиторов фосфодиэстераз.*

***Ключевые слова:*** *NO, нитрозильные комплексы железа, спектроскопия, квантово-химические расчеты, МТТ тест, фосфодиэстеразы*

**N.A. Sanina**
Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of Russian Academy of Sciences

# NEW FAMILY OF NITRIC OXIDE (NO) DONORS WITH ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

*The article presents data on the synthesis of nitrosyl iron complexes with 1,2,4-triazole-3-thiolyls - new inhibitors of phosphodiesterases.*

***Key words:*** *nitric oxide (NO), nitrosyl iron complexes, spectroscopy, quantum chemical calculations, MTT test, phosphodiesterases*

## Введение

Интенсивный поиск противовоспалительных средств с улучшенным спектром активности и уменьшенными побочными эффектами по сравнению с уже используемыми клиническими препаратами в 21 веке возможен при условии создания и развития принципиально новых стратегий, направленных на активный поиск эффективных иммунотропных агентов, действующих через различные клеточные факторы и изменяющих внутриклеточные сигнальные пути. В организме человека такими сигнальными молекулами являются циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) и циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) [1]. Изменение их уровня 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 цАМФ и цГМФ являются фосфодиэстеразы (ФДЭ), которые гидролизуют циклические нуклеотиды в нециклические АМФ или ГМФ [2]. ФДЭ играют основную роль в контроле сигнала на различных уровнях фосфорилирования и взаимодействия белок/белок, что определяет их

важную роль в иммунных реакциях и в контроле воспалительных процессов, поэтому воздействие на этот фермент позволяет контролировать множество физиологических и патологических процессов. К ингибиторам ФДЭ относятся препараты, обладающие разными терапевтическими эффектами. Так, например, теофиллин является бронхолитиком, папаверин и дротаверин относятся к группе спазмолитиков, милринон используется при острой сердечной недостаточности, силденафил и тадалафил – основные средства в терапии эректильной дисфункции, а рофлумиласт обладает выраженной противовоспалительной активностью [3]. Несмотря на различия терапевтических эффектов, все перечисленные препараты обладают сходным механизмом действия, который сводится к ингибированию активности различных типов ФДЭ. Следует отметить, что наиболее перспективными с точки зрения действия на воспалительные процессы являются ингибиторы фосфодиэстераз ФДЭ1, ФДЭ4 и ФДЭ7 [4]. В качестве сильных неконкурентных ингибиторов ФДЭ1, в частности, в предклинических исследованиях широко используют 1,2,4-триазолы [5].

Уровень циклических нуклеотидов в клетке контролируется другой сигнальной молекулой – оксидом азота (NO), посредством активации фермента - гуанилатциклазы [6], и его можно регулировать с помощью введения экзогенных доноров NO.

К числу перспективных экзогенных доноров NO относятся миметики нитрозильных ферредоксинов, содержащие фрагмент $\{(R)_2Fe(NO)_2\}$ [7-9], что подтверждает возможность целевого воздействия на терапевтические мишени одновременно по двум механизмам – как специфического ингибитора ФДЭ и как донора NO.

**Цель работы -** расширение арсенала ингибиторов ФДЭ на основе комплементарных человеческому организму НКЖ, содержащих NO-группы и триазол-тиолилы.

**Материалы и методы.**

Разработаны методы синтеза шести новых НКЖ **1-6** общей формулы $[Fe_2R_2(NO)_4]$ (Таблица 1) на основе специально синтезированных 1,2,4-триазол-3-тиолов (RH1-RH6). НКЖ были получены обменной реакцией тиосульфатных лигандов на ароматические тиолилы в водно-спиртовой щелочной среде по схеме 1:

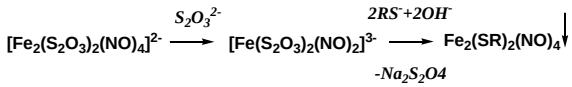
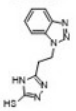
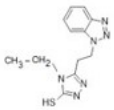
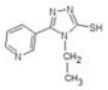
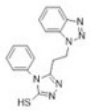



***Схема 1.***

Таблица 1. НКЖ на основе 1,2,4-триазол-3-тиолов.

| НКЖ | Тиол | Характеристики НКЖ | НКЖ | Тиол | Характеристики НКЖ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | RH1 | Формула: $[Fe_2(C_{10}H_{10}N_3S)_2(NO)_4]$<br>Мол.вес.: 640,23 г/моль<br>Лиганд: $C_{10}H_{10}N_3S$ | 4 | RH4  | Формула: $[Fe_2(C_{10}H_{10}N_6S)_2(NO)_4]$<br>Мол.вес: 724,25 г/моль<br>Лиганд: $C_{10}H_{10}N_6S$ |
| 2 | RH2 | Формула: $[Fe_2(C_{14}H_{10}N_3S)_2(NO)_4]$<br>Мол.вес: 736,29 г/моль<br>Лиганд: $C_{14}H_{10}N_3S$ | 5 | RH5  | Формула: $[Fe_2(C_{12}H_{13}N_6S)_2(NO)_4]$<br>Мол.вес.: 778,34 г/моль<br>Лиганд:$(C_{12}H_{13}N_6)$ |
| 3 | RH3  | Формула: $[Fe_2(C_9H_9N_4S)_2(NO)_4]$<br>Мол.вес: 642,20 г/моль<br>Лиганд $C_9H_9N_4S$ | 6 | RH6  | Формула: $[Fe_2(C_{16}H_{14}N_6S)_2(NO)_4]$<br>Мол.вес.: 876,44 г/моль<br>Лиганд: $C_{16}H_{14}N_6S$ |

Строение НКЖ в твердой фазе установлено методами элементного анализа, ИК-, ЯГР-, ЭПР спектроскопии и квантово-химического моделирования.

Изучение их NO-донорной активности проводили с использованием сенсорного электрода amiNO-700 системы inNO Nitric Oxide Measuring System (Innovative Instruments, США).

Активность ФДЭ цГМФ определяли в двойной ферментативной системе по количеству выделившихся фосфат-ионов по схеме 2, согласно методике [10].

$$\textbf{цГМФ} \xrightarrow{\text{ФДЭ цГМФ}} \textbf{ГМФ} \xrightarrow{\text{нуклеотидаза}} PO_4^{3-} + \textbf{гуанозин}$$

Схема 2.

Исследование цитотоксического действия НКЖ **1-6** выполнялось на клетках Vero с использованием МТТ-тестирования.

**Полученные результаты.**

В ИК-спектрах НКЖ **1-6** идентифицированы колебания группы NO в области 1789 -1781 $см^{-1}$ и в области 1718–1709 $см^{-1}$ (табл. 2). Дублет валентных NO колебаний в ИК спектрах синтезированных НКЖ **1-6** являются преобладающими. Этот эффект возникает не только за счет усиления поляризации NO в НКЖ, но и также вследствие чувствительности к расстоянию N-O донорно-акцепторного переноса электронной плотности в фрагменте Fe-NO. Эта особенность связывания позволяет объяснить значительную интенсивность NO колебаний в исследуемых комплексах. Параметр $\Delta\nu_{NO}$ (табл. 2) является эффективным инструментом для определения структурного типа НКЖ (в отсутствии данных РСА).

Значение разницы $\nu_{NO}$-NO-сим и $\nu_{NO}$-асим в НКЖ **1-6** составляет ~ 70 $см^{-1}$. Этот факт позволяет предположить, все комплексы относятся к «μ-NCS» структурному типу парамагнитных биядерных тетранитрозильных комплексов железа, в которых Fe…Fe расстояние составляет ~ 4 Å [8].

Значения изомерного сдвига ($\delta_{Fe}$), который пропорционален s-электронной плотности на ядре, и квадрупольного расщепления ($\Delta E_Q$), которое дает информацию о взаимодействии квадрупольного момента ядра $^{57}Fe$ с градиентом окружающего ядро электрического поля (таблица 2), в **1-6** близки к таковым для изученных ранее биядерных парамагнитных нейтральных комплексов железа “μ-NCS” структурного типа [8].

Таблица 2. Значения $\nu_{NO}$ и параметров ЯГР спектров (T=80 K) НКЖ **1**-**6**.

| НКЖ | $\nu_{NO}$,$см^{-1}$ | $\Delta\nu_{NO}$, $см^{-1}$ | $\delta_{Fe}$, мм/с | $\Delta E_Q$, мм/с | Г, мм/с |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 1881, 1709 | 72 | 0.294 (1) | 0.919 (1) | 0.352 (2) |
| **2** | 1789,1717 | 72 | 0.300 (1) | 0.936 (1) | 0.298 (1) |
| **3** | 1785,1712 | 73 | 0.286 (2) | 0.956 (1) | 0.288 (1) |
| **4** | 1785,1718 | 67 | 0.270 (1) | 0.974 (2) | 0.374 (1) |
| **5** | 1787,1718 | 69 | 0.283 (2) | 1.050 (1) | 0.269 (2) |
| **6** | 1788,1718 | 70 | 0.294 (2) | 1,010 (2) | 0.386 (1) |

Результаты регистрации спектров ЭПР для НКЖ **1-6** представлены на рисунке 1. Форма и интенсивность спектров растворов комплексов **1-6** не изменяются в течении 2-х часов; g-факторы равны 2. 031. Все комплексы, кроме **4**, дают широкие линии ЭПР с ширинами ~ 8-9 Гс, причем для НКЖ **2, 5** и **6** видна неразрешенная структура. Форма линии обусловлена неразрешенной изотропной сверхтонкой структурой (СТС) от ядер азота и протонов. Спектр раствора НКЖ **4** отличается от спектров растворов других НКЖ пятью линиями, характерными для СТС от двух эквивалентных ядер азота с расщеплением $a_N$=2.6 Гс и g-фактором 2.028. Величины N для растворов малы, комплексы в растворах распадаются с образованием сравнительно стабильных парамагнитных частиц: происходит распад биядерных комплексов на моноядерные под действием молекул диметилкульфоксида (ДМСО).

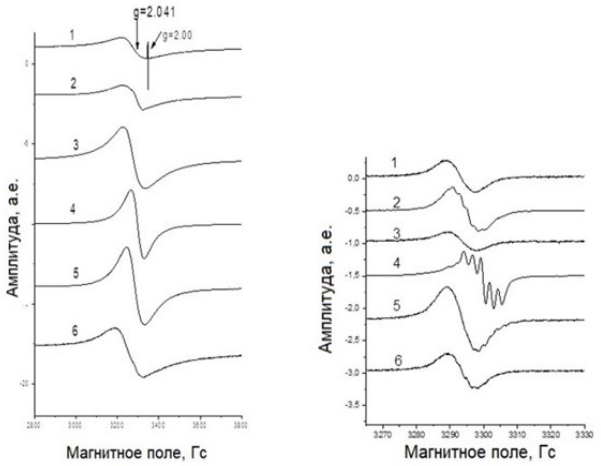



Рис.1 Спектры ЭПР кристаллов (а) и растворов (б) **1-6**.

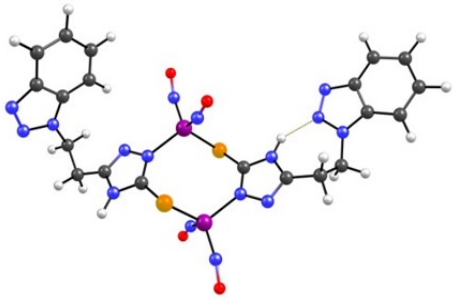


Рис.2 Оптимизированная геометрия НКЖ **4**.

Подтверждением предполагаемого "μ-NCS" строения исследуемых НКЖ **1-6** явилось выполнение квантово-химического моделирования их структуры (см. пример НКЖ **4** (рис.2).), их ИК и ЯГР спектров. Параметры спектра ЯГР НКЖ **4** близки к таковым у биядерных тетранитрозильных комплексов железа с μ-NCS-мостиковым лигандом ($\Delta E_Q$=0.974 мм/с и δ=0.270 мм/с при 80 K (Таблица 2)). Теоретический ЯГР спектр НКЖ **4** дает нам значение $\Delta E_Q$=0.964 (TPSSh/TZVP(CP(PPP)Fe)Fe) и $\delta_{Fe}$=0.315 мм/с (TPSSh/TZVP(CP(PPP), что удовлетворительно совпадает с экспериментом в пределах ошибки, допускаемой для указанных методов применительно к этому типу расчетов.

Теоретический ИК-спектр **4** совпал с экспериментальным с учетом масштабирующего множителя (k=0.96 для TPSSh), что свидетельствует о соответствии полученных данных структуре **4**, и позволяет соотнести имеющиеся полосы с частотами колебаний.

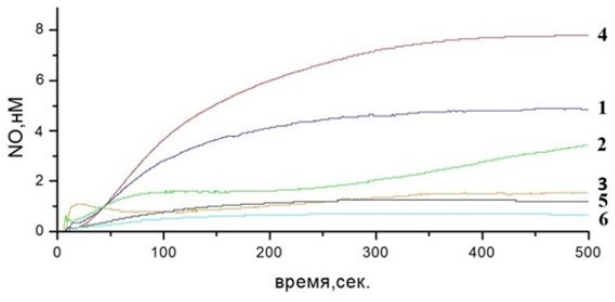



Рис.3. Зависимости количества NO, генерируемого **1-6** от времени (pH 7,0 T=25$^0$C).

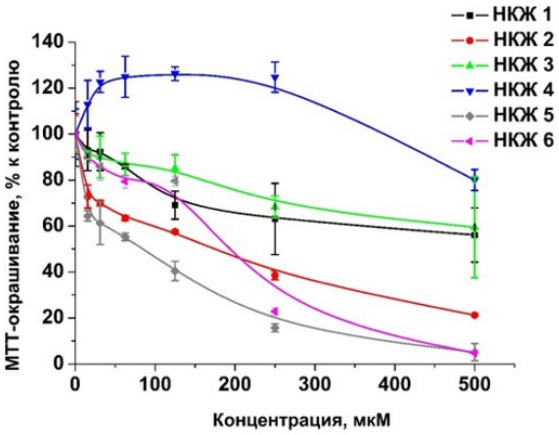



Рис.4. Кривые «доза-эффект» для клеток Vero, 72 ч действия НКЖ **1-6.**

В 1 % аэробных водных растворах ДМСО все синтезированные НКЖ генерируют NO без дополнительной активации: количества NO, генерируемого **1-6** в концентрации $0{,}4\cdot10^{-5}$ М составляют 0,5-8,0 нМ. Наиболее эффективный NO донор – НКЖ **4** (рис. 3).

Результаты цитотоксического действия НКЖ **1-6** представлены в виде кривых «доза-эффект» на рисунке 4. Рассчитанные на основании кривых значения IC50 приведены в таблице 3. Комплексы **1**, **3** и **4** проявили низкую цитотоксическую активность, что делает их наиболее перспективными для дальнейших исследований.

**Таблица 3. Значения IC50 НКЖ 1-6 и их тиолов для клеток Vero через 72 ч действия.**

| НКЖ | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $IC_{50}$, мкМ | >500 | 149,4 | >500 | >500 | 62,6 | 184,6 |
| Тиол | RH1 | RH2 | RH3 | RH4 | RH5 | RH6 |
| $IC_{50}$, мкМ | >500 | 194,9 | >500 | >500 | >500 | >500 |

Результаты по влиянию НКЖ **1-6** на активность ФДЭ цГМФ представлены в таблице 4а. Соединением-лидером является нетоксичный комплекс **4**, который эффективно тормозит функции фермента во всех исследуемых концентрациях. При этом, тиол **4**, обладает наиболее выраженной активностью среди исследованных тиолов (таблица 4б), тем не менее, он в 3-5 раз слабее ингибирует функции ФДЭ цГМФ, чем комплекс **4**, т.е. с ферментом связывается не только лиганд, но и сам исходный НКЖ **4**. Действие комплексов и их тиолов сравнивалось с классическим ингибитором – теофиллином (63±8; 45±5 и 30±3, при тех же концентрациях, соответственно). Видно, что действие НКЖ **4** в концентрации 0,1 и 0,01 мМ превышает активность теофиллина, а в концентрации 0,001 мМ - сопоставимо с ним.

**Таблица 4а. Ингибирование активности ФДЭ цГМФ ( % от контроля) изученных НКЖ 1-6.**

| Соединение | Ингибирование, % Концентрация 0,1 мМ | 0,01 мМ | 0,001 мМ |
|---|---|---|---|
| 1 | 53,5±3,2 | 7,0±2,9 | 0 |
| 2 | 63,4±3,6 | 53,7±2,6 | 14,6±4,6 |
| 3 | 77,5±1,7 | 32,5±3,5 | 12,5±0,4 |
| 4 | 100,0 | 69,0±2,1 | 26,2±1,5 |
| 5 | 81,6±2,0 | 21,1±3,8 | 0 |
| 6 | 67,4±4,3 | 28,3±2,3 | 19,6±3,2 |

**Таблица 4б. Ингибирование активности ФДЭ цГМФ ( % от контроля) изученных тиолов.**

| Соединение | Ингибирование, % Концентрация 0,1 мМ | 0,01 мМ | 0,001 мМ |
|---|---|---|---|
| RH1 | 5,0±3,1 | 2,5±2,0 | 0 |
| RH2 | 5,9±2,8 | 2,9±1,5 | 0 |
| RH3 | 12,9±4,2 | 6,5±2,5 | 3,2±0,1 |
| RH4 | 20,0±4,8 | 17,1±3,5 | 8,6±1,3 |
| RH5 | 7,5±2,2 | 2,5±1,9 | 0 |
| RH6 | 18,8±3,5 | 12,5±4,9 | 3,1±1,5 |

**Выводы.**

Способность синтезированных соединений – доноров NO к эффективному ингибированию функции ФДЭ цГМФ позволяет прогнозировать высокую терапевтическую активность НКЖ с 1,2,4-триазол-3-тиолилами для NO-химиотерапии сердечно-сосудистых заболеваний, сопровождающихся воспалительными процессами и осуществлять химический дизайн новых представителей этого семейства.

**Заключение** Автор считает, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые разработаны синтетические подходы к выделению в кристаллической форме и детально изучены представители нового семейства ингибиторов фосфодиэстераз - потенциальных противовоспалительных агентов, генерирующих NO в растворах без дополнительной активации.

**Литература.**

1. Murad F. Nitric Oxide and Cyclic GMP in Cell Signaling and Drug Development // Engl. J. Med. 2006. Vol.355. P.2003-2011.
2. Keravis T., Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments // British J. of Pharmacology. 2012. Vol. 165. P.1288–1305.
3. Архипов В.В. Клиническая фармакология ингибиторов фосфодиэстеразы //

Практическая пульмонология. 2014. № 3. P. 35-41.
4. Bondarev A.D., Attwood M.M., Jonsson J., Chubarev V.N., TarasovV.V., Liu W., Schiöth H.B., Recent developments of phosphodiesterase inhibitors: Clinical trials, emerging indications and novel molecules // Front. Pharmacol. 2022. Vol.13. № 1. P. 057083.
5. Lee S.Y., Müller C.E. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) and its inhibitors // Med. Chem. Comm. 2017. Vol. 8. №. 5. P. 823-840.
6. Megson I.L., Miller M.R. NO and sGC-Stimulating NO Donors. In: Schmidt H.H.H.W., Hofmann F., Stasch J.P. (eds) cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Handbook of Experimental Pharmacology. 2009. Vol. 191. Springer. Berlin. Heidelberg.
7. Sanina N.A., Isaeva Yu.A., Utenyshev A.N., Dorovatovskii P.V., Ovanesyan N.S., Emel'yanova N.S., Pokidova O.V., Tat'yanenko L.V., Sulimenkov I.V., Kotel'nikov A.I., Aldoshin S.M. Synthesis, structure, and PDE inhibiting activity of the anionic DNIC with 5-(3-pyridyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiolyl, the nitric oxide donor // Inorg. Chim. Acta. 2021. Vol. 527. P. 120559.
8. Sanina N.A., Yakuschenko I.K., Gadomskii S.Ya., Utenyshev A.N., Dorovatovskii P.V., Lazarenko V.A, Emel'yanova N.S., Zagainova E.A., Ovanesyan N.S., Mumyatova V.A., Balakina A.A., Terent'ev A.A., Aldoshin S.M. Synthesis, structure and antibacterial activity of dinitrosyl iron complexes (DNICs) dimers functionalized with 5-(nitrophenyl)-4-H-1,2,4-triazole-3-thiolyls // Polyhedron. 2022. Vol. 220. P. 115822.
9. Sanina N.A., Utenyshev A.N., Dorovatovskii P.V., Ovanesyan N.S., Kulikov A.V., Sulimenkov I.V., Luzhkov V.B., Pokidova O.V., Aldoshin S.M. Synthesis, a unique structure and properties of the tetranitrosyl iron complex, the inhibitor of phosphodiesterase 1 // Dalton transactions. 2023. Vol. 52. P. 18090-18101.
10. 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. Journal. 2013. Vol. 47. №.9. P. 455-458.

**Сведения об авторах**

***Наталия Алексеевна Санина***
*доктор хим. наук, профессор. зав.отделом*
*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН*
*Черноголовка, Российская Федерация*
*Эл. почта: sanina@icp.ac.ru*

**Information about author**

***Nataliya Alekseevna Sanina***
*Doctor of Science (Chem.), Professor,*
*Head of Department*
*Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russian*
*Chernogolovka, Russian Federation*
*E-mail: sanina@icp.ac.ru*

ДК 616.34-06:891-07 + 616 + 612.13
ГРНТИ
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.251-261

**В.П. Реутов[1], Н.В. Пасикова[1], Е.Г. Сорокина[2] Л.А. Давыдова[3], В.П. Дерягина[4], З.В. Куроптева[5]**
[1]ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН;
[2]ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр» здоровья детей Минздрава России
[3]Белорусский государственный медицинский университет;
[4]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
[5]ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

# ДИОКСИД АЗОТА ($^{\bullet}NO_2$), ОБРАЗУЮЩИЙСЯ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ, УЧАСТВУЕТ В СОКРАЩЕНИИ СРЕДНЕЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ НАСЕЛЕНИЯ

*Уровень смертности с возрастом увеличивается в геометрической прогрессии. Быстрое прогрессирование возрастных заболеваний обусловлено образованием порочных циклов с участием активных форм азота и кислорода. Таких циклов, когда нарушаются нормальные регуляторные циклы оксида азота и супероксида, а токсичные продукты биохимических реакций, инициируют новый запуск реакций с участием $^{\bullet}NO_2$, $^{\bullet}O_2^-$, пероксинитритов на фоне нарушенных регуляторных циклов NO и $^{\bullet}O_2^-$.*

***Ключевые слова:*** *диоксид азота ($^{\bullet}NO_2$),супероксид ($^{\bullet}O_2^-$), циклы оксида азота и супероксида, продолжительность жизни*

**V.P. Reutov[1], Pasikova[1], E.G. Sorokina[2], L.A. Davydova[3], V.P. Deryagina[4]; Z.V. Kuropteva[5]**
[1]Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences;
[2]National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation;
[3]Belarusian State Medical University;
[4]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
[5]N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences.

# NITRIC DIOXIDE ($^{\bullet}NO_2$), FORMED IN LIVING ORGANISMS, IS PARTICIPATED IN THE DECREASE OF AVERAGE LIFESPAN OF THE POPULATION

*The mortality rate increases exponentially with age. The rapid progression of age-related diseases is due to the formation of vicious cycles involving reactive forms of nitrogen and oxygen. Such cycles, when the normal regulatory cycles of nitric oxide and superoxide are disrupted, and the toxic products of biochemical reactions initiate a new restart of reactions, involving $^{\bullet}NO_2$, $^{\bullet}O_2^-$, peroxynitrites against the background of disrupted regulatory cycles of NO and $^{\bullet}O_2^-$*

***Key words:*** *nitrogen dioxide ($^{\bullet}NO_2$), superoxide ($^{\bullet}O_2^-$), nitric oxide and superoxide cycles, life expectancy*

**Введение.**

Тенденция старения населения во всем мире является серьезной социальной и медицинской проблемой. Уровень смертности с возрастом увеличивается в геометрической прогрессии. Быстрое прогрессирование возрастных заболеваний обусловлено образованием порочных циклов. Таких циклов, когда токсичные продукты биохимических реакций, инициируют новый запуск циклических реакций с участием активных форм азота и кислорода. Подобные процессы описываются функцией экспоненциального роста, когда скорость увеличения пропорциональна значению самой величины. Как правило, такие процессы включают разветвленную цепную реакцию и имеют механизм положительной обратной связи. Анализ динамики развития атеросклероза, геморрагических и ишемических инсультов, гипертонии, диабета, болезни Альцгеймера, Паркинсона и онкологические заболевания показывают, что они подчиняются динамике развития циклов

с положительной обратной связью [1, 2]. Авторы некоторых работ предлагают остановить прогрессирование уровня смертности от возрастных заболеваний, прерывая порочные циклы, когда токсичные продукты биохимических реакций инициируют запуск тех же самых реакций [1–3].

**Снижение средней продолжительности жизни в СССР: причины и следствия.** В 60–70-х годах XX века в СССР было отмечено снижение средней продолжительности жизни. Это явление, прежде всего, было связано с ростом социально значимых заболеваний. Известно, что заболевания этой нозологической группы представляют значительную угрозу здоровью и жизни населения. В первую очередь к этим заболеваниям относятся сердечно-сосудистые заболевания; заболевания, связанные с нарушением мозгового кровообращения; и, наконец, онкологические заболевания. Более 60% онкологических заболеваний выявляются после 60–65 лет на фоне развития гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, развития иммунных и аутоиммунных реакций. Таким образом, все указанные выше социально значимые заболевания развиваются в одинаковых или сходных условиях с теми, которые характерны для сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, ишемических и геморрагических инсультов [4–6].

Долгое время причины снижения средней продолжительности жизни были неизвестны. Поэтому преодолеть снижение средней продолжительности жизни в СССР стремились именно за счет увеличения количества врачей, больниц и поликлиник. За 69 лет в СССР (1922–1991) количество докторов в стране выросло более чем в 60 раз, с 10.9 тыс. в 1921 г. до 667.3 тыс. в 1990 г. Перед Великой Отечественной войной на 10000 человек населения страны приходилось 7 врачей, перед развалом СССР – 45 [5]. В 70-х годах XX века, после того как число врачей на территории СССР стало составлять 20–25% мировых показателей, а проблема продолжала усугубляться, потребовались новые идеи.

