



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

материалы Международной конференции

NT + M&Ec`2020

(Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2020 года)

ВЕСЕННЯЯ СЕССИЯ

ISBN 978-5-6044060-0-7



9 785604 406007

Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы
Международной конференции NT + M&Ec`2020 (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2020
г.). 2020. Весенняя сессия. 124 с.

ISBN 978-5-6044060-0-7

ПРЕЗИДЕНТ КОНФЕРЕНЦИИ

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

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОРГКОМИТЕТ

Председатель – Е.Л. Глориозов

Сопредседатели:

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

Члены Оргкомитета

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

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

Фамилия И.О. Название статьи // Информационные технологии в медицине, биологии,
фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT +
M&Ec`2020 (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2020г.). 2020. Весенняя сессия. С. XX–XX.
– ISBN 978-5-6044060-0-7.

СЕКЦИЯ 1. МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

- ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА АНОМАЛИЙ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ У ДЕТЕЙ, СВЯЗАННЫХ С ДИСФУНКЦИЕЙ ЯЗЫКА 5
Бадеева Е.А., Арутюнов Д.И., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Хасанишина Н.А., Славкин И.Е.
- МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОПТИКО-МЕХАНИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЯ ДАВЛЕНИЯ АТТЕНУАТОРНО-ОТРАЖАТЕЛЬНОГО ТИПА 10
Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Хасанишина Н.А., Серебряков Д.И., Полякова Е.А.
- ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЧАТ-БОТА ПРИ ЛЕЧЕНИИ АНОМАЛИЙ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ 16
Зобенко А.В., Васильев Ю.А.
- АНАЛИЗ СИСТЕМ ДОСТАВКИ СО2 ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ 20
Кортунов В.Н., Дмитриев А.К., Коновалов А.Н., Ульянов В.А.
- КОНСТРУКЦИЯ И КИНЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РОБОТИЗИРОВАННОГО КРЕСЛА ДЛЯ ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ 24
Черных А.Н.

СЕКЦИЯ 2. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ

- ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И РЕАБИЛИТАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДВОЙНЫХ ЗАДАЧ ПРИ ТРАВМЕ МОЗГА 33
Жаворонкова Л.А., Максакова О.А., Кушнир Е.М., Скорятина И.Г.

СЕКЦИЯ 3. ГЕНОМИКА. ГЕНЫ И БОЛЕЗНИ

- ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ 37
Эрдман В.В., Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Тимашева Я.Р., Данилко К.В., Матуа А.З., Викторова Т.В.

СЕКЦИЯ 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

- ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ 41
Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В.
- ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ КЛУБОЧКОВОЙ ЗОНЫ В УСЛОВИЯХ НЕПРЕРЫВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ 46
Обернихин С.С., Яглова Н.В., Яглов В.В., Назимова С.В.
- РЕГУЛИРОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕТЧАТОЙ ЗОНЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ РАЗВИТИИ ОРГАНИЗМА В УСЛОВИЯХ НИЗКОДОЗОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ДДТ 49
Назимова С.В., Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Яглов В.В.
- ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КАТЕХОЛАМИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ СТРУКТУР К ДИСРАПТОРНОМУ ДЕЙСТВИЮ ДДТ 53
Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В., Цомартова Д.А.
- УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ НА РАЗВИВАЮЩИЙСЯ ОРГАНИЗМ 58
Яглов В.В., Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Тимохина Е.П.
- АКТИВАЦИЯ КАНОНИЧЕСКОГО WNT-СИГНАЛИНГА В РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ УЧАСТКАХ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ 61
Цомартова Д.А., Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В.