**Экспериментальные данные, позволившие обнаружить механизмы, лежащие в основе снижения средней продолжительности жизни.** В середине 70-х годов XX века было установлено, что в условиях гипоксии ионы $NO_2^-$ способны акцептировать электроны с гемсодержащих белков, находящихся в дезокси-форме [9]. Это позволило ответить на вопрос, почему при гипоксии/ишемии активируются процессы превращения нитритов в $^{\bullet}NO/^{\bullet}NO_2$. [7–9, 24]. С возрастом кроме развития гипоксии/ишемии, активируются воспалительные процессы, иммунные и аутоиммунные реакции. Эти процессы и реакции могут усиливать патологические циклы с участием $^{\bullet}NO_2$, $^{\bullet}OH$-радикалов и пероксинитритов [4–9].

**Как организм защищается от воздействия активных форм азота и кислорода?** Еще в 70-х годах XX века мы обратили внимание на то, что нитраты и нитриты после их превращение в $^{\bullet}NO$, окисляются в диоксид азота – $^{\bullet}NO_2$. Окисление оксида азота может происходить относительно медленно при взаимодействии $^{\bullet}NO$ с кислородом ($O_2$). Однако скорость окисления может возрастать в сотни тысяч раз при взаимодействии $^{\bullet}NO$ с супероксидом ($^{\bullet}O_2^-$) [4, 5]. Скорость этих процессов можно сравнить со скоростью микровзрывов, протекающих внутри клеток, субклеточных структур, и, в целом организме. Образование $^{\bullet}NO$ и $^{\bullet}O_2^-$ активируется при гипоксии/ишемии (активация нитритредуктазных систем), воспалительных процессах (активация индуцибельной NO-синтазы), активации иммунных и аутоиммунных реакций (активация NAD(P)H-оксидазных систем, генерирующих супероксид, и, активация индуцибельных NO-синтаз). Около 10 000 известных заболеваний протекают на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, активации иммунных и аутоиммунных реакций. Это означает, что все известные заболевания содержат в себе ***типовой патологический процесс*** [4]. Такой типовой патологический процесс мы рассматриваем как своеобразный «общий знаменатель» практически всех известных заболеваний. Воздействуя на этот типовой патологический процесс можно снижать интенсивность протекания любых известных патологических процессов и заболеваний, в том числе социально-значимых, таких, как

сердечно-сосудистые заболевания, ишемические и геморрагические инсульты, онкологические заболевания. Для этого необходимо уменьшить интенсивность протекания свободно радикальных процессов, включая те, которые протекают на фоне нитрозативного и оксидативного стресса. Организм справляется с оксидативным и нитрозативным стрессом благодаря тому, что $^{\bullet}NO$ и $^{\bullet}O_2^-$ включены в циклы. Концепции этих циклов были предложены на основании анализа данных литературы и результатов собственных исследований [4, 24, 25].

**Циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала.** Л.А. Орбели неоднократно отмечал: «мы мало считаемся с тем, что все процессы осуществляются циклически, и, каждый процесс имеет свою цикличность». В основе типового патологического процесса лежат неспецифические нарушения циклических регуляторных процессов, когда одновременно повышается содержание активных форм азота и кислорода. Выход концентраций активных форм азота и кислорода за пределы регуляторных возможностей биохимических антиоксидантных систем приводит к нарушению ***циклов оксида азота*** и ***супероксидного анион-радикала*** (рис. 1) [4, 5, 24, 25].

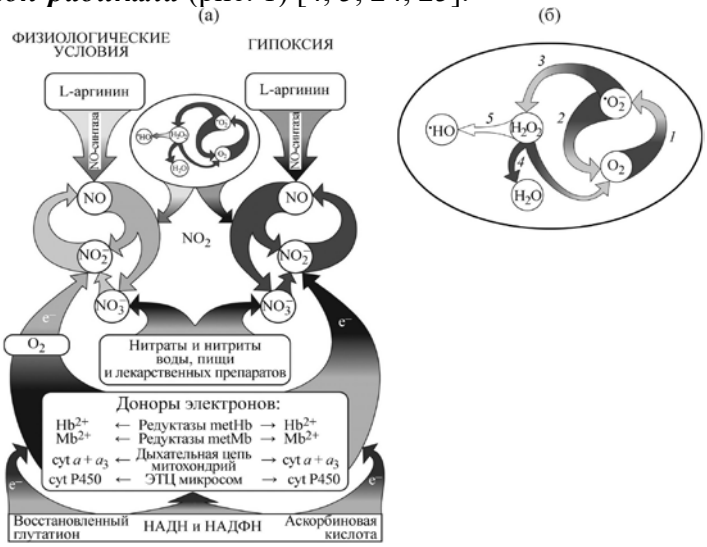



***Рис. 1. Циклы оксида азота (а) и супероксидного анион-радикала (б) [4, 5].***

Согласно развиваемым нами представлениям поддержание концентрации активных форм азота и кислорода также обеспечивается функционированием ***циклов оксида азота*** (NO) и ***супероксидного анион-радикала*** ($^{\bullet}O_2^-$). 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 условиях дефицита кислорода (гипоксии или ишемии) [24, 25]. Ионы $NO_2^-$, образующиеся из L-аргинина, могут вновь при участии нитритредуктазных систем, включающих в себя гемоглобин (Hb), миоглобин (Mb) и цитохромы (cyt $a$ + $a_3$ и cyt P450), замыкать в цикл цепочку «L-аргинин → NO → $NO_2^-$ /$NO_3^-$ ». Кислород, связываясь с гемом, ингибирует нитритредуктазную активность этих белков. При гипоксии и функциональной нагрузке, когда гемсодержащие белки переходят в дезокси-форму, ионы $NO_2^-$ начинают активно восстанавливаться, акцептируя электроны с этих гемсодержащих белков. В ***цикле супероксидного анион-радикала*** происходят: *1* – восстановление $O_2$ и образование супероксидного анион-радикала ($^{\bullet}O_2^-$); *2* и *3* – реакции дисмутации супероксида, катализируемые супероксидисмутазой; *4* – разложение пероксида водорода ($H_2O_2$) на воду ($H_2O$) и молекулярный кислород ($O_2$), осуществляемое ферментом каталазой; *5* – пероксид водорода ($H_2O_2$) также разлагается с образованием двух молекул $^{\bullet}OH$-радикала. Циклическая регуляция активных форм азота и кислорода обеспечивает превращение этих активных, высокореакционных соединений в менее активные вещества. При нарушении ***циклов оксида азота*** и ***супероксидного анион-радикала*** появляются еще более активные молекулы диоксида азота и пероксинитритов, вновь

распадающихся на $NO_2$ и $^{\bullet}OH$-радикалы, которые повреждают основные биохимические компоненты живых организмов [24, 25].

Почему ***циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала*** играют ключевую роль в защите клеток, тканей и органов от повреждений при развитии различных патологических процессов? Анализ данных литературы о реакциях взаимодействия NO с $O_2$ и $^{\bullet}O_2^-$ позволил сделать следующие выводы.

1. Скорость реакции убывания NO при взаимодействии с $O_2$ относительно невелика и соответствует скорости реакции первого порядка ($k$ = 0.124 л ×моль$^{-1}$× с$^{-1}$) [4, 5].
2. С гемсодержащими белками NO может взаимодействовать, образуя нитрозильный комплекс с $Fe^{2+}$ в активном центре. Константа скорости взаимодействия, как правило, варьирует в пределах $10^3$–$10^7$ л×моль$^{-1}$×с$^{-1}$ в зависимости от состояния железа ($Fe^{2+}$ или $Fe^{3+}$) и окружения гема [5].
3. Одновременное повышение содержания активных форм азота (NO и продуктов его превращения) с продуктами превращения кислорода ($^{\bullet}O_2^-$) приводит к тому, что они начинают взаимодействовать друг с другом в общих местах их образования со скоростью в 100000 раз выше, чем с известными природными антиоксидантами, входящими в состав живых организмов. Скорость реакции NO с $^{\bullet}O_2^-$ настолько высокая, что она ограничена только скоростью диффузии молекул друг к другу. Константы скоростей реакций для взаимодействия NO и $^{\bullet}O_2^-$ (6.7 ± 0.9)×$10^9$ л×моль$^{-1}$×с$^{-1}$, что в $10^5$ (или в 100000) раз выше, чем с известными природными фенольными антиоксидантами [4, 5].

Согласно данным, полученным в последние десятилетия, константы скорости взаимодействия фенольных природных антиоксидантов в реакциях с супероксидным анион-радикалом находятся в интервале (6.8–11.0)×$10^4$ л×моль$^{-1}$×с$^{-1}$) [4, 5]. Учитывая тот факт, что NO и $^{\bullet}O_2$ могут взаимодействовать друг с другом со скоростью в 100000 раз выше, чем с известными антиоксидантами можно сделать следующий вывод.

***При одновременном появлении достаточного количества для непосредственного взаимодействия NO и $^{\bullet}O_2$ практически все антиоксидантные системы живых организмов оказываются выключенными, и, открывается возможность для возникновения новых молекул $^{\bullet}NO_2$, $^{\bullet}OH$-радикалов, пероксинитритов, которые, в свою очередь, могут образовывать патогенетический цикл, где эти же соединения начинают воспроизводить сами себя.*** С точки зрения этой концепции повреждение мембран клеток и субклеточных структур при различных патологических процессах является следствием образования диоксида азота ($^{\bullet}NO_2$), способного участвовать в цепных свободно радикальных реакциях и окислять основные биохимические компоненты, входящие в состав живых организмов**:** ДНК/РНК (гуаниновые основания в первую очередь); жирные кислоты (ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов мембран), белки (SH-группы серосодержащих аминокислот и OH-группы тирозиновых остатков белков), с последующим образованием феноксильного радикала и нитрованием тирозина – образованием нитротирозина) [4, 5]. Эта концепция хорошо согласуется с представлениями о том, что «любая болезнь начинается с недостаточности регуляторных механизмов» (Р. Вирхов) и представляет собой, прежде всего, «дизрегуляторную патологию» (Г.Н. Крыжановский).

Всякое обобщение до известной степени предполагает веру в единство и простоту природы. Что касается единства, то ученые, как правило, не встречают каких-либо затруднений. Неизвестным остается вопрос, каким образом природа является единой? (А. Пуанкаре). Применительно к медицине всегда при развитии разных по этиологии патологических процессов необходимо выявление общих закономерностей. Это может послужить основой для теоретических обобщений и построения новых концепций. Патологические изменения органов и тканей *на ранних стадиях болезней*, протекающих на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных, иммунных и аутоиммунных процессов носят неспецифический характер. Они мало отличаются от физиологической нормы. Такие процессы могут осуществляться при различных заболеваниях. Именно поэтому такие

патологические процессы можно отнести к *типовым патологическим процессам*. Они как своеобразный «общий знаменатель» развития многих заболеваний. Влияя на механизмы развития такого *типового патологического процесса*, можно воздействовать и на основное заболевание. Активные формы азота ($^{\bullet}NO$) и кислорода ($^{\bullet}O_2^-$) могут воздействовать практически на все основные компоненты клеток и субклеточных структур. В низких концентрациях они выполняют регуляторную функцию. Однако превышение физиологических концентраций $^{\bullet}NO$ и $^{\bullet}O_2^-$ приводит к образованию анионов пероксинитрита, которые после протонирования распадаются с образованием $^{\bullet}NO_2$ и $^{\bullet}OH$-радикалов. Эти соединения вызывают повреждения практически всех компонентов клеток, в том числе мембран нервных клеток, которые завершаются их гибелью (некрозом). Уменьшение концентрации $^{\bullet}NO$ и $^{\bullet}O_2^-$, может способствовать снижению образования пероксинитритов и продуктов их распада – $^{\bullet}NO_2$ и $^{\bullet}OH$-радикалов. Благодаря этому будет уменьшаться или нивелироваться повреждающее воздействие высокореакционных соединений, и, вследствие этого, будет повышаться выживаемость пациентов при различных заболеваниях.

В процессе эволюции жизни на Земле ионы $NO_2^-$ и кислород ($O_2$) выполняли функцию акцепторов электронов в электронно-транспортной цепи митохондрий. Именно поэтому они были причастны к фундаментальным механизмам – дыханию и энергетике клеток. Многие организмы до сих пор используют нитраты и нитриты в качестве акцепторов электронов в условиях ограниченного доступа к кислороду. Переход от нитратно-нитритного к кислородному дыханию позволил повысить эффективность энергетических механизмов. Гипотеза о нитратно-нитритном дыхании, как предшественнике кислородного дыхания, и, теория эндосимбиотического происхождении митохондрий, рассматриваются всегда вместе. По мнению Ленинджера [26], исходный эндосимбионт мог возникнуть из внутриклеточного паразита с нитратным дыханием, который сумел избежать переваривания в ходе ускоренной эволюции жизни на Земле. Подобные случаи известны и среди современных организмов. Так, бактерии рода *Rhizobium* проникают в клетки корней бобовых и вступают с ними в симбиотические отношения, ассимилируя свободный азот.

Благодаря этому первые живые организмы, которые вели неподвижный/малоподвижный образ жизни (растения и микроорганизмы), получили возможность иметь более эффективные энергетические механизмы. Вместе с эволюцией энергетических механизмов появились виды животных, которые обладали огромной физической силой, и, могли быстро передвигаться, т.е. могли *бегать*, *плавать* и *летать*, а продукты превращения нитритных ионов – $^{\bullet}NO/^{\bullet}NO_2^-$ и кислорода – $^{\bullet}O_2^-$ стали играть регуляторную роль, участвуя в *циклах оксида азота* и *супероксидного анион-радикала*.

Таким образом, история кислорода – это история жизни (Л. Траубе). Она позволяет более глубоко понять клеточную/целлюлярную патологию Р. Вирхова, и то, что *ничто в эволюции жизни не исчезает бесследно*. Любое решение, удачно найденное в процессе эволюции жизни на нашей планете, никогда не исчезает. Оно адаптируется к новым условиям и используется по мере необходимости. «Поэтому мы должны стремиться к тому, чтобы каждую функцию рассмотреть с точки зрения истории ее формирования. Это есть вопрос об изучении эволюции функций. В одном случае мы просто прослеживаем исторический путь развития тех или иных функциональных отношений, а во втором случае, мы подходим к пониманию того, в чем заключается эволюционный процесс, почему именно так протекал эволюционный процесс на основе тех функциональных превращений, которые возникали в живых организмах» (Л.А. Орбели). Ведь любое биологическое исследование оправдано лишь тогда, когда оно имеет «более близкий или далекий, но обязательно эволюционный выход» (Н.В. Тимофеев-Ресовский).

**Одна из наиболее вероятных причин снижения средней продолжительности жизни в СССР в середине XX века.** С 1974 по 1978 гг были получены данные, которые позволили предположить, что восстановление нитратов и нитритов в NO и образование

•$NO_2$ может стать причиной окисления ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов мембран.

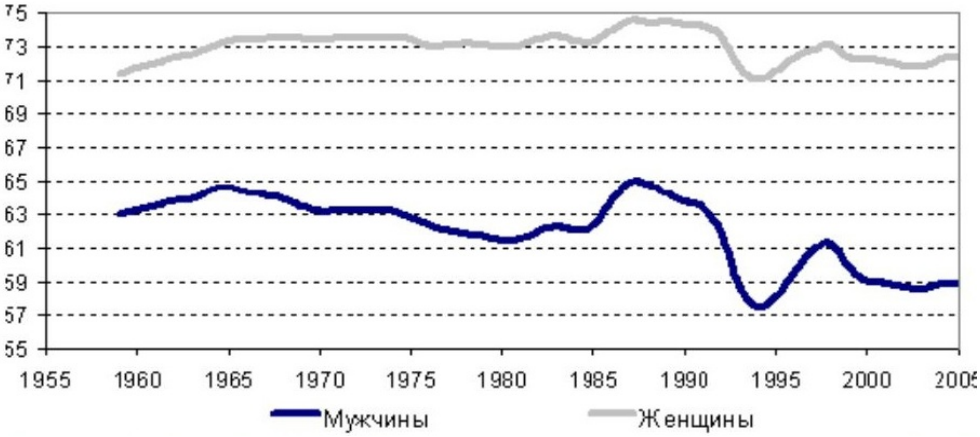



***Рис. 2. Динамика продолжительность жизни в СССР и России с 1960 по 2002 гг.***

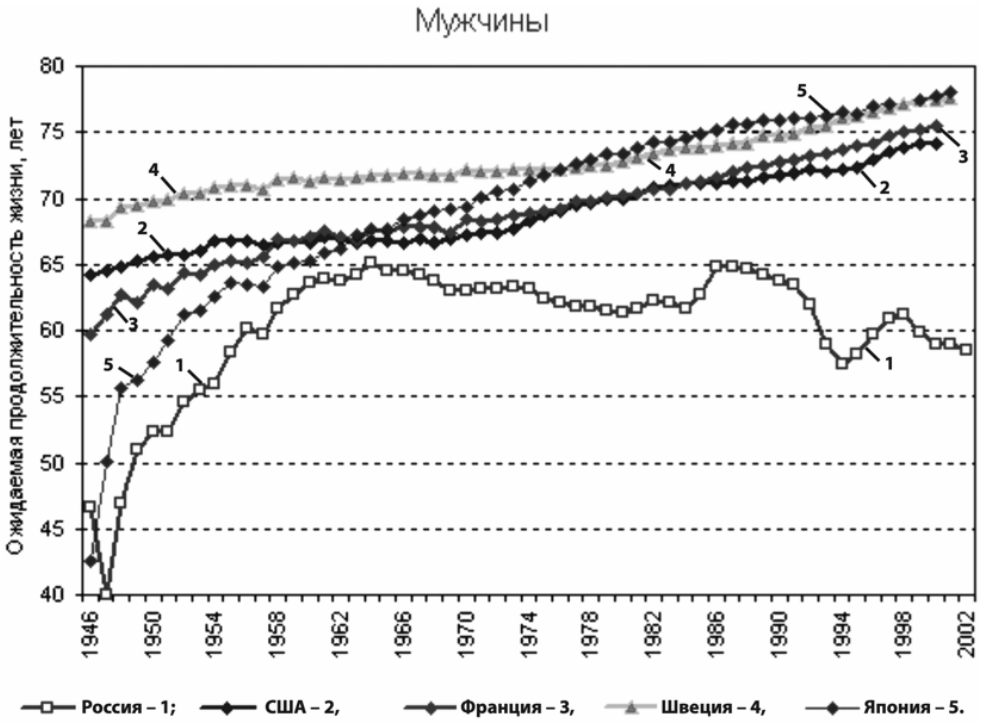


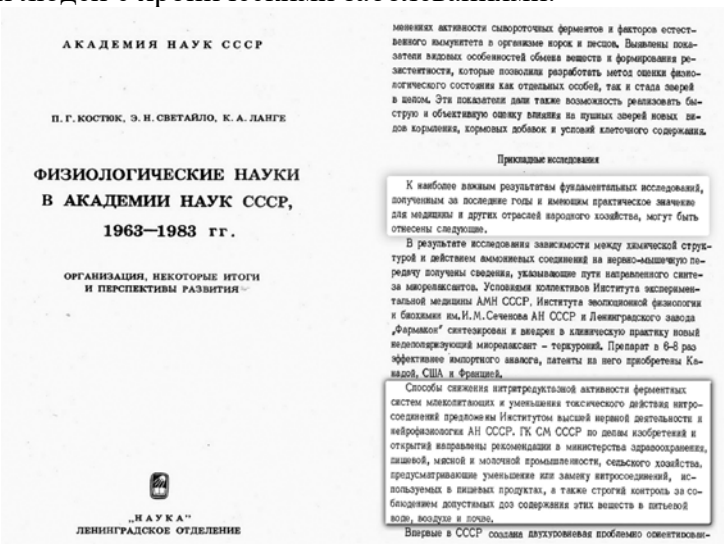

***Рис. 3. Продолжительность жизни в СССР/России, США, Франции, Швеции и Японии (1946–2002 гг.). Источник: Human Mortality Database, http://c.avsim.su/i?u=http://www.demoscope.ru/weekly/2004/0169/img/t_graf01_1.gif [10].***

Такое окисление и повреждение ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов, может вести к гибели клеток, окислению и повреждению гуаниновых оснований ДНК [7–9]. В связи с этим стало ясно, что нельзя допускать избыточного образования весьма активных свободно радикальных соединений, способных повреждать практически все компоненты, входящие в состав клеток и субклеточных структур живых организмов. Высказанные идеи были доложены в присутствии вице-президента АН СССР академика АН СССР Ю.А. Овчинникова, академика АН СССР Н.М. Эмануэля и академика АМН СССР В.В. Закусова. Положительная оценка ведущих ученых АН СССР и поддержка этих исследований вице-президентом АН СССР академиком Ю.А. Овчинниковым способствовало тому, что был остановлен 15–18-летний тренд снижения средней продолжительности жизни в СССР (Рис. 1, 2) [10].

В эти годы (1980–1990) также приостановился рост социально значимых заболеваний, а средняя продолжительность жизни и численность населения СССР стали

постепенно увеличиваться. В 1983 году практическая реализация высказанных идей была признана одним из важнейших достижений Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР/РАН за 20-летний период деятельности Отделения физиологических наук АН СССР (рис. 4) [11]. Результаты работы неоднократно были представлены на выставках АН СССР/РАН (рис. 5). В чем же состояла суть этого достижения?

На основании анализа данных литературы и результатов собственных исследований было высказано предположение, что причиной снижения средней продолжительности жизни населения СССР в 60–80-х годах XX в. явилось решение руководителя государства Н.С. Хрущева повысить урожайность сельскохозяйственных культур – кормовой базы для мелкого, крупного рогатого скота и птиц – за счет химизации сельского хозяйства. Целью решений Н.С. Хрущева было догнать и обогнать Америку по производству мяса, масла и молока. Эту задачу лидер СССР решал с помощью минеральных удобрений, и, прежде всего, использования азотных удобрений. Однако в 60-х гг. XX века не обратили внимания на то, что азотные удобрения могут быть источником, как указывалось выше, весьма активных соединений – $^{\bullet}NO_2$. Эти соединения, как известно, способны развивать цепные свободно радикальные реакции, которые участвуют в процессах, связанных с горением и взрывами. Недаром селитра (соли азотной кислоты) является одним из основных компонентов взрывчатых веществ. Поэтому дополнительное воздействие $^{\bullet}NO_2$ на организм людей в дозах, значительно превышающих физиологически допустимые концентрации этих веществ, на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов, иммунных/аутоиммунных заболеваний могло стать весьма неблагоприятным фактором для пожилых людей и людей с хроническими заболеваниями.



АКАДЕМИЯ НАУК СССР

П. Г. КОСТЮК, Э. Н. СВЕТАЙЛО, К. А. ЛАНГЕ

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ В АКАДЕМИИ НАУК СССР, 1963—1983 гг.

ОРГАНИЗАЦИЯ, НЕКОТОРЫЕ ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

„НАУКА"
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

менениях активности сывороточных ферментов и факторов естественного иммунитета в организме норок и песцов. Выявлены показатели видовых особенностей обмена веществ и формирования резистентности, которые позволили разработать метод оценки физиологического состояния как отдельных особей, так и стада зверей в целом. Эти показатели дали также возможность реализовать быструю и объективную оценку влияния на пушных зверей новых видов кормления, кормовых добавок и условий клеточного содержания.

Прикладные исследования

К наиболее важным результатам фундаментальных исследований, полученным за последние годы и имеющим практическое значение для медицины и других отраслей народного хозяйства, могут быть отнесены следующие.

В результате исследования зависимости между химической структурой и действием аммониевых соединений на нервно-мышечную передачу получены сведения, указывающие пути направленного синтеза миорелаксантов. Условиями коллективов Института экспериментальной медицины АМН СССР, Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР и Ленинградского завода „Фармакон" синтезирован и внедрен в клиническую практику новый недеполяризующий миорелаксант – теркуроний. Препарат в 6-8 раз эффективнее импортного аналога, патенты на него приобретены Канадой, США и Францией.

Способы снижения нитритредуктазной активности ферментных систем млекопитающих и уменьшения токсического действия нитросоединений предложены Институтом высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР. ГК СМ СССР по делам изобретений и открытий направлены рекомендации в министерства здравоохранения, пищевой, мясной и молочной промышленности, сельского хозяйства, предусматривающие уменьшение или замену нитросоединений, используемых в пищевых продуктах, а также строгий контроль за соблюдением допустимых доз содержания этих веществ в питьевой воде, воздухе и почве.

Впервые в СССР создана двухуровневая проблемно ориентирован-

**Рис. 4.** Отчет по Отделению физиологии АН СССР (1963–1983 гг.) акад. АН СССР П.Г. Костюка, Э.Н. Светайло и К.А. Ланге [11]. В этом отчете отмечено, что «к наиболее важным результатам фундаментальных исследований за последние годы и имеющим практическое значение для медицины и других отраслей народного хозяйства могут быть способы снижения нитритредуктазной активности ферментных систем млекопитающих и уменьшение токсического действия нитросоединений, которые были предложены Институтом высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР. Государственным комитетом Совета Министров СССР по делам изобретений и открытий направлены рекомендации в министерства здравоохранения, пищевой, мясной и молочной промышленности, сельского хозяйства, предусматривающие уменьшение или замену нитросоединений, используемых в пищевых продуктах, а также строгий контроль соблюдения допустимых доз содержания этих веществ в питьевой воде, воздухе и почве».

Поэтому проблема воздействия нитросоединений на организм человека по-прежнему остается одной из наиболее актуальных проблем современной биологии и медицины. От решения этой проблемы зависит качество жизни, здоровье и

продолжительность жизни населения. Особенно, если учесть, что повышенный фон свободных радикалов – активных форм кислорода и азота в крови и тканях у пожилых пациентов и людей с хроническими формами заболеваний, могут быть причиной снижения их средней продолжительности жизни. Таким образом, суть этого достижения состояла в том, что предложенные меры по снижению нитратно-нитритного фона, активности нитритредуктазных систем, а вместе с ними, и, существенное уменьшение концентрации молекул $^{\bullet}NO_2$, которые участвуют в процессах повреждения практически всех компонентов клеток в живых организмах, остановило снижения средней продолжительности жизни населения СССР.

***Рис. 5. Работа, выполненная в ИВНД и НФ АН СССР/РАН, неоднократно была представлена на выставках АН СССР и РАН. Однако после смерти вице-президента АН СССР Ю.А. Овчинникова (1934–1988), несмотря на поддержку академика РАН П.В. Симонова (1926–2002) и академика РАМН и АН Беларуси В.Н. Гурина (1938–2007) достичь успеха 1983–1990 гг. не удалось.***

В дальнейшем наметилось повышение в разных регионах на 3–5 лет средней продолжительности жизни населения СССР. В конечном итоге научное достижение Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР/РАН (ИВНД и НФ АН СССР/РАН) способствовало тому, что в тяжелые годы перестройки, численность населения за 10 лет (1980–1990) выросла на 24.1 млн. человек (с 264.5 в 1980 г. до 288.6 млн. в 1990 г.). К началу 1991 г. численность населения (по текущей оценке) возросла до 289.2 млн. человек. Это был самый высокий прирост численности населения за 69 лет существования СССР [5].

Результаты, полученные в 70–90-х гг. XX в., мы неоднократно проверяли в работе с сотрудниками других НИИ. Всего за 45–50-летний период соавторами наших статей стали более 250 исследователей. Совместно с сотрудниками Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России были проведены исследования, которые позволили подойти к механизмам образования атеросклеротических бляшек при сердечно-сосудистых заболеваниях, предшествующих развитию инфарктов миокарда [12–20]. Известно, что образование атеросклеротических бляшек, как правило, наблюдается в местах бифуркации сосудов. Именно в этих местах сосудистой системы наиболее активно работает эндотелиальная NO-синтаза, продуцирующая повышенные количества NO [21]. Это необходимо для регуляции тонуса сосудов, чтобы обеспечить расслабление гладкомышечных элементов там, где крупный сосуд разветвляется на более мелкие сосуды. Активная работа эндотелиальных NO-синтаз создает предпосылки для появления весьма активных молекул $^{\bullet}NO_2$ и возникновения повреждений эндотелия и интимы сосудов. При этом также страдает симпатический отдел вегетативной нервной системы и возникает нервно-дистрофический процесс, предшествующий развитию кардиоваскулярной патологии [12–20]. Таким образом, нарушение нормальных регуляторных механизмов на фоне снижения медиаторов симпатической нервной системы – норадреналина и адреналина, обладающих антиоксидантными свойствами, наблюдаются изменения в интиме сосудов. Эти изменения

усиливаются, если повреждается эндотелий кровеносных сосудов [21] и развиваются воспалительные процессы, на фоне которых активируется индуцибельная NO-синтаза [9, 22]. Образованию атеросклеротических бляшек предшествуют оксидативный и нитрозативный стресс и формирование в интиме сосудов липопротеиновых комплексов. Исследователи и врачи также отмечают важную роль нейрогенных факторов в возрастных изменениях интимы сосудов и в феномене ранней инволюции симпатического отдела вегетативной нервной системы при развитии кардиоваскулярной патологии [14–20]. Для того чтобы защитить человека от воздействия нитратов, нитритов и оксидов азота, содержащихся в пищевых продуктах, воде, лекарственных препаратах и в воздухе, необходима длительная и продуманная работа государственных медицинских служб. Сам человек может уменьшить воздействие указанных выше вредных факторов, если будет вести здоровый образ жизни, рационально и умеренно питаться, обеспечив себя полноценным сном, физическими упражнениями, закаливанием и максимально доброжелательным отношением к окружающим его людям.

Когда врачи говорят, что человек практически здоров, – это не значит абсолютное отсутствие болезней. Здоровье – это, прежде всего, возможность организма поддерживать гомеостаз (постоянство переменных показателей внутренней среды) на протяжении всей жизни. Сохранение гомеостатической способности организма до глубокой старости позволяет организму достичь долголетия. Современная статистика демонстрирует, что для всех основных заболеваний характерен экспоненциальный рост смертности с возрастом. Причиной такого лавинообразного прогрессирования заболеваний являются повторяющиеся циклы реакций, многократно усиливающие вред первоначально некритичных изменений в организме. Предполагается, что увеличение продолжительности жизни не изменит сам принцип циклов с положительной обратной связью как основы экспоненциального прогрессирования зависимых от возраста заболеваний [23]. Постепенное умирание организма – это та цена, которую человек платит за относительно долгие годы жизни. Авторы некоторых работ предлагают остановить прогрессирование уровня смертности от возрастных заболеваний, прерывая порочные циклы, когда токсичные продукты биохимических реакций инициируют запуск тех же самых реакций [1–3]. Таким образом, развиваемые нами представления о защитной роли регуляторных циклов NO и $^{\bullet}O_2^-$, участвующих в предотвращении гипоксии/ишемии, воспалительных, иммунных и аутоиммунных процессов [4, 5, 9, 12, 20, 22], нашли свое подтверждение и дальнейшее развитие в этих работах.

**Заключение.** ***Авторы считают, что принципиально новыми являются обобщающие идеи о том, что $NO_2$, образующийся в живых организмах, участвует в разрушении клеток, субклеточных структур и нормальных регуляторных циклов NO и $^{\bullet}O_2^-$, которые не позволяют запустить патогенетические циклы с участием $^{\bullet}NO_2$, $^{\bullet}O_2^-$ и пероксинитритов. Прерывая подобные повторяющиеся патогенетические циклы реакций, многократно усиливающие вред первоначально некритичных изменений в организме, можно остановить прогрессирование уровня смертности от возрастных заболеваний.***

**Литература.**

1. A.V. Belikov. Ageing Res Rev. **1.** 11–26. (2019).
2. A.V. Belikov, B. Schraven, L. Simeoni. J. Biomed. Sci. **22.** 85. (2015).
3. A.V. Belikov, S.V. Leonov. Peer J.. **10.** 2672. (2022)
4. В. П. Реутов, Н. В. Самосудова, Е. Г. Сорокина. Биофизика **64** (2). 316 (2019).
5. В. П. Реутов, Давыдова Л. А., Е. Г. Сорокина. Биофизика. **67** (5) 109 (2022).
6. Я.И. Ажипа, В.П. Реутов, Л.П. Каюшин. Физиология человека. Т.20. №3. С.165. (1990).
7. V. P. Reutov, Ia. I. Azhipa, L. P. Kaiushin. Biull. Eksp. Biol. Med. **86** (9), 299 (1978).

8. В.П. Реутов, Я.И. Ажипа, Л.П. Каюшин. Доклады Академии наук. **241**. (6), 1375. (1978).
9. В.П. Реутов, Я.И. Ажипа, Л.П. Каюшин. Известия АН СССР, сер.биол. **3**, 408, (1983).
10. http://c.avsim.su/i?u=http://www.demoscope.ru/weekly/2004/0169/img/t_graf01_1.gif
11. П. Г. Костюк, Э. Н. Светайло и К. А. Ланге, *Физиологические науки в Академии наук СССР* (1963–1983), (1983).
12. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Н. Швалев, и др. Успехи физиол. наук. 43 (4), 72 (2012).
13. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза, В. Б. Сергиенко, А. А. Аншелес, В. П. Ковалев. Тихоокеанский медицинский журнал. (1), 10 (2014).
14. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза. Евразийское научное объединение. **1** (13). 77 (2016).
15. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза. Морфологические ведомости. (3), 6 (2012)
16. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, В. Б. Сергиенко. Казанский медицинский журнал. 95 (2), 175 (2014).
17. В. Н. Швалев, А. Н. Рогоза, В. П. Реутов. Казанский медицинский журнал. 97 (4), 598 (2016).
18. В. Н. Швалев, А. Н. Рогоза, Н. А. Тарский, В. Б. Сергиенко, А. А. Аншелес, В. П. Реутов, А. А. Юдаев. Тихоокеанский медицинский журнал. (1), 42 (2017).
19. В. Н. Швалев, В. П. Реутов, А. Н. Рогоза, В. Б. Сергиенко, А. А. Сосунов, В. П. Ковалев. Морфологические ведомости. (1), 6 (2014)
20. В. П. Реутов, В. Н. Швалев, В. Н. Розинова, Е. Г. Сорокина, Н. В. Самосудова. Евразийский Кардиологический Журнал. (3),108 (2016).
21. Д. К. Гайнуллина, О. О. Кирюхина, О. С. Тарасова, Успехи физиол. наук. **44** (4), 88 (2013).
22. В. П. Реутов, В. Е. Охотин, А. В. Шуклин, и др. Успехи физиол. наук. 38 (4), 39 (2007).
23. В. Н. Новосельцев, Ж. А. Новосельцева. Успехи геронтологии. 24 (4) 553 (1911).
24. В. П. Реутов. Успехи биологической химии. **35,** 189, (1995).
25. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Е. Охотин, Н. С. Косицын, *Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих*. (М. 1998).
26. A. L. Lehninger, *The mitochondrion; molecular basis of structure and function*. (N.-Y. 1964).



**Сведения об авторах**

***Валентин Палладиевич Реутов***
*докт. биол. наук, ведущий научный сотрудник*
*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН*
Москва, Россия
*Эл. почта: valentinreutov@mail.ru*

***Наталья Викторовна Пасикова***
*канд. биол. наук, главный научный сотрудник*
*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН*
Москва, Россия
*Эл. почта: natpas@mail.ru*

**Information about author**

***Valentin Palladievich Reutov***
*Doctor of Biol. Science, Leading Researcher*
*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences, Moscow*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: valentinreutov@mail.ru*

***Nataliya Victorovna Pasikova***
*PhD., Leading Researcher*
*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences, Moscow*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: natpas@mail.ru*

***Елена Геннадьевна Сорокина***
*канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник*
*Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:sorokelena@mail.ru*

***Людмила Александровна Давыдова***
*канд. мед. наук, доцент*
*Белорусский государственный медицинский университет*
*Минск, Белоруссия*
*Эл. почта: la-davydova@yandex.by*

***Валентина Петровна Дерягина,***
*канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник*
*ФГБУН «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России*;
*Москва, Россия;*
*Эл. почта:* derygina@inbox.ru
***Зоя Вениаминовна Куроптева,***
*докт. биол. наук, ведущий научный сотрудник*
*ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук*
*Эл. почта:* zv.kuropteva@gmail.com

***Elena Gennad'evna Sorokina***
*PhD., Leading Researcher*
*National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of health of the Russian Federation*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: sorokelena@mail.ru*

***Lyudmila Alexandrovna Davydova***
*Ph.D., Associate Professor*
*Belarusian State Medical University*
*Minsk, Belorussia*
*E-mail: la-davydova@yandex.by*

***Valentina Petrovna Deryagina***,
*PhD, Leading Researcher*
*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; Moscow, Russia;*
*E-mail:*derygina@inbox.ru

***Zoya Veniaminovna Kuropteva***
*Doctor of Biol. Science, Leading Researcher*
*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences.*
*E-mail:* zv.kuropteva@gmail.com

**УДК 616.062**
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.261-268

**Е.Г. Сорокина[1], В.П. Реутов[2], Ж.Б. Семенова[3], О.В. Карасева[3], В.Г. Пинелис[1], И.Е. Смирнов[1]**
[1]ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России,
[2]ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
[3]НИИ неотложной детской хирургии и травматологии

# ВЛИЯНИЕ NO И НИТРИТОВ НА УРОВЕНЬ АТФ В ЛИМФОЦИТАХ И СВЯЗЬ С УРОВНЕМ АУТОАНТИТЕЛ К РЕЦЕПТОРАМ ГЛУТАМАТА У ДЕТЕЙ, ПЕРЕНЕСШИХ ЧЕРЕПНО- МОЗГОВУЮ ТРАВМУ

*В статье представлены экспериментальные данные влияния NO-генерирующих веществ (нитритов и S-нитрозоцистеина) на содержание АТФ в лимфоцитах человека. У детей, перенесших черепно-мозговую травму (ЧМТ) определен уровень АТФ в лимфоцитах и содержание аутоантител (аАТ) к рецепторам глутамата (NMDA GluRc) и нейроглиальному белку S100b в динамике посттравматичесого периода.*

***Ключевые слова:*** *АТФ в лимфоцитах, влияние NO, аАТ к NMDA GluRc, аАТ к S100b, ЧМТ, дети*

**E.G. Sorokina[1], V.P. Reutov[2], Z.B. Semenova[3], O.V. Karaseva[3], V.G. Pinelis[1], I.E. Smirnov[1]**
[1]"National Medical Research Center for Children's Health" of the Ministry of Health of Russia
[2]Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences
[3]Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology

## THE EFFECT OF NO AND NITRITES ON THE LEVEL OF ATP IN LYMPHOCYTES AND THE RELATIONSHIP WITH THE LEVEL OF AUTOANTIBODIES TO GLUTAMATE RECEPTORS IN CHILDREN WHO HAVE SUFFERED A TRAUMATIC BRAIN INJURY

*The article presents experimental data on the effect of NO-generating substances (nitrites and S-Nitrosocysteine) on the content of ATP in human lymphocytes. In children who suffered traumatic brain injury (TBI), the level of ATP in lymphocytes and the content of autoantibodies (aAb) to glutamate receptors (NMDA GluRc) and neuroglial protein S100b were determined in the dynamics of the post-traumatic period.*
***Keywords**: ATP in lymphocytes, effect of NO, aAT to NMDA GluRc, at to S100b, TBI, children*

**Введение** Роль иммунной системы в патогенезе ЧМТ неоспорима и показана в работах [1, 2]. Защитный иммунный ответ на вирусы, бактерии и другие патогены при ЧМТ требует не только эффективных способов индукции, но и адекватного ограничения его интенсивности и продолжительности. Иммунная система поддерживает сложную сеть клеточных и гуморальных компонентов, которые в идеале помогают предотвращать чрезмерные реакции и повреждение тканей, а также устранять воспаления. Все больше данных свидетельствует о том, что воспаление и активация иммунной системы являются основной причиной вторичных повреждений при ЧМТ.

В наших работах было показано, что при ЧМТ происходит ранняя активация аутоиммунных процессов и увеличение уровня различных аАТ в сыворотке крови: аАТ к рецепторам глутамата (GluRc) AMPA и NMDA типов, аАТ к α2-субъединице рецепторов ацетилхолина (AchRc), нейроглиальному белку S100b [3,4,5]. Подобная активация отмечалась с 1го дня и увеличивалось к 7-15 дню посттравматического периода, независимо от тяжести ЧМТ. Однако были выявлены определенные отличия динамики в зависимости от тяжести и исходов ЧМТ [6]. Первым объектом наших исследований были GluRc, что обьяснялось центральной ролью возбуждающей аминокислоты глутамата и возникновением гиперстимуляции GluRc и глутаматной нейротоксичности при повреждениях мозга гипоксического характера. К таким заболеваниям, прежде всего, относятся инсульты, эпилепсия и ЧМТ.

В литературе имеются данные о способности оксида азота (NO) оказывать влияние на иммунную систему [7]. Учитывая центральную роль NO в нейрональном «Glu каскаде» со значительными изменениями содержания АТФ в нейронах, а также наличие GluRc NMDA типа в лимфоцитах, представлялось актуальным изучить воздействие NO на содержание АТФ в лимфоцитах.

**Цель работы**. Оценить влияние различных концентраций NO-генерирующих соединений ($NANO_2$ и S-Nitrosocystein, SNOC) на содержание внутри- и экстраклеточной АТФ в лимфоцитах человека и проанализировать взаимосвязь образующегося при ЧМТ NO с инициацией аутоиммунных процессов у детей с различной тяжестью ЧМТ.

**Материалы и методы.** Для анализа использовали сыворотку детей, перенесших ЧМТ. Тяжесть ЧМТ оценивали по шкале комы Глазго (ШКГ), исход – по шкале исходов комы Глазго (ШИГ). Выделение лимфоцитов осуществлялось в градиенте фикола по стандартной методике. Экспозицию суспензии лимфоцитов с различными концентрациями NO проводили в растворе RPMI (30 мин), Экстракцию АТФ осуществляли с

помощью 2% ТХУ с 2мМ ЭДТА с последующей нейтрализацией tris/KOH. К 50 мкл суспензии лимфоцитов добавляли 200 мкл ТХУ/ЭДТА (2 мкл 200 mM ЭДТА + 198 мкл 2% ТХУ) и держали 10 мин на льду. После центрифугирования (+4ºС, 10 мин, 12000 об/мин) супернатант переносили в другую пробирку и нейтрализовали с помощью Tris\KOH. Определение концентрации АТФ в трис-ацетатном буфере (pH=7,76) проводили на люминометре Lucy-1 (Австрия) с помощью люциферин-люциферазы (Promega). Концентрацию АТФ выражали в нмоль на мг белка, который определяли методом Брэдфорда с помощью наборов Fluka. Содержание аАТ к NMDA GluRc и S100b определяли иммуноферментными методами, описанными в работах [3,4]. Содержание NOx определяли с наборами R&D systems (USA).

**Полученные результаты.** Наши представления о роли и значимости содержания АТФ в лимфоцитах в патогенезе острого периода ЧМТ сложились при проведении экспериментов in vitro, в которых проводили инкубацию лимфоцитов с веществами, способными генерировать повышение концентрации NO: S-нитрозоцистеином (SNOC) и нитритом натрия ($NaNO_2$). В экспериментах in vitro мы оценивали изменение внутриклеточного и экстраклеточного уровня АТФ (еАТФ) в лимфоцитах при воздействии разных концентраций NO, содержание которого возрастает при сопровождающей ЧМТ гипоксии мозга у детей [3]. Известно, что увеличение еАТФ приводит к апоптозу и гибели клеток [10,11].

В наших экспериментах показано, что при возрастании концентраций NO до определенного уровня повышается содержание внутриклеточной АТФ (iАТФ), однако при достижении концентрации NO $10^3$-$10^4$ мкМ происходит резкое снижение содержания iАТФ и увеличение содержания еАТФ (рис.1А и 1Б).

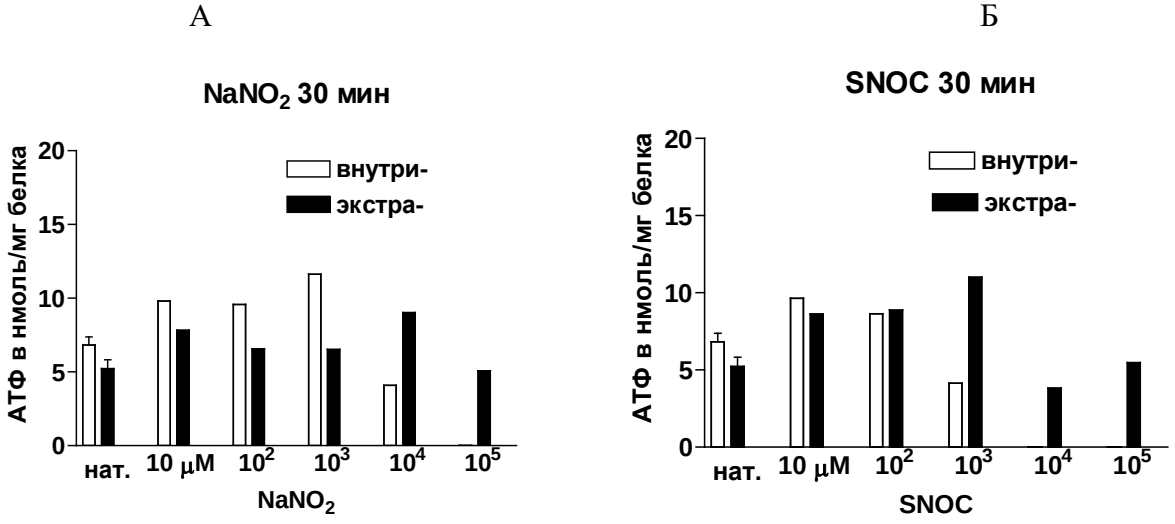



***Рис. 1. Содержание АТФ в лимфоцитах при воздействии различных концентраций NO-генерирующих соединений: А- $NaNO_2$; Б – S-нитрозоцистеина (SNOC)***

Как было ранее показано нами, аналогично действию на лимфоциты, NO действует на АТФ в культуре нейронов мозжечка: в малых концентрациях повышает содержание iАТФ, а в больших - снижает (это особенно характерно для SNOC) [12].

Таким образом, эксперименты in vitro явились основанием для предположений о том, что при разной тяжести ЧМТ и разном уровне продуктов NO будет наблюдаться различная динамика iАТФ в лимфоцитах.

Индивидуальный анализ динамики содержания АТФ в лимфоцитах после перенесенной ЧМТ был проведен с учетом тяжести ЧМТ и признаков повреждения мозга по показаниям уровня маркеров нейрофункциональных белков S100b и NSE, а также уровня

аАТ к S100b и NMDA GluRc в сыворотке крови.

При легкой ЧМТ (ШКГ =14 баллов) и полном восстановлении неврологических функций (ШИГ 5) отмечался рост уровня iАТФ в лимфоцитах в первые 5 дней после ЧМТ с последующим колебанием в пределах 50% и повышение к моменту выздоровления и выписки. Уровень АТФ в сыворотке крови (аналог еАТФ) в первые 7 дней после ЧМТ имел противоположную динамику по отношению к iАТФ, но в дальнейшем полностью совпадал с содержанием АТФ в лимфоцитах (рис. 2).

Уровень NOx ($NO_2$+$NO_3$) при легкой ЧМТ был самым низким из всех групп, но с небольшим превышением NOx в контроле (19±2μM при 10±5 μM в контроле). Именно при небольшом повышении содержания NOx в плазме мы отмечали значительное раннее (в 1й день после ЧМТ) повышение уровня аАТ к NMDA GluRc (рис. 2).

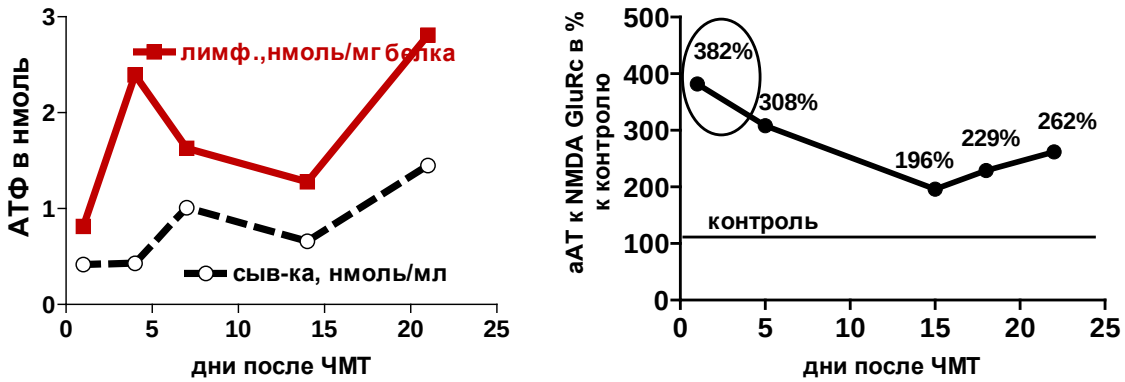



*Рис. 2. Динамика содержания АТФ и аАТ к NMDA GluRc в лимфоцитах и сыворотке крови у детей с легкой ЧМТ и благоприятным исходом*

При благоприятном исходе отмечался повышенный уровень аАТ к NMDA GluRc в 1й день после ЧМТ с дальнейшим снижением по мере выздоровления. Эти данные подтверждали ранее полученные нами результаты о благоприятном исходе ЧМТ у детей с более высоким уровнем аАТ к NMDA GluRc [3,6] и позволили выдвинуть гипотезу о защитной роли повышения аАТ к NMDA GluRc в первый день после ЧМТ.

Уровень S100b и NSE при благоприятном исходе после «физиологического» повышения нормализовался к 3му дню после ЧМТ и не превышал контрольных значений. Уровень аАТ к S100b белку в этой группе не превышал 120%.

При тяжелой ЧМТ, которая оценивалась по ШКГ <9 баллов, наблюдалась отличная картина. Выявлена тенденция к снижению уровня АТФ в лимфоцитах и сыворотке крови, а также достаточно низкий уровень аАТ к NMDA GluRc в первые дни после ЧМТ (рис. 3). Повышение уровня аАТ после первых 10 дней расценивалось нами как вторичная гипоксия и сопровождалось повышением содержания NOx [3].

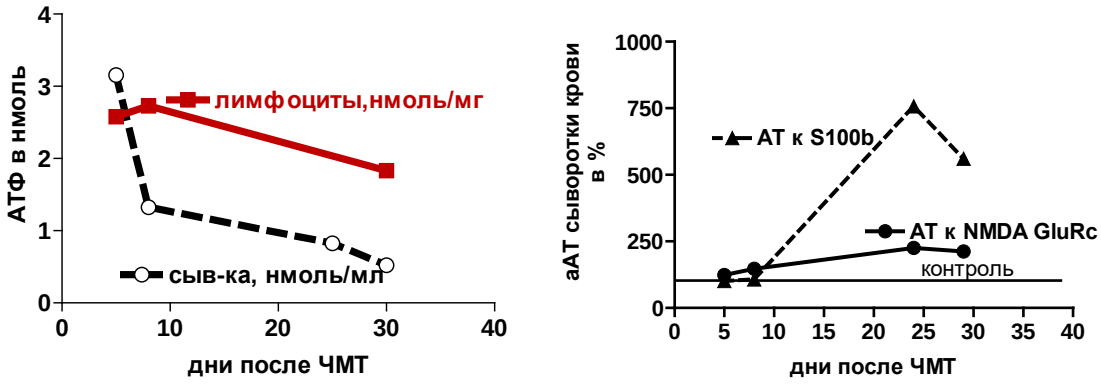



*Рис. 3. Содержание АТФ и динамика уровня аАТ к NMDA GluRc и аАТ к S100b в лимфоцитах и сыворотке крови при тяжелой ЧМТ (ШКГ=8 баллов) с ШИГ=4 (инвалидизация средней тяжести)*

При тяжелой ЧМТ с ШИГ=2 (вегетативное состояние) при начально высоком абсолютном уровне АТФ в первые дни после ЧМТ наблюдалось последующее снижение уровня АТФ в лимфоцитах с повышением уровня АТФ в сыворотке крови (рис. 4). При этом при низком содержании белка S100b отмечался повышенный уровень аАТ к S100b и аАТ к NMDA GluRc. Содержание NOx в плазме в этой группе не измерялось, Уровень NOx в этой группе не измерялся, но уровень 3-Nitrotyrosine в плазме был несколько увеличен (7-42 нМ при следовых количествах в норме).