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ТИМОЦИТОВ В ПУБЕРТАТНОМ ВОЗРАСТЕ У КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ДДТ <i>Цомартова Э.С., Яглова Н.В., Обернихин С.С.</i>	65
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОФИЛАКТИКИ И РЕАБИЛИТАЦИИ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ <i>Черкасов А.Д., Петрова Е.Н.</i>	68
ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ РАЗВИТИЯ ЛИЦА У ДЕТЕЙ КРУПНОГО РЕГИОНА РОССИИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ <i>Арутюнов А.В., Волобуев В.В., Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А.</i>	73
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОСЕРЕБРА ДЛЯ ОБРАБОТКИ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА <i>Мальшико В.В., Елкина А.А.</i>	76
АППАРАТ ЛОКАЛЬНОЙ АБДОМИНАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ <i>Васильков В.Г., Сафронов А.И., Осинькин Д.В.</i>	80
СЕКЦИЯ 5. ГЕМОГЛОБИНЫ, КРОВЬ, ЖЕЛЕЗО И СТРЕСС	
ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ТИОЛОВЫЙ СТАТУС КЛЕТОК ЛИНИИ САСО-2 В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА <i>Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Ерохина П.Д., Черных И.В., Якушева Е.Н.</i>	83
ТИОЛЫ ГЕМОГЛОБИНА: БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И РЕГУЛЯЦИЯ <i>Космачевская О.В., Насыбуллина Э.Н., Новикова Н.Н., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф.</i>	88
ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК, ИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ И МАГНИТНЫЕ ПОЛЯ <i>Текуцкая Е.Е., Рябова И.С.</i>	93
СЕКЦИЯ 6. ОКСИД АЗОТА И ПРОДУКТЫ ЕГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ	
ЦИКЛЫ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В ОРГАНИЗМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ <i>Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Сукманский О.И.</i>	99
АУТОИММУННЫЙ ОТВЕТ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ОКСИД АЗОТА ПРИ ЭПИЛЕПСИИ И ЧЕРЕПНОМОЗГОВОЙ ТРАВМЕ <i>Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Глоба О.В., Карасева О.В., Реутов В.П., Игнатъева Г.А., Афанасьева С.А., Овчаренко Д. С., Хунтеев Г.А., Рошаль Л.М., Пинелис В.Г.</i>	109
СЕКЦИЯ 7. ПРОБЛЕМЫ ФАРМАКОЛОГИИ	
ДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ТРЁХМЕРНОСТЬ СТРУКТУР КАРДИОМИОЦИТОВ <i>Резников К.М., Колесниченко П.Д.</i>	115
СЕКЦИЯ 8. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ	
ОБЪЕКТИВНАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЫБЫ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ МЕТОДОМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ <i>Абрамова Л.С., Козин А.В., Сытова М.В.</i>	120

SECTION 1. MEDICAL PHYSICS

FIBER-OPTIC DIAGNOSTIC SYSTEM ANOMALIES OF THE MAXILLOFACIAL AREA IN CHILDREN ARE ASSOCIATED WITH DYSFUNCTION OF THE TONGUE <i>Badeeva E.A., Arutyunov D.I., Murashkina T.I., Vasiliev Yu.A., Khasanshina N.A., Slavkin I.E.</i>	5
MATHEMATICAL MODEL OF OPTICAL-MECHANICAL SYSTEM OF FIBER-OPTIC PRESSURE CONVERTER OF ATTENUATOR-REFLECTIVE TYPE <i>Badeeva E.A., Murashkina T.I., Khasanshina N.A., Serebryakov D.I., Polyakova E.A.</i>	10
PROSPECTS FOR THE USE OF CHAT-BOT IN THE TREATMENT OF ANOMALIES OF THE MAXILLOFACIAL REGION <i>Zobenko A.V., Vasiliev Yu.A.</i>	16
ANALYSIS OF CO ₂ DELIVERY SYSTEMS FOR LASER RADIATION <i>Kortunov V.N., Dmitriev A.K., Konovalov A.N., Ulyanov V.A.</i>	20
DESIGN AND KINEMATIC ANALYSIS OF A ROBOTIZED CHAIR FOR PROTON ADIATION THERAPY <i>Chernykh A.N.</i>	24

SECTION 2. CLINICAL NEUROSCIENCE

DIAGNOSTIC AND REHABILITATION OPPORTUNITIES OF DUAL-TASKS FOR BRAIN TRAUMA <i>Zhavoronkova L.A., Maksakova O.A., Kushnir E.M., Skorjatina I.G.</i>	33
---	----

SECTION 3. GENOMICS. GENES AND DISEASES

POLYMORPHISM OF ANTIOXIDANT DEFENSE GENES AND LIFESPAN <i>Erdman V.V., Nasibullin T.R., Tuktarova I.A., Timasheva Ya.R., Danilko K.V., Matua A.Z., Viktorova T.V.</i>	37
--	----