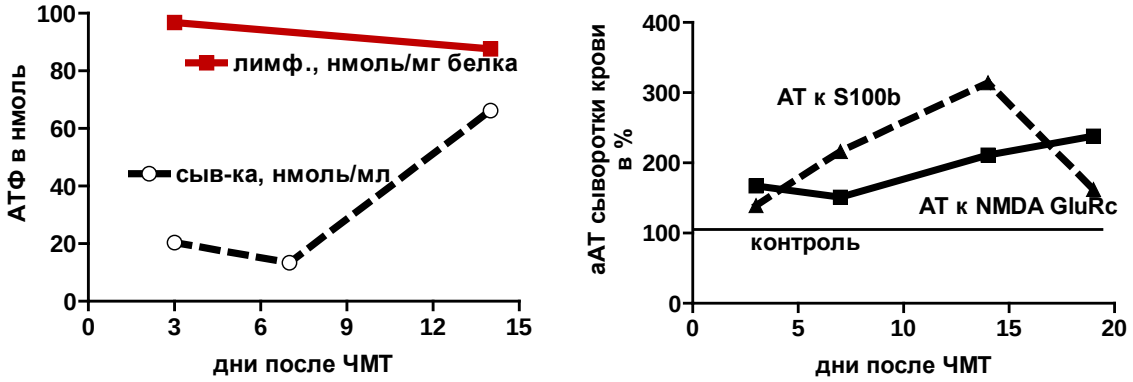



***Рис. 4. Содержание АТФ в лимфоцитах и динамика уровня аАТ к NMDA GluRc и аАТ к S100b в лимфоцитах и сыворотке крови при тяжелой ЧМТ и сыворотке крови при тяжелой ЧМТ (ШКГ=7 баллов) с ШИГ=2 (вегетативное состояние).***

В случае тяжелой ЧМТ с летальным исходом (ШИГ 1) наблюдалась практически параллельная динамика содержания АТФ в лимфоцитах и сыворотке крови с окончательным резким снижением уровня АТФ и в лимфоцитах и сыворотке крови. Показанная динамика сопровождалась невысоким начальным уровнем аАТ к NMDA GluRc и S100b с последующим их ростом. Отмечался значительный рост уровня самого глиального белка S100b и NSE на протяжении всего посттравматического периода. Уровень NOx в этой группе достигал 176 ± 45 μM.

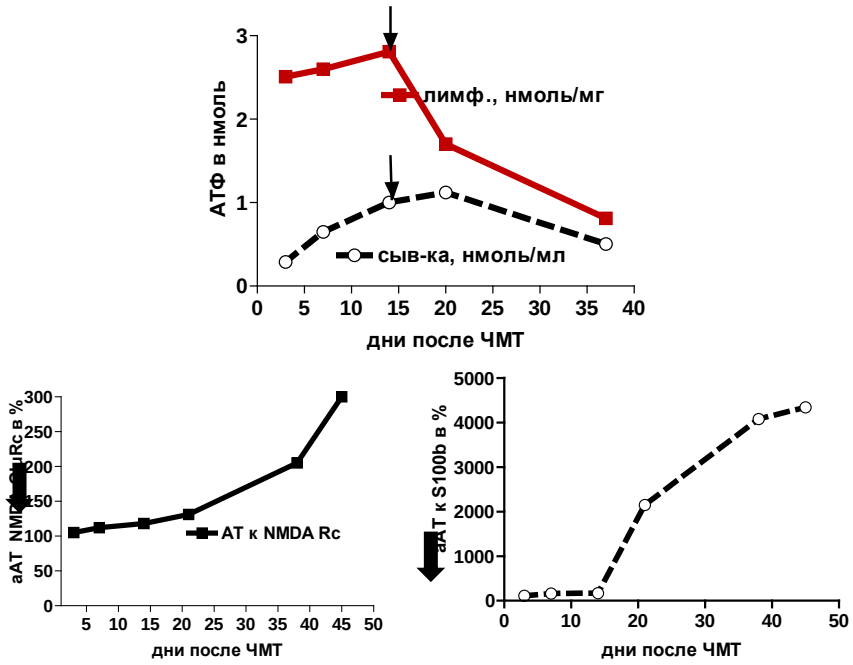



***Рис. 8. Содержание АТФ в лимфоцитах и сыворотке крови при тяжелой ЧМТ (ШКГ=3 баллов) с ШИГ 1 (летальный исход).***

Состояние пациента с тяжелой ЧМТ (ШКГ=3) резко ухудшилось к концу 2й недели. Переломный момент в состоянии здоровья пациента обозначен на рисунках вертикальной стрелкой). Пациенты этой группы соответствовали экспериментальному варианту с лимфоцитами, когда наблюдалось снижение и внутри- и экстраклеточной АТФ.

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

1. Подъем уровня АТФ в лимфоцитах сразу после ЧМТ является благоприятным признаком, отражающим активацию лимфоцитов.
2. Более высокий уровень аАТ к рецепторам глутамата сразу после тяжелой ЧМТ является благоприятным признаком для исхода ЧМТ и совпадает с повышением iАТФ в лимфоцитах.
3. Продолжительная отрицательная динамика содержания АТФ в лимфоцитах с аналогичной динамикой в сыворотке при тяжелых ЧМТ является неблагоприятным признаком исходов тяжелой ЧМТ.
4. Продолжающееся увеличение содержания аАТ к рецепторам глутамата после 2х недель может отражать нарастающую вторичную гипоксию.
5. NO при умеренном повышении в плазме сразу после ЧМТ способствует повышению iАТФ в лимфоцитах и повышению аАТ к GluRc, что активирует иммунный ответ и защищает мозг от гипоксических повреждений.

**Литература**


1. Plesnila N. The immune system in traumatic brain injury. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;26:110-117. doi:10.1016/j.coph.2015.10.008
2. Balu R. Inflammation and immune system activation after traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2014;14(10):484. doi:10.1007/s11910-014-0484-2
3. 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. (2009). Autoantibodies to glutamate receptors and products of nitric oxide metabolism in serum in children in the acute phase of craniocerebral trauma. *Neuroscience and behavioral physiology*, *39*(4), 329–334. https://doi.org/10.1007/s11055-009-9147-1
4. Sorokina, E. G., Semenova, Z.hB., Granstrem, O. K., Karaseva, O. V., Meshcheriakov, S. V., Reutov, V. P., Sushkevich, G. N., Pinelis, V. G., & Roshal', L. M. (2010). S100B protein and autoantibodies to S100B protein in diagnostics of brain damage in craniocerebral trauma in children *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova*, *110*(8), 30–35. PMID: 20823827
5. Sorokina, E. G., Vol'pina, O. M., Semenova, Z.hB., Karaseva, O. V., Koroev, D. O., Kamynina, A. V., Reutov, V. P., Salykina, M. A., Panova, A. V., Goriunova, A. V., Pinelis, V. G., & Roshal', L. M. (2011). Autoantibodies to α7-subunit of neuronal acetylcholine receptor in children with traumatic brain injury *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova*, *111*(4), 56–60. PMID: 21512503
6. Sorokina, E. G., Semenova, Z. B., Reutov, V. P., Arsenieva, E. N., Karaseva, O. V., Fisenko, A. P., Roshal, L. M., & Pinelis, V. G. (2021). Brain Biomarkers in Children After Mild and Severe Traumatic Brain Injury. *Acta neurochirurgica. Supplement*, *131*, 103–107. https://doi.org/10.1007/978-3-030-59436-7_22
7. Bogdan C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in immunology*, *36*(3), 161–178. https://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003
8. Sorokina EG, Reutov VP, Senilova YE, Khodorov BI, Pinelis VG. 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;143(4):442-445. doi:10.1007/s10517-007-0151-6

9. Kozlov, A. V., Bahrami, S., Redl, H., & Szabo, C. (2017). Alterations in nitric oxide homeostasis during traumatic brain injury. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, *1863*(10 Pt B), 2627–2632. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.12.020
10. Liu, J., Liu, T. T., Mou, L., Zhang, Y., Chen, X., Wang, Q., Deng, B. L., & Liu, J. (2024). P2X7 receptor: a potential target for treating comorbid anxiety and depression. *Purinergic signalling*, 10.1007/s11302-024-10007-0. Advance online publication. https://doi.org/10.1007/s11302-024-10007-0
11. Kyawsoewin, M., Manokawinchoke, J., Termkwanchareon, C., Egusa, H., Osathanon, T., & Limraksasin, P. (2024). Extracellular adenosine triphosphate regulates inflammatory responses of periodontal ligament cells. *Journal of periodontology*, *95*(3), 281–295. https://doi.org/10.1002/JPER.23-0389
12. Sorokina, E. G., Reutov, V. P., Senilova, Y. E., Khodorov, B. I., & Pinelis, V. G. (2007). 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*, *143*(4), 442–445. https://doi.org/10.1007/s10517-007-0151-6

***Авторы выражают благодарность профессору Рошалю Леониду Михайловичу за многолетнюю поддержку научных исследований по патогенезу черепно-мозговой травмы у детей***

**Сведения об авторах**

***Елена Геннадьевна Сорокина***
*к.б.н., ведущий научный сотрудник*
*ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России*
*Москва, Россия*
*Эл. почта:*sorokelena@mail.ru

***Валентин Палладиевич Реутов***
***д**окт. биол. наук, ведущий научный сотрудник*
*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: valentinreutov@mail.ru*

***Жанна Борисовна Семенова***
*докт. мед.наук, профессор, рук. отд. нейротравмы, НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: j.seman.@mail.ru*

***Ольга Витальевна Карасева***
*д-р мед. наук, руководитель отдела сочетанной травмы, анестезиологии-реанимации, НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: karaseva.o@list.ru*

**Information about author**

***Elena Gennadievna Sorokina***
*Ph.D., Leading Researcher*
*"National Medical Research Center for Children's Health" of the Ministry of Health of Russia*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: sorokelena@mail.ru*

***Valentin Palladievich Reutov***
*Doctor of Biol. Science, Leading Researcher*
*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences,*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: valentinreutov@mail.ru*

***Zhanna Borisovna Semenova***
*Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Neurotrauma, Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology of the Department of Health of the City of Moscow*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: j.seman.@mail.ru*

***Olga Vitalievna Karaseva***
*Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Combined Trauma, Anesthesiology-Intensive Care, Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology of the Department of Health of the City of Moscow*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: karaseva.o@list.ru*

***Всеволод Григорьевич Пинелис***
*д-р биол.наук, профессор, главн. науч. сотр., ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России*
*Эл.почтаl: pinelis@mail.ru*
***Иван Евгеньевич Смирнов***
*докт. мед.наук, профессор,*
*доктор мед. наук, профессор, нач. методического отдела ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России*
*Эл. почта: smirnov@nczd.ru*

***Vsevolod Grigorievich Pinelis***
*Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Scientific Officer, "National Medical Research Center for Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation*
*E-mail: pinelis@mail.ru*
***Ivan Evgenievich Smirnov***
*Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief of Methodology Department, "National Medical Research Center for Children's Health" of the Ministry of Health of the Russian Federation*
*Moscow, Russian federation*
*E-mail: smirnov@nczd.ru*

УДК 577.152.3
ГРНТИ
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.268-276

**В.П. Дерягина, Н.И. Рыжова,**
**Л.А. Савлучинская, Л.В. Кривошеева, В.Н. Тазаев**
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ НЕЙРОНАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ (NNOS) НА РАЗВИТИЕ ОПУХОЛЕЙ

*В обзоре обсуждаются литературные данные о роли нейрональной NO- синтазы (nNOS) в онкогенезе. Анализируется противоопухолевый потенциал ингибиторов nNOS и молекулярные механизмы их действия.*

***Ключевые слова:*** *нейрональная NO-синтаза (nNOS), онкогенез, синтетические ингибиторы nNOS.*

**V. P. Deryagina, N.I. Ryzhova, L.A. Savluchinskaya, L.V. Krivosheeva, V.N. Tazaev.**
FSBI “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation

## THE EFFECT OF NEURONAL NO SYNTHASE (NNOS) INHIBITORS ON TUMOR DEVELOPMENT

*The review discusses the literature data on the role of neuronal NO synthase (nNOS) in oncogenesis. The antitumor potential of nNOS inhibitors and the molecular mechanisms of their action are analyzed.*

***Key words:*** *neuronal nitric oxide synthase (nNOS), oncogenesis, synthetic nNOS inhibitors.*

**Введение.**

Как видно из результатов экспериментальных и клинических исследований, все изоформы NOS: нейрональная nNOS (NOS1), индуцибельная − iNOS (NOS2) и эндотелиальная − eNOS (NOS3) вовлечены в развитие опухолей, но окажут ли они проопухолевое или противоопухолевое действие будет зависеть от многих факторов: типа опухолевых и стромальных клеток, синтезирующих оксид азота (NO), концентрации NO, времени экспозиции, опухолевого микроокружения и другое. NO при низких и средних концентрациях стимулирует различные онкогенные сигнальные пути, такие как AKT, ERK и HIF, а при высоких – может вызывать нитрозативный стресс и стимулировать

антионкогенные механизмы, такие как активацию p53 и апоптоз. Роль iNOS, eNOS в онкогенезе изучена более широко и подробно в сравнении с nNOS. Нейрональная NO-синтаза, подобно eNOS, конститутивно экспрессируется в клетках, продуцируя малое количество NO в ответ на стимуляцию внутриклеточного кальция. Экспрессию nNOS регистрируют в нейронах, астроцитах, адвентиции кровеносных сосудов головного мозга, островковых клетках поджелудочной железы, нейтрофилах и других типах клеток. nNOS функционирует как ретроградный нейромедиатор центральной и периферической нервной систем, участвует формировании памяти, способности к обучению, регулирует сердечную деятельность, перистальтику кишечника и выполняет другие функции. К настоящему времени опубликовано много работ, анализирующих структурную организацию фермента, регуляцию экспрессии и активности nNOS, и ограниченное количество исследований, раскрывающих роль фермента в прогрессии злокачественных новообразований. Авторы таких работ рассматривают фермент (при избыточной активности его в опухолях), как многообещающую мишень, модулированием активности которой можно достичь торможения роста опухоли.

**Цель работы:** анализ литературных данных, касающихся роли nNOS в опухолевом процессе, а также противоопухолевой эффективности ингибиторов nNOS и механизмов их реализации в условиях эксперимента.

**Материалы и методы.**

При подготовке обзора были использованы публикации информационных баз биомедицинской литературы: Sciverse Scopus (538), PubMed (1327), Web of Science (905), РИНЦ (125).

**Полученные результаты.**

Как видно их данных литературы, существенное внимание исследователей было уделено особенностям экспрессии nNOS в меланомах и глиомах и выявлению связей фермента с активностью белков, участвующих в пролиферации, противоопухолевом иммунитете. *Меланома.* Известно, что меланоциты происходят из нервного гребня и обладают многими характеристиками экспрессии генов, сходными с нервными клетками. Меланома остается одной из агрессивных форм рака кожи из-за высокого уровня геномных мутаций и проявления резистентности к терапевтическим агентам [1, с.2]. Выявлена положительная корреляция экспрессии nNOS в опухолях в зависимости от стадии развития меланомы у человека. Известно, что ультрафиолетовое излучение (УФИ) является основным фактором риска возникновения меланомы. УФИ, особенно в дозах, вызывающих солнечный ожог кожи, значительно увеличивало содержание NO в коже человека, стимулировало устойчивую выработку IFN-γ макрофагами, рекрутированными в область воспаления, что может приводить к иммунной дисфункции циркулирующих Т-лимфоцитов и способствовать меланомогенезу и прогрессированию меланомы [2,3,4, с.2]. Известно, что плейотропный цитокин IFNγ проявляет противоопухолевые эффекты и имеет решающее значение для врождённого и приобретённого иммунитета против вирусных, некоторых бактериальных инфекций, а также является важным активатором макрофагов и индуктором экспрессии молекул iNOS. Хотя в исследовании на мышиной модели меланомы B16, IFN-γ показал противоопухолевый эффект, в дальнейшем была выявлена стимулирующая роль IFN-γ при росте меланомы у трансгенных мышей UVB-HGF/sf14. В более раннем исследовании, лечение IFN-γ усиливало прогрессирование заболевания на ранней стадии меланомы, приводя к рецидиву или смерти более чем у 50% пациентов [5,6, с.2]. В работе [7, с.2], авторы сосредоточили свое внимание на демонстрации основных механизмов развития меланомы, стимулированной IFN-γ и разработке новых ингибиторов nNOS для профилактики и терапии меланомы. Показано, что IFN-γ стимулирует прогрессию меланомы через nNOS-NO сигналинг, значительно увеличивая метастатический потенциал клеток меланомы человека A375 и увеличивая уровни экспрессии ядерного фактора транскрипции STAT3, который способствует росту и выживанию опухолевых клеток [8, с.2]. Культивирование A375 клеток меланомы с ингибитором nNOS MAC-

3-190, эффективно снижало образование NO и экспрессию STAT3, индуцируемые IFN-γ. IFN-γ значительно повышал экспрессию генов, связанных с плохим прогнозом: PD-L1, cMyc и HIF-1α в клетках меланомы, в то время как другой изотип интерферона − IFN-α не оказывал влияния на эти показатели. Повышенная экспрессия белка PD-L1 в клетках меланомы была ослаблена высокоселективными ингибиторами nNOS – MAC-3-190 и HH044. В исследованиях in vitro и in vivo MAC-3-190 и HH044 демонстрировали существенную противоопухолевую активность и вызывали снижение экспрессии PD-L1 в опухолевых ксенографтах меланомы без проявления системной токсичности у мышей. Тестирование вновь синтезированного высокоселективного ингибитора nNOS – cpd8 и подавление активности фермента с помощью siRNA выявило торможение роста и инвазию опухолевых клеток меланомы (A375 и Lu1205) как in vitro, так и in vivo. При этом, синтез NO (индуцируемый L-аргинином), уровни экспрессии генов, которые вносят свой вклад в пролиферацию, инвазию и метастазирование меланомы: JunD, MMP-1, APE/Ref-1, and Bcl-2 значимо снижались [9,10, с.3]. Примечательно, что опухолевый процесс подавлялся только nNOS ингибиторами, но не природными или синтетическими ингибиторами iNOS.

Неконтролируемая пролиферация меланоцитов, может быть вызвана сочетанием воздействие УФ излучения и дисбаланса выработки базового фактора роста фибробластов (bFGF). На модели реконструированной кожи человека, пересаженной мышам с иммунодефицитом, под влиянием высоких и устойчивых уровней bFGF в комбинации с УФ излучением, обнаружены пигментированные поражения с гиперпластическими меланоцитами, включая клетки с атипией высокой степени [11, с.3]. Помимо этого, bFGF индуцировал nNOS в иммортализованных меланоцитах человека и стимулировал рост меланомы [9, с.3].

На примере опухолевых клетках человека: меланомы, рака яичников и колоректального рака было изучено влияние сверхэкспрессии nNOS в клетках меланомы на её чувствительность к IFNα, которая регулировалась через эпигенетический механизм [12, с.3]. Интерферон I типа (IFN-I или IFN-α) играет ключевую роль в подавлении опухолевого роста и формировании иммуногенности опухоли, а его уровни экспрессии в опухолях положительно коррелируют с благоприятным исходом заболевания [13-15, с.3]. Показано, что сверхэкспрессия NOS1 в клетках меланомы снижала чувствительность к IFNα и индуцировала S-нитрозилирование HDAC2-C262/C274. Эта модификация снижала связывание HDAC2 со STAT1, тем самым уменьшая привлечение HDAC2 к промотору ISGs (гены, стимулируемые интерфероном) и деацетилирование H4K16. Примечательно, что экспрессия мутантной формы HDAC2, которая не проявила способности к нитрозилированию, восстанавливала экспрессию ISGs, усиливала инфильтрацию опухоли лимфоцитами и уменьшала индуцированное NOS1 метастазирование в лёгкие у мышей. Помимо этого, продемонстрировано снижение IFNα стимулированной индукции генов ISGs в опухолевых клетках под влиянием экзогенного донора NO или при гиперэкспрессии NOS1. Селективный и малоселективные ингибиторы nNOS: N-PLA и L-NAME, но не 1400 W индуцировали пониженное S-нитрозилирование HDAC2 в клетках меланомы человека A375, что позволяет предположить, что NOS1, но не NOS2, может индуцировать S-нитрозилирование HDAC2. Таким образом, ингибирование S-нитрозилирования HDAC2 может восстановить передачу сигналов IFNα и следовательно снизить метастазирование.

*Полиморфизмы nNOS и риск развития меланомы кожи (CM).* Принимая во внимание данные об отсутствии экспрессии nNOS в нормальных меланоцитах in situ полагали, что повышение экспрессии nNOS de novo может быть маркером ранней стадии развития меланомы. Впервые в клиническом исследовании "случай-контроль" была прослежена связь между функциональными однонуклеотидными полиморфизмами (SNP) в генах nNOS и iNOS и риском развития CM в моделях множественной логистической регрессии [16, с.3]. Генотипировали отдельные полиморфизмы генов: nNOS -84 гуанин-

аденин (G→A), nNOS 276 цитозин-тимин (C→T) и iNOS Ex16+14C→T, iNOS 974G→T SNP. Статистически значимый повышенный риск развития СМ был связан с генотипами nNOS − 84G→A (OR, 1,49; 95% CI, 1,05–2,13) и −84AG+AA (OR, 1,48; 95% CI, 1,06–2,06) по сравнению с генотипом nNOS −84GG. Комбинированные генотипы 2 SNP nNOS оказывали большее влияние на риск развития СМ, чем любой отдельный SNP. Это позволяет предположить, что объединение нескольких вариантов одного и того же гена является более эффективным способом оценки риска. При этом, риск этой локализации не был связан с комбинированными генотипами iNOS. Исследование показало, что генетические варианты nNOS, но не iNOS, могут быть биомаркерами восприимчивости к СМ, а его риск, связанный с солнечными ожогами и родинками, может модулироваться генотипами вариантов nNOS.

*Астроцитомы, глиобластомы (*GBM). Результаты клинических исследований показали, что экспрессия nNOS и других изоформ NOS [17, 18, с.3] существенно увеличена в опухолях головного мозга и их перитуморальных областях. Экспрессия nNOS в глиальных опухолях человека положительно коррелировала с показателем злокачественности [19, с.4].

Повышение синтеза NO может способствовать событиям, которые присущи прогрессии опухолей: окислительному стрессу, усилению неоангиогенеза и увеличению проницаемости сосудов [20,21, с.4]. Астроцитарные опухоли, включая астроцитомы и GBM, являются наиболее распространенным типом первичных опухолей головного мозга, представляющей значительные трудности при лечении и высокую частоту рецидивов [22, с.4]. В исследовании in vitro на трёх линиях опухолевых клеток: клетки астроцитомы (U251MG и U138MG) и клетки глиобластомы (U87MG) изучали действие темозоломида (TMZ) в комбинации с ингибиторами NOS – L-NAME и 7-NI на выживаемость клеток и образование АФК [23, с.4]. Селективный ингибитор nNOS – 7-NI улучшал результаты цитотоксического действия TMZ, снижая жизнеспособность опухолевых клеток на 12,8% на фоне подавления окислительного стресса. Нокдаун nNOS малой интерферирующей siRNA увеличил на 20% цитотоксичность TMZ по отношению к клеткам глиобластомы U87MG. Авторы полагают, что глушение ещё одной мишени − nNOS с помощью синтезированной siRNA может улучшить противоопухолевой действие TMZ по отношению к глиобластомам и заслуживает дальнейших исследований.

Влияние ингибиторов на активность и экспрессию nNOS и iNOS, а также на пролиферацию было изучено на клетках глиомы U87-MG. В исследовании in vitro оценивали фармакологическое действие ингибитора nNOS − 7-NI и ингибитора iNOS − L-NIL. Результаты показали, что воздействие L-NIL (500 и 1000 μM) и 7-NI (100 μM) привело к снижению уровня NO, активности NOS, уровня 3-нитротирозина и клоногенной пролиферации, но не меняли экспрессию nNOS и iNOS в клетках глиомы. Авторы заключают, что фармакологическое ингибирование NOS может быть использовано в качестве перспективного направления терапии GBM [24, с.4].

*Опухоли репродуктивных органов.* Показатели заболеваемости и смертности от рака шейки матки у женщин занимают 3-е и 4-е места в структуре онкологических заболеваний в мире [25, 27, с.4]. Изучение молекулярных механизмов возникновения и прогрессирования рака шейки матки и поиск новых мишеней по-прежнему остаются актуальными направлениями исследований. Определение экспрессии nNOS и ABCG2 в образцах рака шейки матки выявили их существенное повышение. Известно, что ABCG2 относится к суперсемейству АТФ-связывающих кассетных транспортеров, участвует в транспорте ксенобиотиков, способствует миграции и инвазии опухолевых клеток, а также проявлению резистентности в опухолях к химиотерапевтическим препаратам. Показано, что экспрессия ABCG2 существенно увеличивается при раке желудка, поджелудочной железы и других опухолях [26, с.4], но данных о статусе белка и его регуляции при раке шейки матки нет. В исследованиях in vitro на клеточных линиях HeLa и C-33A при подавлении экспрессии NOS1 помощью sh-NOS1 было обнаружено снижение

экспрессии не только nNOS, но и ABCG2 [27, с.4]. Однако, уровень экспрессии белка NOS1 остался неизменным после нокдауна гена ABCG2, что позволяет предположить, что NOS1 может быть вышестоящей регуляторной молекулой. Подавление экспрессии nNOS сопровождалось резким повышением уровня апоптоза и снижением пролиферации опухолевых клеток ($p<0,05$). На основе вышеизложенного, можно предположить, что снижение экспрессии NOS1 и ABCG2 в опухолевой ткани с гиперэкспрессией этих белков, можно рассматривать как эффективную стратегию, которая способна улучшить результаты противоопухолевой терапии у больных раком шейки матки.

Продолжением исследований в этой области, стала работа, оценивающая вклад NOS1 в развитие резистентности клеток эпителиальной карциномы яичников (EOC) к цис- диамминдихлороплатине (DDP) и возможную связь между экспрессией nNOS и ABCG2, ассоциированного с множественной лекарственной устойчивостью [28,29, с.4]. Анализ базы данных *GSE26712 и GSE51373* обнаружил, что уровни мРНК NOS1 и ABCG2 положительно коррелируют при EOC, а уровни экспрессии генов ABCG2 в опухолях химиорезистентного рака яичников были выше, чем в чувствительных к химиотерапии опухолях. Показано, что трансфекция NOS1 может увеличить экспрессию ABCG2 как в условиях in vitro, так in vivo у мышей с ксенотрансплантатами. Примечательно, что повышенная экспрессия обоих генов при лечении DDP может быть снижена неселективным ингибитором – L-NAME или селективным ингибитором NOS1 – N-PLA, что позволяет предположить, что NOS1 может регулировать экспрессию ABCG2. Повышенная экспрессия NOS1 способствует выживанию клеток рака яичников за счёт повышения потенциала устойчивости к DDP и этот эффект был обращен вспять добавлением верапамила − ингибитора ABCG2. Подавление экспрессии/активности NOS1 путем трансфекции si-NOS1 или ингибитором – N-PLA снижало устойчивость опухолевых клеток к DDP, скорее всего вследствие усиления индуцированной DDP гибели клеток. В совокупности, эти данные указывают на то, что NOS1 усиливает экспрессию ABCG2, снижает скорость гибели опухолевых клеток, тем самым повышая резистентность к DDP в клетках EOC.