SECTION 4. EXPERIMENTAL BIOLOGY AND CLINICAL MEDICINE

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF ADRENAL CORTEX POSTNATAL DEVELOPMENT AND FUNCTION <i>Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V.</i>	41
TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF RAT ADRENAL ZONA GLOMERULOSA POSTNATAL DEVELOPMENT EXPOSED TO LOW DOSES OF DDT <i>Obernikhin S.S., Yaglova N.V., Yaglov V.V., Nazimova S.V.</i>	46
REGULATION OF ADRENAL RETICULARIS CELL'S PROLIFERATION IN ORGANISM DEVELOPMENTALLY EXPOSED TO LOW DOSES OF DDT <i>Nazimova S.V., Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Obernikhin S.S., Yaglov V.V.</i>	49
SENSITIVITY OF CATHECOLAMINE-PRODUCING STRUCTURES TO DISRUPTIVE ACTION OF DDT <i>Timokhina E.P., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V., Tsomartova D.A.</i>	53
CHANGES IN FINE STRUCTURE OF ADRENAL CHROMAFFIN CELLS AFTER DEVELOPMENTAL EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTER DDT <i>Yaglov V.V., Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Timokhina E.P.</i>	58
ACTIVATION OF CANONICAL WNT-SIGNALING IN REGENERATING TISSUE OF ADRENAL CORTEX <i>Tsomartova D.A., Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V.</i>	61

ALTERED PROLIFERATION OF THYMIC LYMPHOCYTES IN PUBERTAL RATS EXPOSED TO LOW DOSES OF DDT <i>Tsomartova E.S., Yaglova N.V., Obernikhin S.S.</i>	65
PROSPECTS FOR PREVENTION AND REHABILITATION IN ARTERIAL HYPERTENSION <i>Cherkasov A., Petrova E.</i>	68
CONGENITAL MALFORMATIONS OF THE FACE IN CHILDREN OF A LARGE REGION OF RUSSIA: CURRENT STATE OF THE PROBLEM AND PROSPECTIVE DIAGNOSTIC SOLUTIONS <i>Arutyunov A.V., Volobuev V.V., Badeeva E.A., Murashkina T.I., Vasilyev Y.A.</i>	73
SILVER NANOPARTICLES USING FOR PROCESSING SUTURE MATERIAL <i>Malyshko V.V., Elkina A.A.</i>	76
LOCAL ABDOMINAL HYPOTHERMIA APPARATUS <i>Vasilkov V.G., Safronov A.I., Osinkin D.V.</i>	80
SECTION 5. HEMOGLOBINS, BLOOD, IRON AND STRESS	
SURVIVAL AND THIOL STATUS OF CELLS CACO-2 IN THE CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS <i>Abalenikhina Y.V., Shchulkin A.V., Erokhina P.D., Chernykh I.V., Yakusheva E.N.</i>	83
HEMOGLOBIN THIOLS: BIOLOGICAL SIGNIFICANCE AND REGULATION <i>Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Novikova N.N., Shumaev K.B., Topunov A.F.</i>	88
OXIDATIVE DAMAGE TO DNA, IONIZING RADIATION AND MAGNETIC FIELDS <i>Tekutskaya E.E., Raybova I.S.</i>	93
SECTION 6. NITRIC OXIDE AND PRODUCTS OF ITS METABOLISM IN BIOLOGICAL SYSTEMS	
GAS TRANSMITTER CYCLES IN THE MAMMAL ORGANISM <i>Reutov V.P., Sorokina E.G., Sukmansky O.I.</i>	99
AUTOIMMUNE RESPONSE OF GLUTAMATE RECEPTORS AND NITRIC OXIDE IN EPILEPSY AND TRAUMATIC BRAIN INJURY <i>Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Globa O.V., Karaseva O.V., Reutov V.P., Ignatieva G.A., Afanasieva S.A., Ovcharenko D.S., Hunteev G.A., Roshal L.M., Pinelis V.G.</i>	109
SECTION 7. PROBLEMS OF PHARMACOLOGY	
THE EFFECT OF DRUGS ON THE THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF CARDIO-MYOCYTES <i>Reznikov K.M., Kolesnichenko P.D.</i>	115
SECTION 8. PROBLEMS, METHODS AND PRODUCTS OF MODERN BIOTECHNOLOGY	
OBJECTIVE ASSESSMENT OF FISH QUALITY IN THE STORAGE PROCESS USING NMR SPECTROSCOPY <i>Abramova L.S., Kozin A.V., Sytova M.V.</i>	120

УДК 62.93, 62-791.2
ГРНТИ 59.14, 59.31
DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.01