*Назофарингеальная карцинома (NPC).* Как ранее было отмечено, NO участвует в сложном процессе гибели клеток путем аутофагии, однако механизмы, с помощью которых эндогенный NO регулирует аутофагию в раковых клетках, остается неясным [30, с.5]. В исследовании in vitro, посвященном изучению влияния NO, продуцируемого nNOS, на активацию сигнальных путей, способствующих выживанию клеток карциномы сообщается, что повышенная экспрессия NOS1 снижает гибель клеток посредством аутофагии. Это приводит к активации сигнального пути AKT/mTOR, подавлению аутофагии и, как следствие, увеличению выживаемости клеток. Установлено, что подавление аутофагии в клетках NPC зависело от S-нитрозилирования фосфатазы PTEN, которая является негативным регулятором AKT/mTOR сигнального пути. S-нитрозилирование PTEN может вести к деградации PTEN посредством NEDD4-1-опосредованного убиквитинирования. Такая деградация PTEN сопровождалась гипер-активацией Akt-каскада в нейронах и в опухолях человека [32,33, с.5]. Ингибирование NOS1 с помощью siRNA или фармакологическими средствами увеличивало гибель клеток и этот эффект был отменен ингибитором аутофагии хлорохином. Показано, что снижение аутофагии в NPC клетках, экспрессирующих NOS1, способствует развитию у них резистентности к цисплатину. В исследованиях на мышах применение ингибитора NOS1 – L-NAME существенно тормозило опухолевый рост, усиливало аутофагию в ксенографтах опухолей. Таким образом, экспрессия NOS1 в клетках снижает аутофагию посредством S-нитрозилирования фосфатазы PTEN – негативного регулятора пути AKT/mTOR. PTEN и сигнальный путь AKT/mTOR рассматриваются авторами как многообещающие мишени, которые могут улучшить результаты химиотерапии опухолей.

*Клетки миелоидного лейкоза человека K562.* В более ранних исследованиях было установлено, что NO, в зависимости от концентрации, модулирует дифференцировку,

выживаемость и гибель нейтрофилов и лейкозных клеток путём апоптоза, пироптоза, ферроптоза, аутофагии [34-38, с.5]. В исследовании предпринята попытка сравнительной оценки роли iNOS и nNOS в выживании сверхэкспрессирующих эти ферменты миелоцитарных клетках K562. Клетки с трансфицированными iNOS и nNOS в равной мере демонстрировали нарушение клеточного цикла, митохондриальную дисфункцию, а также ослабленную экспрессию антиоксидантных ферментов. Индукция гибели клеток, сверхэкспрессирующих iNOS или nNOS, сопровождалась активацией pJNK/p38MAPK/Erk1/2 и снижением передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR. Наряду с этим, сравнительный анализ паттерна экспрессии генов, задействованных в гибели клеток: CASP1, CASP4, CASP3 и высвобождающихся интерлейкинов указывают на разный путь гибели клеток: предпочтительно для K562iNOS – пироптотический, связанный с воспалением или для K562nNOS – апоптотический.

*nNOS и активация фибробластов, ассоциированных с раком (CAF)*. Известно, что CAF стимулируют рост опухоли и её метастазирование. Хемокин CXCL14, экспрессируемый в фибробластах и других типах клеток, является контекстно-зависимым мощным индуктором как прооопухолевых и так противоопуховых свойств [39, с.6]. Исследование было направлено на изучение роли NOS1 в поддержании проопухолевых функций CAF, экспрессирующих CXCL14 (CXCL14-CAF) [40, с.6]. Авторы обнаружили, что что NOS1 активируется в CXCL14-CAF в фибробластах. Индукция NOS1 была связана с окислительным стрессом и с активацией передачи сигналов NRF2 и HIF1a в CXCL14-CAF. Показано, что повышенная экспрессия NOS1 в фибробластах не связана с увеличением детектируемой продукции NO. Полагают, что NO преимущественно используется во внутриклеточных химических реакциях, в частности, в нитрозировании тирозина. Генетическое или фармакологическое ингибирование NOS1 снижало рост фибробластов, экспрессирующих CXCL14, наряду со снижением развития опухолей, образованных при введении животным фибробластов с клетками рака предстательной железы (LNCaP) или молочной железы (MCF7). После подавления NOS1 в CXCL14 в фибробластах была значимо снижена инфильтрация опухоль ассоциированных макрофагов и лимфангиогенез в обеих моделях. Таким образом, показана роль NOS1 как нового интегрального компонента передачи сигналов CXCL14-CAF, который поддерживает проонкогенные функции фибробластов, экспрессирующих CXCL14.

**Выводы.**

Изучение экспрессии NOS в злокачественных клетках и опухолях различного гистогенеза выявило повышенную иммунореактивность к изоферменту nNOS, наиболее выраженную при более высоких уровнях опухолевой пролиферации. Показано, что NO, продуцируемый nNOS усиливает, инвазию, иммуносупрессию, выживание клеток и развитие резистентности к противоопухолевой терапии. Фармакологическое или генетическое ингибирование гиперэкспрессии nNOS приводило к торможению пролиферации, опухолевого роста и метастазирования за счёт снижения уровней экспрессии генов, способствующих онкогенезу: JunD, MMP-1, APE/Ref-1, Bcl-2, PD-L1, ABCG2, а также за счёт снижения нитрозилирования белков, усиления чувствительности к цитостатикам, модулирования состава и пролиферации клеток опухолевого микроокружения и других механизмов. В целом, снижение продукции NO до физиологических уровней или её повышение до суперфизиологических значений может способствовать гибели опухолевых клеток и увеличивать их чувствительность к цитостатикам.

**Заключение.**

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие результаты: проведена систематизация и обобщение данных, касающиеся роли nNOS в развитии опухолей, а также дана оценка противоопухолевой эффективности фармакологического ингибирования nNOS in vitro и in vivo. Ингибирование гиперактивности nNOS при некоторых злокачественных нозологиях можно рассматривать как многообещающий подход, который может улучшить результаты терапии.

*Сокращения*. N-PLA – N-пропил-L-аргинин; L-NAME − N(омега)-нитро-L-аргинина метиловый эфир гидрохлорид, DETA/NO – донор NO; 7-NI – 7-нитроиндазол; L-NIL − N6-(1-иминоэтил)-L-лизин, дигидрохлорид; 1400 W – N-(3-аминометил)бензил)ацетамидин; DDP – цисплатин; Jun D – компонент комплекса факторов транскрипции AP1; MMP1 –матриксная металлопротеиназа 1; APE/Ref-1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1/редокс-эффекторный фактор 1 – многофункциональный фермент, необходимый для поддержания клеточного гомеостаза; Bcl-2 −регулятор апоптоза; HDAC2 – гистондеацетилаза 2; pAkt − фосфо протеинкиназа B, PI3K − фосфоинозитид 3-киназа; p38-MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа p38; CXCL14 – хемотаксический цитокин; ARE – адаптивный антиоксидантный ответ; HIF1a − фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа; ERK – внеклеточная сигнально-регулируемая киназа; PD-L1 – лиганд программируемой смерти 1; CASP1, CASP3, CASP4 – каспазы, протеолитические ферменты, участвующие в апоптозе, пироптозе; c-Myc – протоонкоген; pJNK – фосфорилированная форма c-Jun N-концевых киназ (стресс-активируемые протеинкиназы); NRF2 – редокс чувствительный транскрипционный фактор.

## Литература


1. Lawrence M.S. et al. Mutational heterogeneity in cancer and search for new cancer-associated genes. Nature. 2013; 499:214-218.
2. Russo P.A. & Halliday G.M. Inhibition of nitric oxide and reactive oxygen species production improves the ability of a sunscreen to protect from sunburn, immunosuppression and photocarcinogenesis. Br J Dermatol. 2006; 155: 408-415.
3. Halliday G.M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. Mutat Res. 2005; 571: 107-120.
4. Liu Q., Tomei S., Ascierto M.L. et al. Melanoma NOS1 expression promotes dysfunctional IFN signaling. J Clin Invest. 2014; 124: 2147-2159.
5. Kakuta S., Tagawa Y., Shibata S. et al. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon-gamma through direct inhibition of cell proliferation and activation of antitumour host mechanisms. Immunology. 2002; 105: 92-100.
6. Zaidi M.R., Davis S., Noonun F.P., et al. Interferon-gamma links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. Nature. 2011; 469: 548-553.
7. Tong Sh., Cinelli M.A., El-Sayed N.S., et al. Inhibition of interferon-gamma-stimulated melanoma progression by targeting neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Sci Rep. 2022; 12: 1701. doi: 10.1038/s41598-022-05394-6.
8. Kortylewski M., Jove R. & Yu H. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. Cancer Metastasis Rev. 2005; 24: 315-327. https: doi.org/10.1007/s10555-005-1580-1.
9. Yang Zh., Bobbye Misner B., Haitao Ji. H., et al. Targeting Nitric Oxide Signaling with nNOS. Inhibitors as a novel strategy for the therapy and prevention of human melanoma. Antioxidants & redox signaling. 2013; V.19(5). DOI: 10.1089/ars.2012.4563.
10. Yang S., Irani K., Heffron S.E., et al. Alterations in the expression of the apurinic/apyrimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE/Ref-1) in human melanoma and identification of the therapeutic potential of resveratrol as an APE/Ref-1 inhibitor. Mol Cancer Ther. 2005; 4: 1923–1935.
11. Berking C., Takemoto R., Satyamoorthy K., et al. Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin. Am J Pathol. 2001; 158: 943–953.
12. Xu P., Ye Sh., Li K., et al. NOS1 inhibits the interferon response of cancer cells by S-nitrosylation of HDAC2. J Exp Clin Cancer Res. 2019; 38(1):483. doi: 10.1186/s13046-019-1448-9.
13. Laurence Z., Lorenzo G., Oliver K., Smyth M.J., Guido K. Type I interferons in anticancer immunity. Nat Rev Immunol. 2015; 15(7): 405–414. doi: 10.1038/nri3845.

14. Brockwell N.K., Rautela J., Owen K.L., et al. Tumor inherent interferon regulators as biomarkers of long-term chemotherapeutic response in TNBC. NPJ Precision Oncol. 2019; 3:21. doi: 10.1038/s41698-019-0093-2.
15. Katlinski K.V., Gui J., Katlinskaya Y.V., et al. Inactivation of interferon receptor promotes the establishment of immune privileged tumor microenvironment. Cancer Cell. 2017; 31(2):194–207. doi: 10.1016/j.ccell.2017.01.004.
16. Li Ch., Hu Zh., Liu Zh., et al. Polymorphisms of the neuronal and inducible nitric oxide synthase genes and the risk of cutaneous melanoma. Cancer. 2007. 109(8): 1570-1578. https://doi.org/10.1002/cncr.22582.
17. Bakshi A., Nag T.C., Wadhwa S., Mahapatra A.K., Sarkar C. The expression of nitric oxide synthases in human brain tumours and peritumoral areas. J Neurol Sci. 1998; 155: 196–203. doi: 10.1016/S0022-510X(97)00315-8.
18. Broholm H., Rubin I., Kruse A., et al. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in human brain tumors. Clin Neuropathol. 2003; 22(6):273-81. PMID: **14672505.**
19. Tanriover N., Ulu M.O., Isler C., et al. Neuronal nitric oxide synthase expression in glial tumors: correlation with malignancy and tumor proliferation. J Progress in Neurosurgery, Neurology and Neurosciences. 2008; V. 30. 9: 940-944. https://doi.org/10.1179/174313208X319099.
20. Conti A., Guli C., La Torre D. et al. Role of inflammation and oxidative stress mediators in gliomas. Cancers (Basel) 2010; 2: 693–712. doi:10.3390/cancers2020693.
21. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. Cell. 2000; 100:57–70.
22. Lassman A.B. Molecular biology of gliomas. Curr Neurol Neurosci Rep. 2004; 4: 228–233. doi: 10.1007/s11910-004-0043-3.
23. Resende F.F.B., Titze-de-Almeida S.S., and Titze-de-Almeida R. Function of neuronal nitric oxide synthase enzyme in temozolomide-induced damage of astrocytic tumor cells. Oncol Lett. 2018; 15(4): 4891–4899. doi: 10.3892/ol.2018.7917.
24. Kruglyakov D., Ojha Sh.K., Kartawy M., et al. Nitric oxide synthase inhibition prevents cell proliferation in glioblastoma. J Molec Neuroscience. 2023; 73(21): 875-883.
25. Vaccarella S., Franceschi S., Engholm G., et al. 50 years of screening in the Nordic countries: Quantifying the effects on cervical cancer incidence. Br J Cancer. 2014; 111: 965–969.
26. Jiang Y., He Y., Li H., Li H.N., et al. Expressions of putative cancer stem cell markers ABCB1, ABCG2, and CD133 are correlated with the degree of differentiation of gastric cancer. Gastric Cancer. 2012; 15: 440–450.
27. Ding M., Zhang H., Liu L., Liang R. Effect of NOS1 regulating ABCG2 expression on proliferation and apoptosis of cervical cancer cells. Oncology Letters. 2019; 17: 1531-1536. doi.org/10.3892/ol.2018.9786.
28. Li X., Zou Zh., Tang J., et al. NOS1 upregulates ABCG2 expression contributing to DDP chemoresistance in ovarian cancer cells Oncol Lett. 2019; 17(2): 1595–1602. doi:10.3892/ol.2018.9787.
29. Nakanishi T., Ross D.D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. Chin J Cancer. 2012; 31:73–99. doi: 10.5732/cjc.011.10320.
30. Fulda S., Kögel D. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. Oncogene. 2015; 34: 5105–5113.
31. Zhu L., Li L., Zhang Q., et al. NOS1 S-nitrosylates PTEN and inhibits autophagy in nasopharyngeal carcinoma cells. Cell Death Discovery. 2017; 3. 17011. doi:10.1038/cddiscovery.
32. Kwak Y.D., Ma T., Diao S., et al. NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration. Mol Neurodegener. 2010; 5: 49.
33. Lim H.J., Crowe P., Yang J.L. Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2015; 141:671–689.

34. Sadaf S., Singh A.K., Awasthi D. et al. Augmentation of iNOS expression in myeloid progenitor cells expedites neutrophil differentiation. J Leukoc Biol. 2019; 106(2): 397-412. Doi: 10.1002/JLB.1A0918-349 RR.
35. Sadaf S., Awasthi D., Singh A.K. et al. Pyroptotic and apoptotic cell death in iNOS and nNOS overexpressing K562 cells: A mechanistic insight Biochem Pharmacol. 2020. 176:113779. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113779.
36. He Q., Qu M., Xu Ch., et al. The emerging roles of nitric oxide in ferroptosis and pyroptosis of tumor cells. Life Sci. 2022; 1:290: 120257. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120257.
37. KimY.M., Bombeck T.R., Billiar T.R. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. Circ. Res. 1999; 84 (3): 253-256.
38. Datta S., Chakraborty S., Panja C., Ghosh S. Reactive nitrogen species control apoptosis and autophagy in K562 cells: implication of TAp73alpha induction in controlling autophagy. Free Radic Res. 2018; 52 (4): 491–506.
39. Hara T., Tanegashima K. Pleiotropic functions of the CXC-type chemokine CXCL14 in mammals. J Biochem. 2012; 151: 469–76.
40. Augsten M., Sjöberg E., Frings O., et al. Cancer-associated fibroblasts expressing CXCL14 rely upon NOS1-derived nitric oxide signaling for their tumor-supporting properties. Cancer Res. 2014; 74 (11): 2999–3010. https://doi.org/10.1158/0008-5472. CAN-13-2740.

**Сведения об авторах**

***Валентина Петровна Дерягина*** *к.б.н., н.с.*
*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России*
*Москва, Россия*
*эл. почта: derygina@inbox.ru*

***Наталья Ильинична Рыжова,*** *к.б.н., н.с.*
*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: 1124415@mail.ru*

***Людмила Александровна Савлучинская****, к.б.н., н.с.*
*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: blood-research@yandex.ru*

***Лейла Владимировна Кривошеева****, к. б. н., н. с.*
*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: lvkrivosheeva@mail.ru*

***Владимир Николаевич Тазаев****, врач-трансфузиолог*
*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России*
*Москва, Россия*
*Эл. почта: v.tazaev@ronc.ru*

**Information about author**

***Valentina Petrovna Deryagina***
*Ph. Dr., scientific. employee,*
*FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: derygina@inbox.ru*

***Natalia Ilynichna Ryzhova****, Ph. Dr., scientific. employee,*
*FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation*
*Moscow, Russian Federation*
*e-mail: 1124415@mail.ru*

***Ludmila Alexandrovna Savluchinskaya****, Ph. Dr., scientific. employee,*
*FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation*
*Moscow, Russian Federation*
*e-mail: blood-research@yandex.ru*

***Leyla Vladimirovna Krivosheeva****,*
*Ph. Dr., scientific. employee,*
*FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation*
*Moscow, Russian Federation*
*e-mail: lvkrivosheeva@mail.ru*

***Tazaev Vladimir Nikolaevich****, transfusiologist,*
*FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation*
*Moscow, Russian Federation*
*e-mail: v.tazaev@ronc.ru*

УДК 578:851.48
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.277-280

**С.В. Васильева**
Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля РАН

# ФУНКЦИИ МАГНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ NO- НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА

*В статье обсуждается состоянии мало изученной научной проблемы вклада ионов магния ($MgSO_4$) в регуляции нитрозативного стресса, вызываемого в клетке E.coli обработкой рядом доноров оксида азота. Сульфат магния кратно увеличивал уровни NO – донирования комплексными растворами с NO- донорами in vitro относительно моно растворов.*

***Ключевые слова**: магний, нитрозативный стресс, доноры оксида азота.*

**S.V.Vasilieva**
N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

# MAGNESIUM FUNCTIONS IN NO-NITROSATIVE STRESS REGULATION.

*Unique chemical and physical properties dictate the universal biological activity of nitric oxide, its endogenously produced free radicals and biological signaling molecules. In redox reactions with a neutral free radicals nitric oxide (NO) generates of nitrosonium cation $NO^+$ and nitroxyl anion $NO^-$. In the cells $NO^+$ and neutral NO react with cellular iron (Fe) and thiols to form dinitrosyl iron complexes (DNICs) with thiol ligands and NO- mimetic characteristics with regard to phenotypic response. DNICs are the universal signaling molecule in the biological systems and the largest intracellular pool the amounts of chelatable iron.*

*Unlike RSNO, DNICs and other NO-derived cellular adducts with cellular iron, the fate of magnesium (Mg) in NO- nitrosative stresses is not well studied, while in the cells Mg is a cofactor of a numerous enzymes, a participant of about 300 enzyme reactions. It is the most representative mineral at the human being, on line with Ca, Na and K.*

***Key words**: magnesium, nitrosative stress, NO-donating agents.*

## Введение

**Оксид азота NO –** свободно диффундирующая, высоко активная молекула с множеством функций в биологии живых систем. В токсичных концентрациях - **NO** губителен, а в низких функционирует как имуномодулятор - у высших эукариот [1-3 ] и как важнейшая меж- и внутриклеточная сигнальная молекула в эукариотах и в бактериях [4].

Семейство железо-серных – сенсорных протеинов, включая транскрипционные регуляторы SoxRS и NsrR, оксид азота использует для узнавания свой железо-серный кластер [4Fe-4S]. Эти регуляторы в структурах E.coli и ряде родственных патогенов, прямо идентифицируют NO и инициируют ответ как NO - детоксификацию путем частичного или полного нитрозилирования железо-серных кластеров [5].

В основном, NO биологическая активность связана с редокс- регуляцией и переносом биологических тиолов- S- нитрозотиолов. Этот механизм очень широко представлен в биологии, и является важнейшим для широкого понимания нитрозативного процесса. Именно свободно радикальная природа оксида азота явилась детерминантом его универсальных характеристик, одна из которых - трансформация в нитрозониум катион $NO^+$ в живых системах [6 ].

В биологии металлические кофакторы - железо, сера, цинк и другие , как правило, высоко активны при взаимодействии с оксидом азота. Протеины, содержащие FeS кластеры, чувствительны к NO- индуцированным повреждениям, и основой чувствительности может быть использование этих кластеров в качестве биологических

переключателей ( switches) [7, 8].

Именно способность Zn к формированию взаимодействий и связей ( цинковые пальцы) способствовала - в определенных пределах- эволюционному развитию Zn-стабилизированных структурных доменов. Отсутствие редокс- активности у Zn ионов, характерный тип их связывания и особенности процессов кинетики стали важными " в эволюционном выборе именно Zn" для уникальных ролей и специфических функций.

Магний (Mg) это- кофактор многих ферментов, который наряду с кальцием (Ca), натрием (Na) и калием (K) входит в первую четверку минералов в организме человека, а по содержанию в клетке занимает 2-е место после K. Его суточная потребность - в среднем 400 мг. Mg участвует более, чем в 300 ферментативных реакциях –в передаче нервных импульсов, ритмичной работе сердца, снижении АД и угнетении агрегации тромбоцитов. Витамины B1, B6 и C полноценно усваиваются только в присутствии Mg. При изучении молекулярно-генетических функций Mg установлено, что он необходим для синтеза всех известных нейропептидов. Внутриклеточный магний на 80—90 % находится в комплексе с АТФ- универсальным переносчиком и основным аккумулятором энергии в живых клетках. Важно, что отсутствие редокс- активности у $Mg^{2+}$ ионов (как и у Zn ионов) , все же не стало препятствием для исполнения Mg столь же важных ролей и сотен незаменимых функций.

Ионы $Mg^{2+}$ стимулируют образование L-формы E.coli с редукцией клеточной стенки, свойственное персистентным инфекциям. Проницаемость $Mg^{2+}$ в клетку контролируется двухкомпонентной системой PhoP/PhoQ. Белок PhoQ функционирует как сенсор ионов $Mg^{2+}$ и фосфорилирует PhoP регулятор, который вызывает транскрипцию около 3-х десятков генов E.coli [9 ]. Система PhoP/PhoQ чувствительна также к колебаниям в среде $Ca^{2+}$.

Для большинства видов бактериальных патогенов, включая Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae и др., развитие в клетках оксидативного стресса с чувствительностью к антибиотикам предусматривает наличие в клеточной мембране консервативного суперсемейства мембранных протеинов DedA [10, 11]. Делеции в E.coli yghA и yghB (гены сем. DedA) приводили к мультифакторной чувствительности клеток к антибиотикам, высокой температуре и щелочным pH. Важно отметить, что в таких клетках обнаруживались также дефекты нормального клеточного деления с развитием филаментов ( последнее типично для активации в E.coli ДНК SOS-репарационного ответа). Преодолеть проблему помогало внесение в культуральную среду 0.5-2 mM $Ca^{2+}$ либо $Mg^{2+}$ и восстановление трафика этих ионов при активации Ca- каналов. Результаты изучения мембранных протеинов сем. DedA выявили определяющую роль магния в организации специфической структуры клеточной стенки бактерий и значительную роль $Mg^{2+}$ в их чувствительности к антибиотикам [ 10. 11].

**Цель работы**

Целью работы является анализ данных литературы и результатов собственных пилотных исследований по крайне мало изученной в настоящее время ( относительно железа) проблеме функций металлического кофактора магния в NO - нитрозативном стрессе.

**Материалы и методы**

Все доноры оксида азота синтезированы в ИПХФ РАН Н.А. Саниной, и предоставлены для работы, за что автор статьи выражает ей искреннюю благодарность. Позитивный контроль- экспрессия генов sfiA 2,63 нМ 4НХО, «Sigma», США и гена soxS – 0,5 мМ менадионом («Serva», ФРГ). Хромоген -ONPG, «Sigma», США.

В работе изучены бактериальные культуры, содержащие в геноме слитые опероны**:** E. coli PQ37[sfiA::lacZ], и TN530λφ(ΔsoxS'::lacZ***).*** E.coli PQ37 получен от проф. Хофнунга ( Институт Пастера, Франция, а E. coli TN530- от T. Nunoshiba, Япония.

Экспрессия генов sfiA и soxS изучается опосредованно, по активности фермента LacZ β- галактозидазы в колориметрическом тесте.

Показатели поглощения света окрашенными растворами измерены при λ = 600 нм и λ = 420 нм на спектрофотометре PD-303UV (Apel Co. Ltd, Япония ).

Активность β-галактозидазы рассчитана по формуле: $(1000\times OD_{420}\times V)/(OD_{600}\times t)$, где $OD_{420}$ и $OD_{600}$ – величины поглощения при 420 и 600 нм, соответственно, $V$ – разведение, $t$ – время инкубации с хромогеном, мин

**Полученные результаты**

Впервые изучено влияние $MgSO_4$ на скорость донирования NO - кристаллическими донорами in vitro. Установлена выдающаяся роль сульфата магния в качестве стимулятора NO- донирования соединениями ТНКЖтио, ЦисА и ПенА, а именно 8 - 10-и кратное превышение скорости NO-донирования над контролем независимо от аэрации.

Установлено, что уровни NO-индуцированной экспрессии гена aidB ( Ada- регулон E.coli), контролируемой в клетках белком анаэробиоза Fnr $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$, пропорциональны скорости NO- донирования и абсолютно зависят от наличия $MgSO_4$ в среде культивирования.

Цитологические исследования показали преобладание L- форм бактериальных клеток в вариантах с комплексной обработкой сульфатом магния и донором NO. В варианте с изучением донора цисаконита ( ЦисА, рис.2) в комплексе с $MgSO_4$ ( вар.6) уровень биопленок в анаэробной среде соответствовал результату с моно обработкой клеток 0.01 мМ ПАБК ( вар 3). Это подтверждает наши выводы о функциях ПАБК как ингибиторе ДНК SOS- ответа в E.coli.

Наличие в популяции клеток в среде с $MgSO_4$ большого количества филаментов – нитевидных клеток с нарушенной системой формирования клеточных стенок при делении- есть свидетельство избирательного развития защитной системы ДНК-репарационного SOS-ответа. Этот вывод согласуется с результатами роста уровней защитных биопленок антибиотикорезистентности в культуре клеток Pseudomonas sp. и наличием четкой корреляции этих показателей в вариантах с обработкой клеток E.coli ПАБК и комплексом $MgSO_4$ с донором оксида азота.