Е.А. Бадеева¹, Д.И. Арутюнов², Т.И. Мурашкина¹, Ю.А. Васильев²,
Н.А. Хасаншина¹, И.Е. Славкин¹
¹ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»
²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА АНОМАЛИЙ ЧЕ- ЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ У ДЕТЕЙ, СВЯЗАННЫХ С ДИСФУНКЦИЕЙ ЯЗЫКА

Предложена волоконно-оптическая диагностическая система на базе волоконно-оптических датчиков давления языка на небо изгибного и аттенуаторно-отражательного типов для использования в терапевтической стоматологии при диагностике различных отклонений в полости рта, вызванных врожденными расщелинами верхней губы и неба МКБ-10 (Q35, Q36, Q37) и другими сопутствующими аномалиям.

Ключевые слова: волоконно-оптическая диагностическая система, аномалия челюстно-лицевой области, волоконно-оптический датчик, давление, пациент, язык, небо, оптическое волокно, модуль сбора и преобразования информации

Е.А. Badeeva¹, D.I. Arutyunov², T.I. Murashkina¹, Yu. A. Vasiliev²,
N.A. Khasanшина¹, I.E. Slavkin¹
¹Penza state University
²Kuban state medical University

FIBER-OPTIC DIAGNOSTIC SYSTEM ANOMALIES OF THE MAXILLOFACIAL AREA IN CHILDREN ARE ASSOCIATED WITH DYSFUNCTION OF THE TONGUE

A fiber-optic diagnostic system based on fiber-optic sensors of the tongue pressure on the palate of the Flexural and attenuator-reflective types is proposed for use in therapeutic dentistry in the diagnosis of various abnormalities in the oral cavity caused by congenital clefts of the upper lip and palate of the ICD-10 (Q35, Q36, Q37) and other related anomalies.

Key words: fiber-optic diagnostic system, maxillofacial abnormality, fiber-optic sensor, pressure, patient, tongue, palate, optical fiber, information acquisition and conversion module

Введение. При врожденной аномалии верхней губы и неба МКБ-10 (Q35; Q36; Q37) у пациентов изменяется положение языка в полости рта [1]. Он смещается в глубину ротовой полости, его спинка приподнимается к краям расщелины неба, а кончик не принимает участия в формировании звуков. Возникает гиперфункция с гипертрофией языка в задних отделах, функционально же кончик его, наоборот, понижен. В полости рта – язык оказывает давление на окружающие ткани, так как является сильнейшим мышечным органом полости рта. Под влиянием давления языка при наличии у ребенка врожденного несращения неба, нарушается сосание (кормление), дыхание и звукопроизношение и присоединяются сопутствующая патология. Язык при расщелине своей спинкой оказывает давление на небо, тем самым раздвигает нефиксированные сегменты, что неблагоприятно для хирургического этапа реабилитации, так как для закрытия дефекта необходимо больше мягких тканей при условии их дефицита и ограниченного пространства (полости рта). Это обстоятельство затрудняет работу хирурга. В запущенных случаях для закрытия дефекта не хватает местных тканей, следовательно, выполняется закрытие дефектов поэтапно по частям. Но в этих случаях возможны осложнения, например, присоединение инфекции, расхождения швов по разным причинам и др.

На начальной стадии диагностики заболевания, связанного с врожденными расщелинами верхней губы и неба и другими аномалиями ротовой полости, необходимы соответствующие медицинские технические средства диагностики. В настоящее время для измерения силы (давления) мышц языка используют методы диагностики, реализуемые с помощью электрических средств измерений [2, 3]. Например, известен способ измерения силы давления мышц языка, когда в полость рта пациента вводят два и более датчика усилия электрического типа [4]. Кроме того, не исключается электромагнитное воздействие со стороны средства измерений на тело пациента, что снижает достоверность результатов измерений в процессе диагностирования. Поэтому представляется целесообразным создание системы диагностики, в которой исключены вышеперечисленные недостатки, включающей средства измерений на новых высокотехнологичных принципах преобразования измерительной информации [5].

Цель работы – повышение достоверности и безопасности процедуры диагностирования различных отклонений в полости рта, вызванных врожденными расщелинами верхней губы и неба и другими сопутствующими патологиями у детей и взрослых с помощью волоконно-оптических средств измерений.