***Рис. 1***

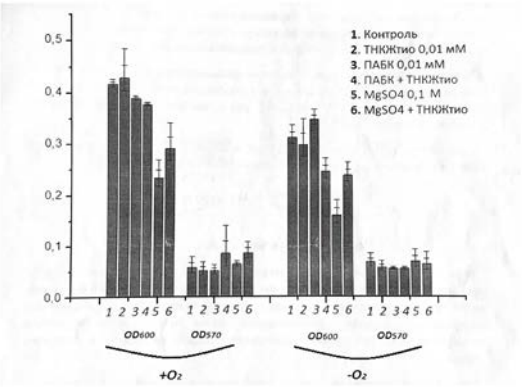
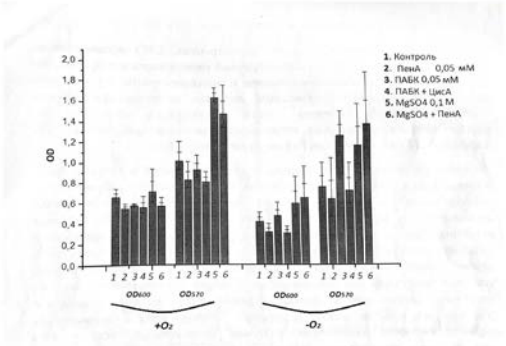



***Рис. 2***



**Заключение**

Впервые установленные в работе молекулярные механизмы функционирования ионов магния в формировании резистентности клеточных систем к главной иммунной молекуле NO расширит рамки понимания основ взаимодействия между системами, будет способствовать развитию новых методов в NO - иммунотерапии и созданию стратегии борьбы с инфекциями. В современных условиях распространившейся антибиотикорезистентности, она в большинстве случаев является одним из ответов организма на окислительный стресс, вызываемый в аэробной среде оксидом азота.

**Литература**


1. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. Biosci Rep.1999; 19:133-154.Meunier B. Hybid molecules with a dual mode of action: dream or reality? Acc Chem Res 2007; 41(1):69-77;
2. Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. J. Physiol Pharmacol 2002; 53:503-514
3. Vanin A.F.Free radical nature of nitric oxide molecules as a determinant of their transformation into nitrosonium cations in living systems. Biophysics Russ 2020; 65(3); 421-438.
4. Vasilieva SV, Streltzova DA, Mikoyan VD. EPR characteristics of mononuclear Dinitrosyl iron complexes with persulfide as a new representative of dinitrosyl iron complexes in biological systems:an overview. Appl. Magn. 2014 ; 45(4): 375-387
5. Hickok J, Sahni S, Shen H, Arvind A, Antoniou C, Fung LWM, Thomas D. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: Biological parameters of assembly and disappearance. Free Radic Biol Med 2011;51(8):1558-1566
6. Dodd E.L., Le Brun N.E. Probing the mechanism of the dedicated NO sensor [4Fe-4S] NsrR : the effect of cluster ligand environment. J. Inorg. Biochem. 252 (2024) 112457, p.1- https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112457
7. Васильева С.В., Стрельцова Д.А., Мошковская Е.Ю. и др. Белок Fnr [4Fe-4S]2+ регулятор экспрессии гена aidB Escherichia coli при анаэробном культивиолванииДоклады РАН 2010,433(3):410-413.
8. Васильева С.В., Мошковская Е.Ю., Терехов А.С. и др. Генетическая активность NO содержащих соединений определяется комплексообразованием NO с клеточным железом. Генетика 2006, 42 (7):
9. Minagawa J. et al., Identification and molecular characterization of the Mg2 stimulon of Escherichia coli. J. Bacteriol. 2003
10. Sikdar R., Simmons A.R., Doerrier W.T. Multiple envelope stress response pathways are activated in an Escherichia coli strain with mutations in two members of the DedA membrane protein family. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23042993/ / DOI 10.`1128/JB.00762-12.
11. Tiwari V. et al. Klebsiella pneumonia DedA family proteins have redundant roles in divalent cation homeostasis and resistance to phagocytosis. Microbiol Spectr., 2024 Feb 6; 12(2) . https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38214522//



**Сведения об авторах**
***Васильева Светлана Васильевна.***
*доктор биологических наук*
*Зав. лабораторией теоретической генетики, Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля РАН*
*Москва, Россия*
*почта: svasilieva@sky.chph.ras.ru*

**Information about author**
***S.V.Vasilieva***
*Doctor of Biological Sciences Laboratory of Theoretical Genetics*
*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS*
*Moscow, Russia*
*E-mail:svasilieva@sky.chph.ras.ru*

УДК 577.151.04+577.152.313+546. ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.281-284

**С. В. Васильева[a*], Н. А. Санина[b],**
[a*]Институт Биохимической Физики
им. Н.М. Эмануэля РАН,
[b] Федеральный исследовательский центр проблем
химической физики и медицинской химии РАН, Россия

# ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ОТВЕТА ТЕПЛОВОГО ШОКА И ОКСИДА АЗОТА НА РАЗВИТИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ E.COLI К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

*Молекулярные основы формирования комплекса универсальных белков синтеза NO и теплового шока БТШ ( HSP-70) у млекопитающих в защите от окислительного стресса и геморрагического шока не установлены. На моделях E.coli изучен суммарный генетический ответ на окислительный стресс, вызванный последовательным воздействием HSP-70, NO и H2S.Накопление в клетках БТШ на 40-50% усиливало NO - экспрессию генов ДНК SOS-репарационного ответа и на 19-30% регуляторной системы SoxRS. При последовательном развитии теплового шока и обработке суммой (NO+H2S ) превышение уровней экспрессии SoxRS регулона E.coli было 3,7 – кратным и более, чем 5 –кратным – при обработке клеток с учетом БТШ. Антиоксидант пара-аминобензойная кислота (ПАБК) ингибировала развитие окислительного стресса во всех вариантах. Авторы рассматривают полученные результаты как абсолютно приоритетные.*

***Ключевые слова** : белки теплового шока БТШ; доноры NO и H2S ; репарация ДНК.*

**S.V. Vasilieva, N.A. Sanina**
[a*] N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Russia
[b] Federal Research Center of problems of Chemical
Physics and Medicinal Chemistry RAS Russia

# COMPLEX FUNCTIONS OF HEAT SHOCK PROTEINS AND NITRIC OXIDE TO OXIDATIVE STRESS RESPONSE IN ESCHERICHIA COLI

*This paper provides new data of current research of how Escherichia coli protect themselves against the heat shock (HSP) as well as the oxidative stress with NO and H2S as the primary sources of this stress in aerobic conditions. In molecular genetic bacterial models – the SOS DNA repair response and the SoxRS regulon - summary response to HSP and to gasotransmitters NO and H2S were tested. The levels by sfiA gene ( the SOS response) and soxS gene ( the SoxRS pathway) expression increased by several fold ( up to 3.7-5 ) in the complex cell treatment, as compared with the mono cell treatment with these agents. PABA- as an antioxidant - inhibited the levels of the genes expression in all the variants. Our data received are absolutely new.*

***Key words:** heat shock proteins, NO and H2S- donating agents, DNA repair*

## Введение

Установлено, что тепловой шок у млекопитающих это угроза жизни, связанная с системным воспалительным процессом и развитием синдрома дисфункции различных органов. Он приводит к координированному синтезу универсальных защитных белков теплового шока (БТШ), идентичных для всех биосистемам. Крупные белки GroEL, GroES , DnaK индуцируются и в E.coli как при тепловом шоке, так и при действии различных окислителей, голодании и УФ- излучении. БТШ обладают значительным структурным и функциональным сходством и обнаруживаются в клетках всех типов. БТШ HSP-70i индуцируется донорами NO во всех клетках. Взаимодействие индуцибельных ответов теплового шока (ОТШ ) с ДНК- репарационными ответами при избытке в клетке экзогенного NO ранее не изучалось.

Функции БТШ многообразны Белок – шаперон теплового шока Hsp70-

регулирует NO- сигнальную трансдукцию, образуя комплекс с растворимой sGC и участвуя в доставке гема в sGC-β1 субъединицу для формирования структуры с NO [1]. Объем БТШ E.coli DnaK при оптимальной температуре составляет около 1,4% от общего клеточного белка. Отсутствие в клетках защитного белка DnaK является причиной генотоксичности 4-NQO и менадиона.

Потенциальными мишенями в новейших терапевтических исследованиях стали малые белки теплового шока-sHsps с молекулярной массой 12-43 кDa. SHsps – это АТФ –независимые молекулярные шапероны – регуляторы систем жизнеобеспечения. Один из них Hsp27 –молекулярный шаперон - регулятор индуцибельного апоптоза и резистентности при химиотерапии [2].

В условиях стрессов - оксидативного либо теплового - в клетках E.coli многократно- до 160 мкМ - возрастает концентрация малых динуклеотидов –алярмонов, таких как AppppA ($Ap_nA$ )[3]. Эти структуры считались сигналами индукции стресса [4], однако впоследствии было установлено их участие в фосфорилировании. В E. coli $Ap_nA$ ингибируют активность белка DnaK в ответе теплового шока [5].

Сравнительное изучение комплекса БТШ , NO и H2S в развитии устойчивости к оксидативному стрессу в E.coli ранее не проводилось.

**Цель работы**

Целью настоящей работы является изучение влияния термической предобработки клеток E.coli (и развитие в них БТШ ) на суммарную резистентность клеток к окислительному стрессу, вызванному повторной (основной) обработкой донорами NO и H2S. Термическая предобработка клеток проводилась 15 мин при 43 С.

**Материалы и методы**

Донор оксида азота с тиосульфатом- $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]\cdot 4H_2O$ (ТНКЖтио) синтезирован в ИПХФ РАН Н.А. Саниной. Позитивный контроль- экспрессия генов sfiA 2,63 нМ 4НХО, «Sigma», США и гена soxS –0,5 мМ менадионом («Serva», ФРГ). Хромоген -ONPG, «Sigma», США. ПАБК- производство России.

В работе изучены бактериальные культуры, содержащие в геноме слитые опероны**:** E. coli PQ37[sfiA::lacZ], и TN530λφ(ΔsoxS'::lacZ***).*** E.coli PQ37 от проф. Хофнунга ( Институт Пастера, Франция) , а E. coli TN530- от T. Nunoshiba, Япония.

Экспрессия генов sfiA и soxS изучается опосредованно по активности фермента LacZ β- галактозидазы в колориметрическом тесте [6,7].

Показатели поглощения измерены при λ = 600 нм и λ = 420 нм на спектрофотометре PD-303UV (Apel Co. Ltd, Япония ).

Активность β-галактозидазы рассчитана по формуле: $(1000\times OD_{420}\times V)/(OD_{600}\times t)$,

где $OD_{420}$ и $OD_{600}$ – величины поглощения при 420 и 600 нм, соответственно, $V$ – разведение, $t$ – время инкубации с хромогеном, мин.

**Результаты и обсуждение**

На специально сконструированных клеточных моделях E.coli впервые изучен суммарный вклад белков теплового шока БТШ ( предобработка) -на стресс, вызываемый «основной» обработкой окислительными агентами –донорами NO и H2S. Индуцированные в клетке БТШ на 40-50% усиливали NO - экспрессию генов ДНК SOS-репарационного ответа и на 19-30% гена soxS в универсальной защитной системе SoxRS от окислительного стресса. При последовательной обработке клеток : тепловая обработка →сумма генотрансмиттеров (NO+H2S ) превышение уровней экспрессии защитного SoxRS регулона E.coli soxS было 3,7 – кратным, без учета вклада БТШ, и более, чем 5 –кратным – при обработке клеток с учетом влияния БТШ.

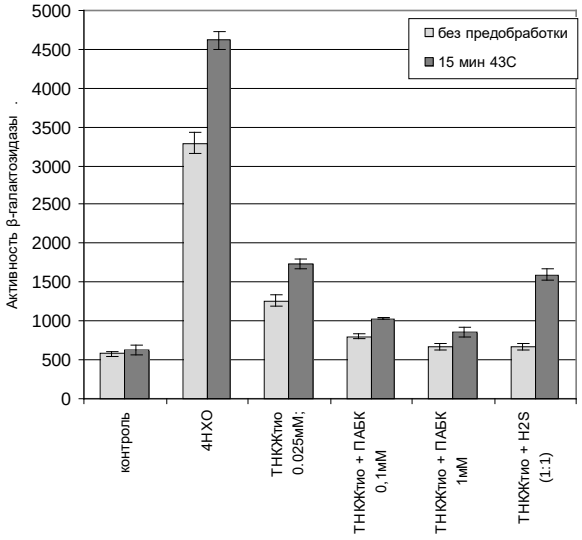



***Рис. 1 Белки теплового шока стимулируют экспрессию гена sfiA в E. coli PQ37, индуцированную NO и $H_2S$***

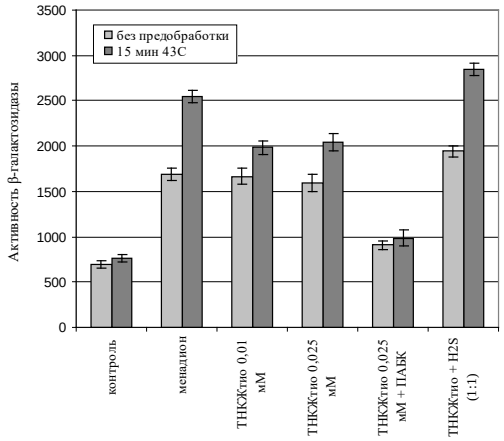



***Рис. 2. Белки теплового шока стимулируют экспрессию гена soxS в E. coli TN530***

Изучение модуляторных функций БТШ в системах генетической защиты бактериальных мутантов E.coli оксидом азота и сероводородом от окислительного стресса ранее не проводилось**.**

Но в культуре клеток гепатомы Н35 моно доноры оксида азота ДНКЖ глу и др. вызывали индукцию различных БТШ с массой от 28 до 100 кДа [8], а

функции белков БТШ Е89, С45 и С40 в указанной работе изучены слабо.

В нашей работе антиоксидант пара-аминобензойная кислота (ПАБК) ингибировала окислительный стресс во всех вариантах (Рис. 1,2). Внесение ПАБК в среду обработки снижало уровень экспрессии гена sfiA на 37-47%, в сравнении с NO- монообработкой. Это согласуется с многочисленными экспериментальными свидетельствами С.В. Васильевой [9] о регуляторной функции витамина ПАБК в ингибировании всего комплекса функций, составляющих глобальный индуцибельный ДНК SOS- репарационный ответ на повреждения структуры ДНК в E.coli.

**Литература**

1. Ghosh A., Stuehr D.J. Regulation of sGC via hsp90, cellular heme, sGC agonists, and NO: new pathways and clinical perspectives // Antioxid 190. Redox Signal. 2017. Vol. 26, N 4. P. 182 Redox Signal. 2017. Vol. 26, N 4. P. 182

2. Zeng L., Tan J., Lu T., et al. Small heat shock proteins and endoplasmic reticulum potential attractive therapeutic targets ? // Curr. Mol. Med. 2015. Vol. 15, P. 38-46
3. Bochner B.R.., Zylicz M., Georgopoulos C. Escherichia coli DnaK protein possesses a 5'-nucleotidase activity that is inhibited by AppppA // J. Bacteriol. 1986. Vol. 168, N 2. P. 931-935
4. Bochner B.R., Lee P.C., Wilson S.W.et al. AppppA and related adenylylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress. // Cell. 1984 Vol. 37, N 1. P. 225-232
5. Tilly K., McKittrick N., Zylicz M., Georgopoulos C. The dnaK protein modulates the heat-shock response of Escherichia coli // Cell. 1983. Vol. 34, N2. P. 641-646
6. Quillardet P., Huisman O., D'ari R., Hofnung M. The SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity //PNAS. 1982. Vol.79, N 19. P. 5971-5975
7. Nunoshiba T., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Demple B. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends E. coli against activated macrophages // PNAS. 1993.Vol. 90, N 21. P. 9993-9997
8. Wiegant F., Malyshev I.Y., Kleschyov A.L, et al. Dinitrosyl iron complexes with thiol ligands and SNAP as inductors of heat shock protein synthesis in H35 hepatoma cells // FEBS Letts. 1999. Vol. 455, P. 179-182
9. Vasilieva S.V. Petrishcheva M.S. Gusarova E.I. Osipov A.N. Vitamin para-Amino benzoic acid (PABA) controls generation of nitric oxide (NO) in vitro and its biological functions in the bacterial cells.//Adv. Tech. Biol. Med. 2015.4:195. OMICS Publisher, USA. DOI: 10.4172/2379

**Сведения об авторах**
***Васильева Светлана Васильевна.***
*доктор биологических наук*
*Зав. лабораторией теоретической генетики*
*Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля РАН*
*Москва, Россия*
*почта: svasilieva@sky.chph.ras.ru*

***Наталия Алексеевна Санина***
*доктор хим. наук, профессор. зав.отделом*
*Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН*
*Черноголовка, Российская Федерация*
*Эл. почта: sanina@icp.ac.ru*

**Information about author**
***S.V.Vasilieva***
*Doctor of Biological Sciences Laboratory of Theoretical Genetics*
*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS*
*Moscow, Russia*
*E-mail:svasilieva@sky.chph.ras.ru*

***Nataliya Alekseevna Sanina***
*Doctor of Science (Chem.), Professor,*
*Head of Department*
*Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russian*
*Chernogolovka, Russian Federation*
*E-mail: sanina@icp.ac.ru*

УДК 577.121.7:616.147.3-007.64
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.285-289

**Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин,**
**И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе**
Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

# ПОКАЗАТЕЛИ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНЬЮ

*В статье представлены результаты исследования уровня индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз, конечных метаболитов NO, концентрации нитротирозина, битирозина в сыворотке крови пациентов с варикозной болезнью вен нижних конечностей по сравнению со здоровыми донорами*

***Ключевые слова:*** *нитрозативный стресс, iNO-синтаза, eNO-синтаза, конечные метаболиты оксида азота, нитротирозин, битирозин*

**N.V. Korotkova, R.E. Kalinin,**
**I.A. Suchkov, N.D. Mzhavanadze**
Ryazan State Medical University

# INDICATORS OF NITROSATIVE STRESS IN PATIENTS WITH VARICOSE VEINS

*The article presents the results of a study of the level of inducible and endothelial NO synthase, nitric oxide metabolites, the concentration of nitrothyrosine and bityrosine in the blood serum of patients with varicose veins of the lower extremities compared with healthy donors*

***Key words****: nitrosative stress, iNO-synthase, eNO-synthase, nitric oxide metabolites, nitrothyrosine, bithyrosine*

## Введение

К настоящему времени в научной литературе накоплен большой объём экспериментальных и клинических данных по оксиду азота (II), по его метаболизму, включая субстрат его синтеза, изоферменты, принимающие участие в биосинтезе – NO-синтазы (NOS), физиологические эффекты, а также патогенетические аспекты заболеваний, связанных с нарушением его синтеза [1, с. 35].

На сегодняшний день известны три изоформы NOS: нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS) экспрессируются конститутивно, в течение короткого времени в ответ на стимуляцию. Индуцибельная (iNOS) может экспрессироваться в течение достаточно долгого времени под действием эндотоксина, провоспалительных цитокинов и ряда других факторов [2, с.106]. Реализация биохимических эффектов NO может осуществляться по следующим механизмам: цГМФ-зависимому, что характерно для конститутивных форм, и цГМФ-независимому, присущему iNOS: воздействие осуществляется посредством образования ряда промежуточных соединений и продуктов их взаимодействия с белками. Так, при взаимодействии оксида азота с молекулой кислорода образуется реакционноспособное промежуточное соединение, а при его взаимодействии с супероксид-анион радикалом ($O_2^-$) оно преобразуется в активные формы азота, в том числе, пероксинитрит *(ONOO−)*, который является мощным окислителем, нитрозилирует белки, вызывая развитие нитрозативного стресса [3, с.14].

Помимо самого NO, его конечные стабильные метаболиты ($NO^{-2}$ +$NO^{-3}$ = NOx) также рассматриваются в качестве сигнальных молекул и маркеров различной патологии, в том числе, и как новый фактор риска сердечно-сосудистых событий. Так, например, появились данные, что NOx в высоких концентрациях могут восстанавливать уровень NO при заболеваниях, связанных с его недостаточной генерацией или нарушенной биодоступностью; то есть, нитрат может выступать в качестве субстрата для дальнейшего продуцирования NO [4, с. 398]. Таким образом, повышение циркулирующих NOx может явиться результатом адаптационных процессов, компенсирующих патологически недостаточный синтез активного оксида азота в организме [5, с.123].

Варикозное расширение вен нижних конечностей – одно из самых распространенных заболеваний сосудистой системы человека. Этиология и патогенез болезни на протяжении долгого времени служат предметом пристального внимания во всем мире и в настоящее время рассматривается далеко не единственная теория его развития. Так, известна взаимосвязь варикозной болезни с генетикой, например, с полиморфизмом гена FOXC2 (forkhead box C2), мутации в котором связаны с нарушением развития клапанов поверхностных и глубоких вен [6, с. 9]. Также варикозная болезнь связана с гиперэкспрессией гена, кодирующего антиапоптотический белок BCL2, что вызывает изменение пропорционального уровня индукторов и ингибиторов апоптоза. Еще одной из генетических причин может явиться подавление экспрессии генов, кодирующих белки NELIN и SM22α (TAGLIN) - маркеры ранней дифференцировки гладкомышечных клеток, что приводит к фенотипической трансформации гладкомышечных клеток [7, с. 849].

Активно изучаются молекулярные механизмы трансформации венозной стенки. Это и гипоксия, провоцирующая секрецию фактора HIF-1α, контролирующего процессы ремоделирования через TGF-ß и VEGF; это и деградация внеклеточного матрикса, обусловленная изменением активности ферментов триптазы II (TPSB2), лизил-оксидазы (LOXL1), дисбалансом металлопротеиназ (MMP) и их ингибиторов (TIMP1 и TIMP2). Это и индукция MCP-1 (белок хемоаттрактант моноцитов 1), стимулирующего пролиферацию гладкомышечных клеток. Повреждение эндотелия венозной стенки также приводит к секреции им факторов роста (тромбоцитарного фактора роста PDGF и фактора роста фибробластов aFGF) [8, с.40-42].

Одним из значимых механизмов трансформации венозной стенки является снижение активности эндотелиальной синтазы азота (eNOS) в условиях так называемого сдвигового напряжения, формирующегося в результате недостаточности клапанов. Оксид азота, образующийся при ее функционировании, является естественным ингибитором пролиферации гладкомышечных клеток, а его недостаток ведет к структурной перестройке венозной стенки, и к переключению фенотипа клеток с сократительного на секреторный [9, с.73]. В связи с тем, что для данной патологии в современной научной литературе работы, описывающие связи с системой оксида азота, практически не встречаются, мы и решили провести настоящее исследование.

**Цель работы:** оценить уровень NO-синтаз и показателей нитрозативного стресса: нитротирозина, битирозина, конечных стабильных метаболитов оксида азота у пациентов с варикозной болезнью нижних конечностей.

**Материалы и методы.** Исследование одобрено на заседании ЛЭК ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, протокол № 9 от 15.04.2020. В исследовании участвовали 30 пациентов с диагнозом варикозная болезнь нижних конечностей. В контрольную группу вошли 30 здоровых лиц. В качестве материала для исследования послужила сыворотка крови. После однократного забора крови у пациентов и доноров, который осуществлялся утром после 12-часового голодания, кровь центрифугировали и хранили при температуре минус 20$^{o}$C не более 2-х месяцев.

В работе использовались следующие методы исследования: количественное определение NO-синтаз проводили сэндвич-методом ИФА на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc., США). Результаты выражали в нг/мл. Количественное определение нитротирозина проводили с использованием конкурентного ИФА с последующей детекцией на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplate reader) (Awareness technology Inc., США). Результаты выражали в нг/мл.

Конечные стабильные метаболиты оксида азота (нитраты и нитриты) определяли по методу Метельской В.А.Метод основан на восстановлении $NO^{-3}$ до $NO^{-2}$ хлоридом ванадия (III) с последующим спектрофотометрическим определением нитрата по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса. Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра с

регистрацией на микропланшетном анализаторе StatFax 2100 (microplate reader) (Awareness Technology Inc., США) при длине волны 540 нм. Результаты выражали в мкмоль/мл сыворотки крови.

Образование битирозина регистрировали по интенсивности флуоресценции в фосфатном буфере (pH 7,4) на спектрофлуориметре «Shimadzu RF-6000» (Япония) при длине волны возбуждения λext=325 нм и длине волны испускания λEm=415 нм. Полученные результаты выражали в единицах флуоресценции на мл сыворотки.

Результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с использованием программ Microsoft Office Excel 2016 и IBM SPSS Statistics 26 (StatSoftInc., США). Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Для определения статистической значимости различий непрерывных величин использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

**Полученные результаты.** В процессе исследования были получены следующие результаты. Уровень индуцибельной iNOS в сыворотке крови пациентов с варикозной болезнью нижних конечностей был статистически значимо выше, чем у здоровых доноров. Уровень eNOS не отличался у пациентов с варикозом и здоровых доноров (Рис. 1).

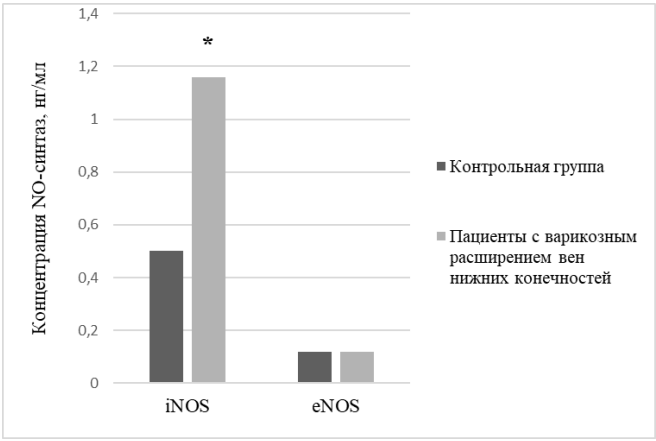



***Рис.1 Изменение концентрации индуцибельной и эндотелиальной NOS у пациентов с варикозной болезнью нижних конечностей, по сравнению с группой контроля, нг/мл***
****статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)***

Известно, что при нормальной скорости тока крови касательное напряжение стимулирует экспрессию и активацию eNOS, которая, в свою очередь, ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток, способствуя их релаксации [10, с. 89]. Соответственно, снижение активности eNOS в участках замедленного тока крови, который наблюдается в участках расширенных вен, может препятствовать синтезу NO и реализации его эффектов. Мы не отметили изменения уровня eNOS, вероятно потому, что отмечается изменение напряжение сдвига, и эндотелий реагирует нарушением активации данного фермента.

Уровень нитротирозина был выше на 10 %, чем в группе контроля, что не явилось статистически значимым. Известно, что повышение уровня нитротирозина в сыворотке крови является результатом воздействия пероксинитрита, и связано с риском развития ряда заболеваний, в том числе, сердечно-сосудистых, почечной недостаточности и онкологических заболеваний [11, с.97]. В научном сообществе в настоящее время нет единого взгляда на уровень нитротирозина в плазме крови. Есть мнение, что нитротирозин является маркером генерации активных форм азота при ряде клинических состояний; при этом, одни исследователи отмечают повышение данного показателя у пациентов с различной патологией, другие детектирует снижение его уровня ниже контрольной группы.

Известно, что основное количество нитротирозина преобразуется в 3,3-

дитирозин (битирозин), образование которого превалирует над нитротирозином при длительном воздействии активных форм азота (АФА), вследствие чего он используется в качестве маркера нитрозативного стресса [12, с.8]. В нашем исследовании мы получили повышение битирозина в сыворотке крови пациентов с варикозной болезнью нижних конечностей по сравнению со здоровыми донорами на 75%, но данное повышение не явилось статистически значимым.

Концентрация конечных стабильных метаболитов оксида азота ($NO^{-2}$ +$NO^{-3}$ = NOx) в сыворотке крови пациентов с варикозом составила 89,8 мкмоль/л, что в 2 раза превысило данный показатель в группе контроля и явилось статистически значимым (Рис.2).

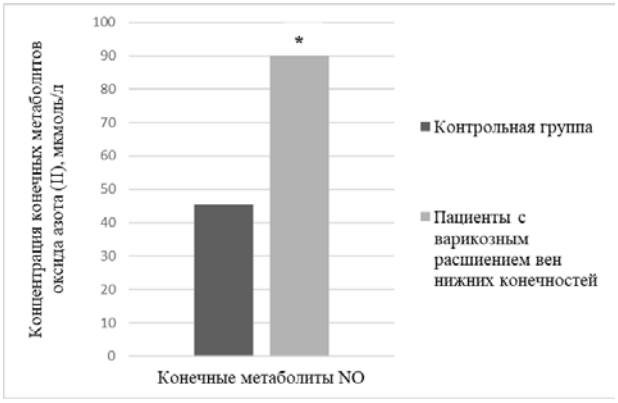



***Рис.2 Изменение концентрации конечных стабильных метаболитов оксида азота у пациентов с варикозной болезнью нижних конечностей, по сравнению с группой контроля, нг/мл***
****статистически значимые отличия от контрольной группы (p<0,05)***

Повышенный уровень NOx, который мы получили в нашем исследовании, вероятно, ассоциирован с дисбалансом вследствие нарушения эндотелиальной функции, развившейся у пациентов с варикозной болезнью; также он может быть связан с увеличением активности iNOS, синтез которой стимулируется при веноспецифическом воспалении. И, вероятно, повышенный уровень конечных метаболитов NO может служить источником выработки новых молекул NO, предотвращая усугубление нитрозативного стресса у пациентов с варикозным расширением вен нижних конечностей, как адаптивный процесс при данной патологии.

**Выводы.** Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: варикозное расширение вен нижних конечностей ассоциировано с повышением показателей нитрозативного стресса: нитротирозином, битирозином и конечными метаболитами оксида азота (II) в сыворотке крови. При этом уровень эндотелиальной NO-синтазы не отличается у пациентов и доноров; уровень индуцибельной NO синтазы повышен по сравнению с группой контроля, что может свидетельствовать о вовлечение данного фермента в развитие нитрозативного стресса при варикозной болезни.

**Литература.**

1. Пожилова Е.В., Новиков В.Е. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2015. Т. 14. № 4.С.35-41.
2. Гуманова Н.Г. Оксид азота, его циркулирующие метаболиты NOx и их роль в функционировании человеческого организма и прогнозе риска сердечно-сосудистой смерти (часть I) // Профилактическая медицина. 2021. Т. 24. №9. С. 102-109.
3. Галагудза М.М., Бельский Ю.П., Бельская Н.В. Индуцибельная NO-синтаза как фармакологическая мишень противовоспалительной терапии: надежда не потеряна? // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. 2023. Т.38. №1.С.13-20.

4. Lundberg J.O, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. Free Radic. Biol. Med. 2004. 37:395-400.
5. Гуманова Н.Г. Оксид азота и его циркулирующие метаболиты NOx, их роль в функционировании человеческого организма и прогнозе риска сердечно-сосудистой смерти (Часть II) // Профилактическая медицина. 2021. Т. 24. №10. С. 119-125.
6. Surendran S., Girijamma A., Nair R., et al. Forkhead box C2 promoter variant c.-512C>T is associated with increased susceptibility to chronic venous diseases. PLoS One. 2014.9; (3):e90682.
7. Chen S., Qin S., Wang M., Zhang S. Expression and significance of NELIN and SM22α in varicose vein tissue. Exp Ther Med. 2015. (9);3: 845–849.
8. Золотухин И.А., Порембская О.Я., Сметанина М.А., Сажин А.В., Филипенко М.Л., Кириенко А.И. Варикозная болезнь: на пороге открытия причины? // Вестник РАМН. 2020. Т.75. №1. С. 36–45.
9. Шадрина А.С, Золотухин И.А., Филипенко М.Л. Молекулярные механизмы развития варикозной болезни нижних конечностей // Флебология. 2017. Т.11. №2. С. 71−75.
10. Pfisterer L, König G, Hecker M, Korff T. Pathogenesis of varicose veins - lessons from biomechanics. Vasa. 2014. 43(2):88-99.
11. Сорокина Е.Г., Афанасьева С.А., Радыгина Т.В., Петричук С.В., Потапов А.С., Семикина Е.Л., Реутов В.П. Содержание белков сыворотки крови, модифицированного альбумина и 3-нитротирозина у детей с воспалительными заболеваниями кишечника //
12. В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT+M&Ec`2020 (Гурзуф, с 31.05 по 11.06 2019 г.). 2023. Весенняя сессия. С. 93-98.
13. Boer 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. - Vol. 4. – P. e190003.



***Сведения об авторах***

***Короткова Наталья Васильевна***
*к.м.н., доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ДПО, с.н.с. лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ*
*Рязань, Россия*
*Эл. почта: fnv8@yandex.ru*

***Калинин Роман Евгеньевич***
*д.м.н., профессор, заведующий кафедрой сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики*
*Рязань, Россия*
*E-mail: kalinin-re@yandex.ru*

***Сучков Игорь Александрович***
*д.м.н., профессор, профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики*
*Рязань, Россия*
*E-mail: i.suchkov@rzgmu.ru*

***Мжаванадзе Нина Джансуговна***
*д.м.н., доцент, профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики, с.н.с. лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ*
*Рязань, Россия*
*E-mail: nina_mzhavanadze@mail.ru*

***Information about author***

***Korotkova Natalya Vasilevna***
*MD, PhD, associate professor, department of biological chemistry with course of clinical laboratory diagnostics of Continuing Professional Education Faculty, senior researcher at the central research laboratory*
*Ryazan, Russian Federation*
*E-mail: fnv8@yandex.ru*

***Kalinin Roman Evgenievich***
*MD, PhD, Professor, Head of the department of cardiovascular, endovascular surgery and diagnostic radiology*
*Ryazan, Russian Federation*
*E-mail: kalinin-re@yandex.ru*

***Suchkov Igor Aleksandrovich***
*MD, PhD, Professor, Professor of the department of cardiovascular, endovascular surgery and diagnostic radiology*
*Ryazan, Russian Federation*
*E-mail: i.suchkov@rzgmu.ru*

***Mzhavanadze Nina Dzhansugovna***
*MD, PhD, professor of the department of cardiovascular, endovascular surgery and diagnostic radiology, senior researcher at the central research laboratory*
*Ryazan, Russian Federation*
*E-mail: nina_mzhavanadze@mail.ru*

УДК 577.3; 576.32; 544.277
ГРНТИ 31.27
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.290-295

**З.В Куроптева**
Институт биохимической физики
им. Н.М.Эмануэля РАН

## ОКСИД АЗОТА И АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА В МАКРОФАГАХ

*Исследовано влияние аскорбиновой кислоты (АК) на процесс образования оксида азота в перитонеальных макрофагах мышей. Методами ЭПР- и УФ-спектроскопии было зарегистрировано значительное повышение образования оксида азота в инкубированной при комнатной температуре суспенизии макрофагов с АК.*
***Ключевые слова:*** *оксид азота, аскорбиновая кислота, перитонеальные макрофаги, метод ЭПР, УФ-спектроскопия.*

**Kuropteva Z.V.**
Emanuel Institute of Biochemical Physics,
Russian Academy of Sciences

## NITRIC OXIDE AND ASCORBIC ACID IN THE MACROPHAGES

*The effect of ascorbic acid (AA) on the formation of nitric oxide in mouse peritoneal macrophages was studied. ESR and UV spectroscopy revealed a significant increase in nitric oxide formation in a suspension of macrophages with AA incubated at room temperature.*
***Key words****: nitric oxide, ascorbic acid, peritoneal macrophages, ESR method, UV spectroscopy.*

**Введение.**

Активированные макрофаги , культивируемые совместно с опухолевыми клетками-мишенями, убивают клетки-мишени [1]. И агентом, ответственным за гибель опухолевых клеток, является синтезируемый макрофагами (МФ) оксид азота (NO). Участие NO в цитотоксической активности макрофагов по отношению к опухолевым клеткам было одним из первых функциональных свойств, описанных для этой молекулы [2-5]. Было показано, что ингибирование синтеза NO в макрофагах проводит к снижению противоопухолевой сопротивляемости организма и установление этого основного факта внесло огромный вклад в расширение исследований, связанных с образованием и функцией NO в норме и при патологии. И хотя имеются разнообразные, иногда и противоречивые данные о роли NO в развитии опухолей, всё же определённо установлено, что NO, синтезированный лейкоцитами и макрофагами, играет основную роль в их способности уничтожать опухолевые клетки [4-8].

Было показано, что поддерживаемая продолжительная продукция NO в макрофагах обеспечивает их цитостатическую/цитотоксическую активность не только по отношению к опухолевым клеткам, но и в отношении вирусов, бактерий, грибков, простейших, гельминтов [9].

Было установлено на клеточных линиях и линиях мышей, что резистентность к микробам часто связана с экспрессией индуцируемой NO-синтазы (iNOS). Более прямое доказательство роли iNOS было получено вначале Hibbs J. и его коллегами а затем и многими другими исследователями. Они использовали ингибиторы iNOS и показали, что ингибиторы ухудшают течение болезней, вызванных множеством вирусов и бактерий. Были установлены механизмы действия оксида азота - это ингибирование дыхания митохондрий (МХ)и синтеза ДНК, потеря железа клетками, ингибирование ферментов, участвующих в цикле Кребса.

Очевидно, что NO не единственный антипатогенный эффектор иммунной защиты, но в значительном большинстве случаев он является либо индуктором, либо исполнителем бактерицидной программы. Поэтому повышение синтеза NO в клетках иммунной системы имеет важное значение для повышения устойчивости организма к инфекционным заболеваниям, и, возможно, исходя из данных литературы, и профилактике

опухолевых заболеваний.

Были сообщения, что в ряде клеток синтез NO может быть повышен под действием АК. Исследования влияния АК на активность синтеза NO в клетках немногочисленны и данные достаточно противоречивы. Так в работе [10] была исследована роль АК на индукцию iNOS и синтез NO в макрофагах мышей линии RAW 264.7 и было установлено, что АК не повышала и не снижала экспрессию белка iNOS в этих клетках в отличие от сообщения, что АК усиливала индукцию белка в макрофаго-подобной клеточной линии J 774.1. В работах [11-12] сообщалось об увеличении продукции NO в эндотелиальных клетках, лейкоцитах животных и человека, клетках E. Coli. Эта противоречивость данных может зависеть от вида клеток.

В настоящей статье приведены данные, которые показывают, что в перитонеальных макрофагах мышей линии SHK количество синтезируемого NO может быть значительно увеличено под действием АК.

**Материалы и методы.**

Перитонеальные макрофаги выделяли стандартным способом вымывания содержимого брюшной полости мышей линии SHK (The SHK male mice Swiss-H mice from nursery Kriukovo, Russia) 0,9% раствором NaCl. Собранные клетки дважды промывали тем же раствором и центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. Осадок суспендировали в физрастворе. Концентрация клеток составила $2x10^9$ в 1 мл. Для питания клеток добавляли 2% р-р сыворотки крупного рогатого скота (КРС) (Biowest, France). Суспензию макрофагов делили на 2 части. К одной части добавляли раствор АК (АК фирмы Sigma) в трис-HCl буфере с pH 7. Концентрация АК в суспензии МФ составляла 9-10 мМ. Вторая часть с добавленным трис-HCl буфером использовалась в качестве контроля. Суспензии МФ с АК и без неё инкубировали при комнатной температуре. Через 20 и 48 часов инкубации отбирали пробы надосадочной жидкости и измеряли поглощение на спектрофотометре “Shimadzu” (Япония).

Для ЭПР исследований в качестве ловушки NO добавляли раствор Hb в концентрации $10^{-5}$ М. Через определенные времена инкубации растворов отбирали пробы и готовили образцы в виде столбиков в тефлоновых трубочках диаметром 3 мм и высотой 30 мм, замораживали их при температуре жидкого азота. Далее образцы освобождали от тефлоновых тубочек и получали образцы суспензии макрофагов, замороженные при температуре жидкого азота, в виде столбиков диаметром 3мм и высотой 30 мм.

Спектры ЭПР приготовленных образцов регистрировали на спектрометре ESP-300 фирмы «Bruker-Analitishe-Messtechnik» (Германия), при температуре жидкого азота.

**Результаты.**

Макрофаги грызунов (МФ) были одними из первых типов клеток, для которых было показано образование оксида азота (NO) из L-аргинина с участием индуцируемого фермента NO-синтазы (iNOS). В ответ на введение липополисахаридов (ЛПС) с гамма-интерфероном или без него эти клетки синтезировали мРНК iNOS и сам фермент. При этом было обнаружено накопление значительного количества нитритов и нитратов [1]. Но оказалось, что выделенные стандартным способом перитонеальные МФ, инкубируемые при комнатной температуре, без дополнительного стимулирования также могут синтезировать незначительное количество NO, которое можно было обнаружить по появлению нитритов и нитратов, являющихся стабильными продуктами окисления NO и регистрируемых методом УФ-спектроскопии при поглощении 330-340 нм. Эта способность МФ была использована в настоящей работе для изучения влияния АК на синтез NO в этих клетках. В качестве методов регистрации NO, образующегося в суспензии МФ, инкубирванных при комнатной температуре в присутствии АК и без неё, использовали методы УФ- и ЭПР спектроскопии. При исследовании обрзования NO методом ЭПР в качестве ловушки NO использовали Hb, который имеет высокое сродство к NO, и при взаимодействии с ним образует стабильные нитрозильные комплексы Гем- NO (НК Гем-

NO), которые обусловливают хорошо известный сигнал ЭПР – широкий синглет с g-фктором 2,02 и характерным триплетным расщеплением 17 Гс при g-факторе 2,01.

Спектры ЭПР образцов суспензии перитонеальных макрофагов (МФ) мышей, инкубированных, в присутствии АК (10мМ), (рис.1.1) и без нее (рис. 1.2). показаны на рис. 1. Сравнивая спектры на рис. 1.1 и 1.2, можно видеть, что в образцах МФ, инкубированных с АК в течение 48 часов, наблюдается интенсивный сигнал ЭПР, в образцах без АК сигнал незначительной интенсивности. Сигнал ЭПР в образцах МФ, инкубированных с АК обусловлен, нитрозильными комплексами НК Гем-NO, и появление его указывает на образование оксида азота в исследуемых клеточных системах.

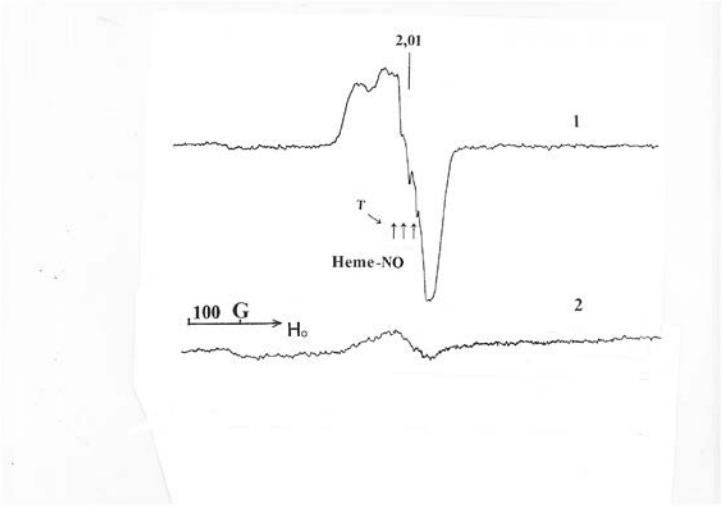



***Рис. 1. Спектры ЭПР образцов суспензии перитонеальных макрофагов, инкубированных в течение 48 ч при комнатной температуре: 1- в присутствии АК (10 мМ в 0,01 М трис-буфере); 2 – без добавления АК (0,01 М трис-буфере). Условия регистрации спектров: мощность СВЧ 20 мВт, амплитуда модуляции магнитного поля 5 Гс, температура измерения 77 К.***

На рис. 2. показано изменение интенсивности сигнала ЭПР в суспензии МФ, инкубированных в течение 20 и 48 ч как в присутствии АК, так и без неё.

К 48 ч интенсивность сигнала ЭПР НК Гем-NO а, следовательно, и количество образовавшегося NO, в образцах, инкубированных с АК более, чем втрое превышали интенсивность этого сигнала в образцах без АК. Количественная оценка показала, что в этих условиях к 48 часам под действием АК в макрофагах вырабатывается не менее $1{,}5 \times 10^9$ молекул NO на каждую клетку.

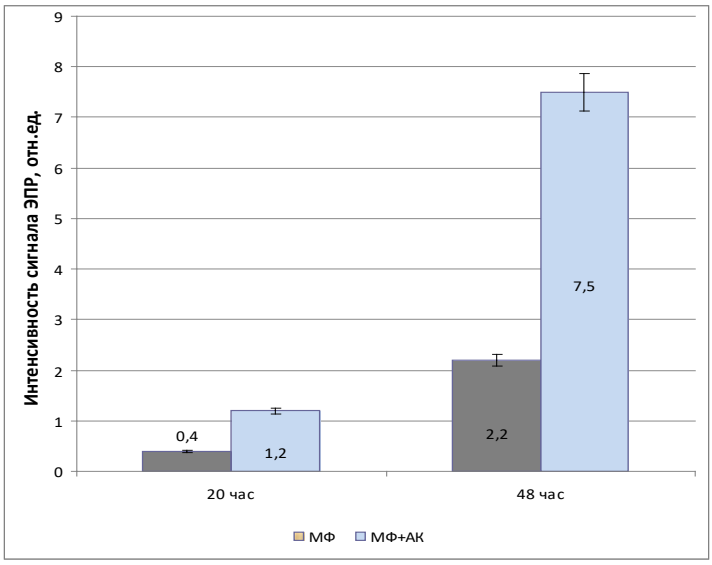



***Рис. 2. Изменение интенсивности сигналов ЭПР образцов суспензии перитонеальных макрофагов, инкубированных в течение 20 и 48 ч при комнатной температуре: в присутствии АК и без добавления АК.***

Были исследованы также спектры оптического поглощения надосадочной жидкости суспензий МФ, инкубированных при комнатной температуре в течение 48 час как с АК, так и без нее. В образцах, инкубированных в присутствии АК регистрировалось поглощение в области 330-340 нм в среднем в 2-2.5 большее, чем в образцах надосадочной жидкости макрофагов, инкубированных без АК. Инкубационная среда состояла из трис-буфера с добавлением 2% сыворотки КРС в контрольных образцах, в опытных образцах дополнительно добавлялись АК или АК + L-аргинин – все в трис-буфере. В спектрах поглощения надосадочной жидкости макрофагов, инкубированных в присутствии АК с добавлением L-аргинина ($10^{-3}$ мМ), субстрата NO-синтазы и дополнительного источника NO, величина поглощения (и, следовательно, количество образовавшегося нитрита) была выше, чем в образцах макрофагов, инкубированных только с АК.

**Обсуждение.** Полученные данные показали, что АК способна значительно увеличивать синтез оксида азота в перитонеальных макрофагах и, следовательно, активировать NO-синтазу. Методом ЭПР после 48 ч инкубации МФ с АК было зарегистрировано количество образующегося NO более чем в 3 раза выше, чем в образцах, инкубированных без АК. Количественная оценка показала, что каждая клетка МФ в условиях эксперимента за 48 часов могла синтезировать до $1{,}5 \times 10^9$ молекул NO. По спектрам поглощения было зафиксировано меньшее увеличение синтеза NO, чем методом ЭПР. Это связано с тем, что в опытах ЭПР все образующиеся молекулы NO акцептируются Hb, а в опытах УФ- спектроскопии пока не израсходована вся АК в суспензии, образовавшийся нитрит частично разлагается под действием АК по схеме 1.

Для того, чтобы получить ответ о механизмах действия АК, необходимы дальнейшие исследования. Тем не менее, по полученным и имеющимся в литературе данным, можно сделать наиболее вероятное предположение, что АК принимает участие в восстановлении кофакторов iNOS. iNOS – тщательно регулируемый фермент и для нормального функционирования этого фермента необходимы 6 кофакторов: FMN, FAD, NADH, $BH_4$, NADPH и связанный с активным центром кальмодулин. При этом, ключевым кофактором iNOS является тетрагидробиоптерин ($BH_4$).

Предположение основано на имеющихся в литературе данных об увеличении содержания НАДФН под действием АК и об участии её в поддержании $BH_4$ в восстановленном состоянии. АК необходима, чтобы предотвращать необратимое окисление ключевого кофактора NO-синтазы тетрагидробиоптерина $BH_4$, в дигидробиоптерин $BH_2$ и тем самым поддерживать активность iNOS. Действительно, в работах [10,12-13] приведены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что повышенная активность iNOS связана с поддержанием в восстановленном состоянии ключевого кофактора iNOS – тетрагидробиоптерина.

Также были получены данные о том ,что АК не влияет на экспрессию iNOS, которые также подтверждают предположение об участии её как восстановителя кофакторов iNOS. В пользу этого предположения косвенно свидетельствуют и данные о функционировании в МФ цикла синтеза NO и аргинина, так как при активной работе цикла потребность в $BH_4$ значительно возрастает [14-15]. Ранее уже были сообщения о стимулировании образования NO аскорбиновой кислотой в иммунокомпетентных клетках - лейкоцитах животных и человека и некоторых видах макрофагов.

Мы полагаем, что этот эффект играет основную роль в стимулировании аскорбатом иммунной системы человека. При бактериальной и вирусной инфекции происходит как индуцирование iNOS, так и индуцирование гуморальных факторов – цитокинов. Цитокины активируют образование NO в лейкоцитах и макрофагах. NO, ингибируя дыхательные системы и синтез ДНК в клетках-мишенях (патогенных бактериях, опухолевых клетках) тормозит размножение их и способствует гибели этих клеток. АК, содержание которой в лейкоцитах и МФ высокое, усиливает процесс выработки NO. Но АК при этом расходуется, поэтому для поддержания способности лейкоцитов и МФ синтезировать NO, следует поддерживать достаточный уровень АК в организме.

О связи иммунной системы животных с АК, свидетельствует и тот факт, что при неблагоприятных воздействиях у животных, которые сами способны синтезировать АК, сразу же повышается синтез АК, т.е. потребность в этом витамине возрастает в несколько раз. То, что АК способна поддерживать иммунную систему организма человека, известно уже в течение многих лет. Особенно эффективным, оказалось использование АК в профилактике и борьбе с простудными заболеваниями. Но механизм действия АК и ее участия в антибактериальном действии был непонятен ранее.

Мы полагаем, что установленный нами в настоящей работе эффект увеличения синтеза оксида азота под действием АК в перитонеальных макрофагах, а также полученные в последние два десятилетия нами и рядом других исследователей, и описанные выше, данные о повышении продукции оксида под действием АК в иммунокомпетентных клетках, является основным в наблюдаемом на практике профилактическом и лечебном действии этого соединения, по крайней мере, при простудных заболеваниях.

**Литература.**

1. Krahenbuhl J.L., Remington J.S. The role of activated macrophages in specific and nonspecific cytostasis of tumor cells // J. Immunology. 1974. V. 113. P. 507-516.
2. Hibbs J. B. Jr., Vavrin Z. Taintor R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells // J. Immunol. 1987. V. 138. № 2. P. 550-565.
3. Stuehr D. J., Marletta M.A. Synthesis of nitrite and nitrate in Murine macrophag cell lines // Cancer Res., 1987. V. 47, № 21. P. 5590-5594.
4. Stuehr D.J., Nathan C.F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells // J.Exp. Med. 1989. V. 69. P. 1543-1555.
5. Hibbs J. B. Jr., Taintor R. R., Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine, deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite // Science. 1987. V. 235. N4787. P. 473-476.
6. Stuehr D.J. Marletta M.A. Induction of nitrit/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, interferon-gamma // J. Jmmunol. 1987. V. 139. P. 518-525.
7. Keller R. The macrophage response to infectious agents: mechanisms of macrophage activation and tumour cell killing // Res. Immunol., 1993. V. 144. P. 271-273.
8. Farias-Eisner R., Sherman M.P., Aerberhard E., Chaudhuri G. Nitric oxide is an important mediator of tumoricidal activity in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 9407-9411.
9. Croen K.D. Evidence for an antiviral effect of nitric oxide // J. Clin. Invest. 1993. V. 91. P. 2446-2452.
10. Nakai K., Urushihara M., Kubota Y., Kosaka H. Ascorbate enhances iNOS activity by increasing tetrahydrobiopterin in RAW 264.7 cells // Free radical Biology and Medicine. 2003. V. 35. P. 929-937.
11. Куроптева З.В., Байдер Л.М., Жумабаева Т.Т. Влияние аскорбиновой кислоты на продуцирование лейкоцитами оксида азота // Биофизика. 2000. Т. 54. Вып. 4. С. 671-674.
12. Huang A., Vita J.A., Venema R.C., Keaney J.F. Ir. Ascorbic acid enhances endothelial nitric oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 17399-17406.
13. Hebel J.M., Marletta M.A. Macrophage nitric oxide synthase: relationship between enzyme-bound tetrahydrobiopterin and synthase activity // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 7160-7165.
14. Байдер Л.М., Алещенко А.В., Куроптева З.В. О цикле синтеза аргинина и оксида азота в макрофагах // Докл. РАН. 2005. Т. 405. № 4. С. 547-549.

15. Куроптева З.В., Байдер Л.М., Наглер Л.Г., Богатыренко Т.Н., Белая О.Л. Синтез аргинина и оксида азота в клетках с индуцируемой NO-синтазой // Изв. РАН. Сер. Хим. 2019. № 1. С. 174-180.

**Сведения об авторах**
**Куроптева Зоя Вениаминовна.**
Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Москва, Россия
*Эл. почта: zv.kuropteva@gmail.com*

**Information about author**
***Kuropteva Zoya Veniaminovna***
*Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher*
*Emanuel Institute of biochemical physics, Russian Academy of Sciences*
*Moscow, Russian Federation*
*E-mail: zv.kuropteva@gmail.com*

УДК 616.831-006, 612.812
ГРНТИ 76.29.42
DOI 10.47501/978-5-6044060-4-5.296-302

**И.А.Воронина, Е.М.Трошина, О.Б.Сазонова, П.Л.Калинин, А.Н.Шкарубо, М.А.Кутин, Д.В.Фомичев, О.И.Шарипов, Д.Н. Андреев, И.В.Чернов, А.Д.Донской, Л.И.Астафьева, Ю.Г.Сиднева, В.В.Иванов**
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва

# ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИСХОДОВ ОПЕРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ДИЭНЦЕФАЛЬНОЙ И СУПРАСЕЛЛЯРНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

*В статье представлена оригинальная методика персонального прогнозирования исходов операций у больных с новообразованиями диэнцефальной и супраселлярной локализации на основе клинико-эпидемиологического подхода и применения интеллектуального анализа (Data Mining) клинических и электроэнцефалографических данных. Выделены нозологически специфичные тесты для прогнозирования исхода хирургического вмешательства с расчетом чувствительности и специфичности.*

***Ключевые слова:*** *нейроонкология, прогноз исхода хирургического вмешательства, количественная электроэнцефалография.*

UDC 616.831-006, 612.812
GRNTI 76.29.42

**I.A.Voronina, E.M.Troshina, O.B. Sazonova, P.L.Kalinin, A.N.Schkarubo, M.A.Kutin, D.V.Fomichev, O.I.Scharipov, D.N. Andreev, I.V.Chernov, A.D.Donskoy, L.I.Astafieva, J.G.Sidneva, I.S.Clochrova, V.V.Ivanov**
Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

# PERSONALIZED PREDICTION OF SURGICAL OUTCOMES IN PATIENTS WITH TUMORS OF DIENCEPHALIC AND SUPRASELLAR LOCALIZATION

*The article presents an original method for personalized predicting surgical outcomes in patients with tumors of diencephalic and suprasellar localization based on a clinical and epidemiological approach and the use of intelligent analysis (Data Mining) of clinical and electroencephalographic data. Use of the methods allowed us to programmatically select nosologically specific test for making surgical outcome prognosis, including sensitivity and specificity calculations.*

***Keywords:*** *neurooncology, surgical outcome prognosis, qualitative electroencephalography.*

**Введение.** Работа посвящена проблемам прогнозирования исходов операций у больных с новообразованиями диэнцефальной и супраселлярной локализации. Совершенствование оперативных вмешательств по удалению этих новообразований позволило достичь значительных успехов, однако, частота нарастания послеоперационных клинических нарушений остается еще высокой [1-3]. Повышение эффективности лечения этого контингента больных имеет существенную медицинскую, социальную и экономическую значимость. Прогнозирование исхода оперативного вмешательства ранее осуществлялось только на основе экспертных оценок [3]. Возрастающее значение в персонифицированном прогнозировании исходов операций имеет использование современных математических методов обработки данных, в том числе интеллектуального анализа (Data Mining) [4,5]. По данным мировой литературы мало исследований, посвященных прогнозированию исхода операции у этой категории, а работ на основе клинико-эпидемиологического подхода и применения интеллектуального анализа данных (Data Mining) не представлено.

**Цель работы**. Повышение точности персонифицированного прогнозирования исхода операции у больных с разными нозологическими формами новообразований

диэнцефальной и супраселлярной локализации на основе клинико-эпидемиологического подхода и применения интеллектуального анализа (Data Mining) клинических и электроэнцефалографических (ЭЭГ) данных.

**Материалы и методы.** В ходе работы было обследовано 416 пациентов, из них 370 с новообразованиями диэнцефальной и супраселлярной локализации - нейроэпителиальными опухолями разных отделов III желудочка (дна, передних и задних отделов, крыши, распространенными с неизвестной исходной зоной роста, тампонирующими его полость), зрительных бугров, опухолями шишковидной железы (паренхимы и герминативно-клеточных), внемозговыми опухолями (эндо-супраселлярными аденомами гипофиза, супраселлярными и экстра-интравентрикулярными краниофарингиомами, менингиомами бугорка турецкого седла), а также коллоидными кистами III желудочка. Пациенты были оперированы в ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России. Из включенных в исследование было 184 мужчин и 186 женщин в возрасте от 17 до 55 лет (средний возраст 40 ±15,6 лет).

Проведено наблюдательное продольное, проспективное, одноцентровое когортное исследование и по типу «случай-контроль». Использовали оригинальные методики на основе клинико-эпидемиологического подхода и модифицированного алгоритма ассоциативных правил из арсенала интеллектуального анализа данных (Data Mining). Статистический анализ данных осуществлялся с помощью пакета «Statistica 6,0» (StatSoft, Inc., США). Статистическая обработка данных проводилась с помощью методик, включающих в себя дескриптивную статистику, непараметрический корреляционный анализ (коэффициент ранговой корреляции Спирмена), U-тест Манна-Уитни, метод Уилкоксона, критерий $\chi 2$ Пирсона и другие. Использованы клинический, нейровизуализационный, морфологический и ЭЭГ-методы.

Больным проведено комплексное исследование, включающее клинические и инструментальные методы в до- и раннем послеоперационном периодах. Конечной точкой исследования являлся клинический статус пациента к завершению раннего послеоперационного периода.

Расчет индивидуальных и групповых аномальностей ЭЭГ-индикаторов. Сначала путем обработки 50 записей ЭЭГ здоровых испытуемых для каждого индикатора были построены эмпирические распределения и вычислены их 5- и 95-процентили. Затем для ЭЭГ-записей больных были рассчитаны численные ЭЭГ- индикаторы. Для ЭЭГ-индикаторов строили эмпирические их распределения и определяли 5 и 95 процентили. Выход значения ЭЭГ-индикатора за пределы этого интервала являлся критерием его аномальности. Значения ЭЭГ-индикаторов устанавливались следующим образом. Сначала путем обработки ЭЭГ- записей для каждого индикатора были построены эмпирические распределения и вычислены его 33- и 67-процентили. Затем для всех сегментов ЭЭГ-записей больных были рассчитаны ЭЭГ-индикаторы с присвоением значений «ниже нормы», если большинство значений сегментов было меньше 33-процентиля, и аналогично «выше нормы», если - больше 67-процентиля. Уровень значимости принимается равным 0,05. Затем для каждого больного были рассчитаны наборы спектральных показателей, число которых равнялось числу сегментов в ЭЭГ-записи (4–6).

Аномальности ЭЭГ-индикаторов кодировались префиксами их наименований: «+», если их значения были выше, и «-», если ниже нормы. ЭЭГ-индикаторы со значениями, значимо не отличающимися от «нормы», не представляли интерес и поэтому отбрасывались. В результате дискретизации значений ЭЭГ-индикаторов числовые значения преобразовывались в порядковые. С учетом того, что каждый ЭЭГ-индикатор расщеплялся на два - «ниже нормы» и «выше нормы», всего получили 2070 значений ЭЭГ-индикаторов в итоговой таблице. Групповые аномальности ЭЭГ-индикаторов (ЭЭГ-типы) рассчитывали на основе факторного анализа. Общие факторы определяли не менее 70% дисперсии различающихся признаков в группах.

Для решения дифференциально-диагностических и прогностических задач была

разработана специальная методика на основе модели клинической эпидемиологии «Тест-Болезнь» с использованием модифицированного алгоритма ассоциативных правил из арсенала интеллектуального анализа данных (Data Mining), которая позволила выделить критерии - тесты. В качестве «тестов», как это трактуется в клинической эпидемиологии, рассматривались сочетания типичных, часто встречающихся признаков и атипичных, практически не встречающихся при верифицируемом диагнозе или исходе операции.

Для расчётов тестов все данные приводили к номинальной шкале и сводили в единую базу данных. С использованием программы осуществляли распределение всех больных по ответу на тест. Он считался положительным, если все его признаки имелись у пациента, и отрицательным – в противном случае. Первоначально выявлялись кандидаты в тест, производилась их оценка и верификация. Затем вычислялся оптимальный дифференциально-диагностический тест (наиболее специфичный и достаточно чувствительный) с расчетом чувствительности, специфичности, апостериорной вероятности клинической ситуации, ошибок I и II родов и 95% доверительных интервалов их выборочных значений (уровень статистической значимости принимался $p \leq 0{,}001$).

Были вычислены клинические, ЭЭГ- и прогностические тесты исходов операций для больных с разными нозологическими вариантами новообразований.

Критериями оценки эффективности операций служили клинические исходы: «благоприятный» - ненарастание и/или регресс симптомов, «неблагоприятный» - нарастание и/или появление симптоматики с компенсацией состояния или летальным исходом. Вариант исхода операций устанавливался на основании объективных данных и фиксировался в историях болезни (учетная форма 066у/-02) на момент окончания раннего послеоперационного периода (день выписки из клиники, в среднем 7-30 суток). При этом анализировались как факторы риска, связанные с исходным состоянием больного (клинические и параклинические данные), так и осложняющие факторы, которые могут выявиться или возникнуть во время проведения оперативного вмешательства, т.е. интраоперационные данные (злокачественность опухоли, кровотечение, нестабильная гемодинамика, длительность операции).

**Результаты.** Из общей базы клинических и параклинических данных (включая аномальности ЭЭГ-индикаторов и интраоперационные данные) были вычислены прогностические тесты неблагоприятного исхода операций у больных с разными нозологическими формами новообразований (таб.1).

***Таблица 1 - Прогностические тесты неблагоприятного исхода операций у больных с новообразованиями диэнцефальной и супраселлярной локализации***

| **Нозологические формы новообразований** | **Прогностический тест неблагоприятного исхода операции** | **Средние выборочные значения и их 95% ДИ** | |
|---|---|---|---|
| | | **Чувств. (Se)** | **Специф.(Sp)** |
| **Нейроэпителиальные дна III желудочка** | -t(F3-Pz) & +d(C4-Fp1) & -a(F7-O1) & +b(C3-T6) | 1,000 (1,000-1,000) | 1,000 (1,000-1,000) |
| **Нейроэпит. передних отделов III желудочка** | -b(Cz-Fp1) & -a(T5-T6) & -aMO2 | 1,000 (1,000-1,000) | 1,000 (1,000-1,000) |
| **Нейроэпителиальные задних отделов III желудочка** | +t(T4-T6) & +d(F7-T6) & -t(C4-P3) & +a(O1-P3) & +bMFp1 & +b(P3-T6) | 1,000 (1,000-1,000) | 1,000 (1,000-1,000) |
| **Нейроэпитиальные крыши III желудочка** | -a(Fp2-P4) & -t(F3-O1) & -t(F3-T5) & +t(T3-T6) & +b(Fp2-T5) | 1,000 (1,000-1,000) | 0,938 (0,813-1,000) |
| **Нейроэпителиальные полости III желудочка** | +d(F3-T6) & -a(C4-F4) & +d(F4-Fp2) & +d(Cz-T6) & +b(O2-Pz) | 0,900 (0,700-1,000) | 1,000 (1,000-1,000) |
| **Нейроэпит. правого зрительного бугра** | +d(P4-T4)& +d(Pz-T3) | 1,000 (1,000-1,000) | 1,000 (1,000-1,000) |
| **Опухоли паренхимы шишковидной железы** | -a(F8-T5) & -a(P4-Pz) & -a(C3-F3) & -t(F3-F4) &+bMF7 | 0,900 (0,700-1,000) | 1,000 (1,000-1,000) |

| **Нозологические формы новообразований** | **Прогностический тест неблагоприятного исхода операции** | **Средние выборочные значения и их 95% ДИ** | |
|---|---|---|---|
| | | **Чувств. (Se)** | **Специф.(Sp)** |
| **Аденомы гипофиза, гормонал. активные** | +t(P3-Pz) & -t(T4-T5) & +bKP4 & -b(F7-F8) | 1,000 (1,000-1,000) | 1,000 (1,000-1,000) |
| **Аденомы гипофиза, гормонально неактивные** | -a(Cz-T6) & -a(F3-F8) & -a(Fp2-P4) & -a(F3-Fp2) & -a(F8-T4) & -a(F3-T5) & -t(C4-Pz )& -d(C3-Pz )& -a(F4-Fp2) & -a(Fp2-T6) & -t(Pz-T3) & +d(F7-T6) | 0,944 (0,833-1,000) | 0,917 (0,792-1,000) |
| **Супраселеллярные краниофарингиомы** | -tF4-P3 & -aC4-P3 & +dC4-T4 & -aC4-T4 & -tCz-T3 & -aPz-T4 & +aO1-P3 & -aF3-P3 | 0,656 (0,500-0,813) | 0,920 (0,800-1,000) |
| **Менингиомы бугорка турецкого седла** | -tF4-P3 & -aC4-P3 & +dC4-T4 & -aC4-T4 & -tCz-T3 & -aPz-T4 & +aO1-P3 & -aF3-P3 | 0,656 (0,500-0,813) | 0,920 (0,800-1,000) |
| **Коллоидные кисты III желудочка** | -t(T3-T4) & +dMT6 & -a(F3-T4) & -b(F3-P3) & +d(C4-F8) & -b(C3-F7) & +dMF3 & -t(F4-O1) & -b(F7-Fp1) & -t(F4-P3) & +b(Cz-O2) | 1,000 (1,000-1,000) | 0,951 (0,878-1,000) |

В наименовании ЭЭГ-индикаторов знаки отражают статистические значимые: «-» низкие, «+» высокие показатели относительно нормы; d- дельта, t-тета, α-альфа, b-бета поддиапазоны ритмов; M- мощность; K- связанность биопотенциалов; области коры: O- затылочная, P - теменная, C - центральная, F - лобная, Fp – лобно-полюсная, T – средне-височная; четная цифра, следующая за обозначением области, относится к правому полушарию, нечетная – к левому; F7 – левая и F8- правая передневисочные; T5 – левая и T6 – правая задневисочные; z - сагиттальный электрод. Знак «&» - означает одновременное присутствие признаков.

Для прогностических тестов специфичны были преимущественно низкие когерентные связи в диапазоне основного коркового ритма и высокая мощность альфа- и бета-диапазонов. В состав прогностических тестов вошли от 2 до 11 аномальностей ЭЭГ-индикаторов. Наиболее важными диагностическими критериями являлись аномальности когерентных связей, что, вероятно, было связано как с более объективным отражением степени компенсации общего состояния больного по ЭЭГ-данным в условиях опухолевого поражения головного мозга, так и с количественным преобладанием их в исходной базе данных. Нарушены были преимущественно длиннонейрональные меж- и внутриполушарные когерентные связи в передне-центральных областях, сниженные в альфа- бета- диапазонах и повышенные и в низких частотах, что свидетельствовало согласно данным литературы о дисбалансе корково-подкорковых вертикальных связей на разных иерархически соподчинённых уровнях: корковом, таламическом, гипоталамическом или стволовом. Сопоставление прогностических ЭЭГ-тестов неблагоприятного и благоприятного исходов операций выявило количественное превалирование аномальностей спектра ЭЭГ в первой группе больных - преимущественно сниженные когерентные связи в орбито-фронтальных областях коры, как отражение более выраженного исходного нарушения компенсации общего состояния у больных с неблагоприятным исходом операций.

Также были вычислены прогностические тесты благоприятного исхода операций у больных с разными нозологическими формами новообразований из общей базы клинических и параклинических данных (включая аномальности ЭЭГ-индикаторов и интраоперационные данные). В эти тесты вошли исключительно аномальности ЭЭГ-индикаторов. Средняя чувствительность составляла 0,88, специфичность – 0,97. Апостериорная вероятность тестов составляла в среднем 0,96, что свидетельствовало том, что с такими вероятностями у больных с определенной нозологической формой новообразования при

наличии соответствующего прогностического теста будет иметь место благоприятный исход операции.

Заключительным этапом работы явилось персонифицированное прогнозирование исхода операции. Для этого использовали не только комплекс клинических и параклинических данных больного, но и предварительно сформированную базу данных больных с аналогичной анализируемому больному нозологической или анатомо-топографической формой новообразования (при неизвестной гистологической природе опухоли). Для персонализированного прогнозирования подготавливали данные больного соответствующим основной базе данных образом. Производили отбор из базы данных больных и у них тех особенностей, которые имеют место у анализируемого больного. Учитывая данные анализируемого больного алгоритмически методами четырехклеточной модели клинической эпидемиологии из базы больных вновь выявляли прогностические тесты благоприятного неблагоприятного и благоприятного исходов операций по критерию их статистической значимости с характеристиками, не хуже гарантированных. Далее по разработанной программе «Оцениватель повышенного риска врачебного вмешательства - MedicalRiskForcaster» [6] рассчитывали для конкретного пациента прогноз исхода операции на основе алгоритмического сравнения его данных с нозологически специфичными тестами благоприятного и неблагоприятного исходов операций. Вероятность исхода прогнозировали по б**о**льшему показателю прогностической ценности положительного результата теста.

Валидизацию диагностической точности методики персонифицированного прогнозирования исходов операций проводили на экзаменационной когорте. Правильное прогнозирование исходов операций вычислено у 36 (78%) пациентов, причем чаще прогнозируется благоприятный исход (23 человека, 64%), чем неблагоприятный (13 человек, 36%). По данным литературы прогноз с таким уровнем считается верным [7].

Ошибочное прогнозирование исхода операции произошло преимущественно в тех наблюдениях, когда в качестве классификационного признака для отбора группы сравнения из основной базы данных принимался анатомо-топографический вариант новообразования и с меньшей частотой - при нозологическом варианте. Ошибочное прогнозирование неблагоприятного прогноза («ложная тревога», «перестраховка»), несомненно, предпочтительнее, чем неправильное предвидение благоприятного, но, с другой стороны, это может существенным образом повлиять на выбор тактики лечения.

Благоприятный исход был спрогнозирован ошибочно у 4-х пациентов. У 2-х больных прогнозирование осуществлялось по анатомо-топографическому признаку новообразования в связи с неизвестной гистологией опухоли, у 1–го больного возникло интраоперационное кровотечение, у 1-ой пациентки с менингиомой бугорка турецкого седла опухоль плотно и на большом протяжении срослась с передними мозговыми артериями, в раннем послеоперационном периоде развился спазм артерий Визилиева круга, появилась отрицательная динамика зрительных функций.

**Выводы.**

1. Между дооперационными клиническими и ЭЭГ-данными пациента и исходом оперативного вмешательства по удалению новообразований диэнцефальной и супраселлярной локализации существует статистически достоверная связь.
2. Получены нозологически специфичные прогностические тесты исходов операций и верифицированные алгоритмически на основе модели клинической эпидемиологии «Тест-Болезнь» с помощью модифицированного алгоритма ассоциативных правил из арсенала интеллектуального анализа (Data Mining).
3. Прогностическая эффективность методики персонифицированного прогнозирования варианта исхода операции у данной категории больных составляет 78%, что позволяют повысить точность персонифицированного прогнозирования исхода

операции у этих больных, которые ранее определялись только на основе экспертных оценок.

4. При прогнозировании высокого риска послеоперационных осложнений (0,8 и выше) целесообразна оптимизация тактики лечения (проведение патогенетически направленной предоперационной подготовки, шунтирующая операция, лучевая терапия и др.).

**Заключение.** Таким образом, данную работу можно рассматривать как одну из первых плодотворных попыток осуществить доказательное персонализированное прогнозирование исхода оперативного вмешательства у больного с новообразованием диэнцефальной или супраселлярной локализации на основе применения модифицированного алгоритма ассоциативных правил из арсенала интеллектуального анализа данных (Data Mining). Количественное персонифицированное прогнозирования исхода операции целесообразно использовать для поддержки принятия лечебно-диагностических решений в целях оптимизации тактики и повышения эффективности нейрохирургического лечения у этой категории больных.

**Литература.**

1. Григорьев А.Ю. Осложнения в ранние сроки после операции у больных с аденомами гипофиза: автореферат дисс.канд. мед.наук. 14.00.18 /Григорьев Андрей Юрьевич. - М.- 2003г. - 23.с.
2. Серова Н.К. Клиническая нейроофтальмология / Под ред.Н.К. Серовой.- Тверь: "Триада". - 2011. - 344 с.
3. Коновалов А.Н. Современные технологиии и клинические исследования в нейрохирургии /Под ред. А.Н.Коновалова. - М.- 2012. - Т.II. - 355 с.
4. Кобринский Б.А. Системы поддержки принятия решений в здравоохранении и обучении / Б.А. Кобринский //Врач и информационные технологии. -2010.- №2. - с. 39-45.
5. Марухина О.В. Применение методов Data Mining для выявления скрытых закономерностей в задачах анализа медицинских данных / О.В.Марухина, Е.Е. Мокина, Е.В. Берестенева //Фундаментальные исследования. - 2015.- №4. - с.107-113.
6. Воронина И.А., Воронов В.Г. Оцениватель повышенного риска врачебного вмешательства –MedicalRiskForcaster. № 2012613300 от 6.04. 2012 г. // Официальный бюллетень «Программы для ЭВМ. Базы данных. Топологии интегральных микросхем». - 2012.- №3.- Ч.I – С.41.
7. Ramesh V.J. Predictive model for survival among neurosurgical intensive care patients / VJ.Ramesh, R.Umamaheswara,S.Ganne, T.Kandavel at al. // Journal of Neurosurgical Anesthesiology: July 2011 - Volume 23 - Issue 3 - p 183–187.doi: 10.1097/ANA.0b013e31821cb9ec

**Сведения об авторах**

***Ирина Александровна Воронина***
*Д.м.н., с.н.с, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: IVoronina@nsi.ru*

***Елена Михайловна Трошина***
*К.б.н., в.н.с, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: ETroshina@nsi.ru*

***Ольга Борисовна Сазонова***
*К.м.н., в.н.с., ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия ,Эл. почта: OSazonova@nsi.ru*

**Information about author**

***Irina Alexandrovna Voronina***
*Doctor of Science (Med.), Senior Scientist, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia, E-mail: IVoronina@nsi.ru*

***Elena Michailovna Troshina***
*PhD (Biol.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,*
*E-mail: ETroshina@nsi.ru*

***Olga Borisovna Sazonova***
*PhD (Med.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,*
*E-mail: OSazonova@nsi.ru*

**Секция 8. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ: НЕЙРОФИЗИОЛОГИЯ, НЕВРОЛОГИЯ, НЕЙРОХИРУРГИЯ, НЕЙРОХИМИЯ И НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ**


***Павел Львович Калинин***
*Д.м.н., профессор, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: PKalinin@nsi.ru*

***Алексей Николаевич Шкарубо***
*Д.м.н., профессор, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: AShkarubo@nsi.ru*

***Максим Александрович Кутин***
*К.м.н., с.н.с, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: Kutin @nsi.ru*

***Дмитрий Владиславович Фомичев***
*К.м.н., с.н.с. ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: DFomicev @nsi.ru*

***Олег Ильдарович Шарипов***
*К.м.н., врач, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: OSharipov@nsi.ru*

***Дмитрий Николаевич Андреев***
*К.м.н., врач, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: Dandreev@nsi.ru*

***Илья Валерьевич Чернов***
*К.м.н., врач, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: IChernov@nsi.ru*

***Артем Дмитриевич Донской***
*К.м.н., врач, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: ADonskoj@nsi.ru*

***Людмила Игоревна Астафьева***
*Д.м.н., профессор, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: Last@nsi.ru*

***Ирина Сергеевна Клочкова***
*Врач, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: IKloCHkova@nsi.ru*

***Юлия Геннадьевна Сиднева,***
*К.м.н., врач, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия Эл. почта: ISidneva@nsi.ru*

***Владислав Вадимович Иванов***
*Врач, ФГАУ «НМИЦ НХ им.ак.Н.Н.Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия*
*Эл. почта: VIvanov@nsi.ru*

***Pavel Lvovich Kalinin***
*Doctor of Science (Med.), Senior Scientist, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow,*
*E-mail: PKalinin@nsi.ru*

***Aleksey Nikolaevich Schkarubo***
*Doctor of Science (Med.), Senior Scientist, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow,*
*E-mail:AShkarubo@nsi.ru*

***Maksim Aleksanrovich Kutin***
*PhD (Med.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,*
***E-mail:****Kutin@nsi.ru*

***Dmitriy Vladislavovich Fomichev***
*PhD (Med.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,*
***E-mail:*** *DFomicev @nsi.ru*

***Oleg Ildarovich Scharipov***
*PhD (Med.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,*
***E-mail:*** *OSharipov@nsi.ru*

***Dmitriy Nikolaevich Andreev***
*PhD (Med.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,*
***E-mail:*** *Dandreev@nsi.ru*

***Ilja Valerievich Chernov***
*PhD (Med.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,*
***E-mail:*** *IChernov@nsi.ru*

***Artem Dmitrievich Donskoy***
*PhD (Med.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,*
***E-mail:*** *ADonskoj@nsi.ru*

***Ljudmila Igorevna Astafieva***
*Doctor of Science (Med.), Senior Scientist, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow,*
***E-mail:*** *Last@nsi.ru*

***Irina Sergeevna Klochkova***
*Doctor, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,****E-mail:*** *IKloCHkova@nsi.ru*

***Julia Gennadievna Sidneva***
*PhD (Med.), Leading Researcher, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,****E-mail:*** *ISidneva@nsi.ru*

***Vladislav Vadimovich Ivanov***
*Doctor, Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia,****E-mail:*** *VIvanov@nsi.ru*