Материалы и методы. Отличительной особенностью предлагаемой системы диагностики давления языка на небо, в которой исключаются перечисленные недостатки, является применение волоконно-оптических датчиков давления (ВОДД) или с закрытым оптическим каналом, когда под действием давления языка пациента оптическое волокно испытывает изгибные воздействия, или с открытым оптическим каналом, когда под действием давления языка изменяется положение оптико-модулирующего элемента относительно рабочих торцов оптических волокон [6]. В обоих случаях изменяется интенсивность оптического сигнала, пропорционально давлению языка на небо.

Результаты исследований. ВОДД изгибного типа содержит пластины 2 и 3, между которыми расположено оптическое волокно 4, подстыкованное одним торцом к источнику излучения, а другим – к приемнику излучения (рисунок 1, а)) [6, 7]. Донышко верхней пластины, выполненное в виде перевернутого стакана, прогибается вверх под действием давления языка. Датчик устанавливают в полость рта пациента таким образом, чтобы донышко 8 верхней пластины 2 соприкасалась с небом пациента (рисунок 1, б)).

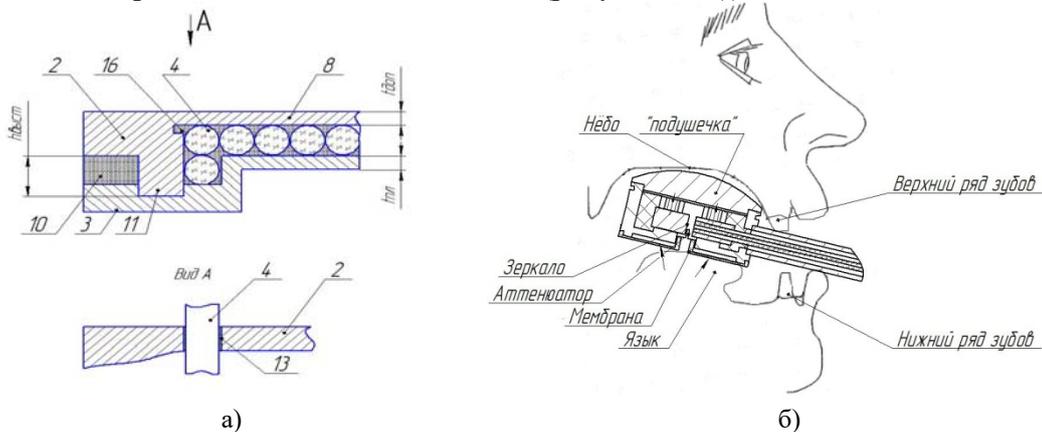


Рисунок 1 – ВОДД

а) фрагмент конструкции разрабатываемого датчика; б) установка датчика в полости рта пациента

ВОДД изгибного типа работает следующим образом. Язык пациента с усилием давит на нижнюю пластину 3. Она прогибается в сторону неба 12. При этом оптические волокна 4 испытывают деформацию. Световой поток, прошедший от источника излучения в зону измерения, изменяет при деформации свою интенсивность. При этом изменяется уровень сигнала на приемнике излучения. ВОДД аттенюаторно-отражательного типа соединяет в себе преимущества волоконно-оптических преобразователей микроперемещений аттенюаторного и отражательного типов: с одной стороны - высокая чувствительность преобразования оптических сигналов, а с другой стороны - простота конструктивно-технологического исполнения и малые массогабаритные размеры [8, 9]. В ВОП с предельными аттенюаторами, перемещающимися в соответствии с изменением измеряемого параметра, модуляция оптического сигнала осуществляется за счет перемещения границы «непрозрачный экран – воздух» аттенюатора в направлении Z относительно торцов ПОВ и ООВ, расположенных с разных сторон относительно аттенюатора [10, 11]. При давлении языка на воспринимающий элемент ВОПД, размещенного в полости рта, аттенюатор перемещается между торцами рабочих отводящих оптических волокон ООВ_р и неподвижной зеркальной поверхностью.

Датчик содержит подводящее оптическое волокно (ПОВ), отводящее рабочее (ООВ_р) и отводящее компенсационное (ООВ_к) оптические волокна, общий торец которых закреплен во втулке на некотором расстоянии от зеркальной поверхности. Между рабочими оптическими волокнами и зеркальной поверхностью оптической оси ВОПД перемещается аттенюатор, который является внутренним торцом воспринимающего элемента, контактирующего с

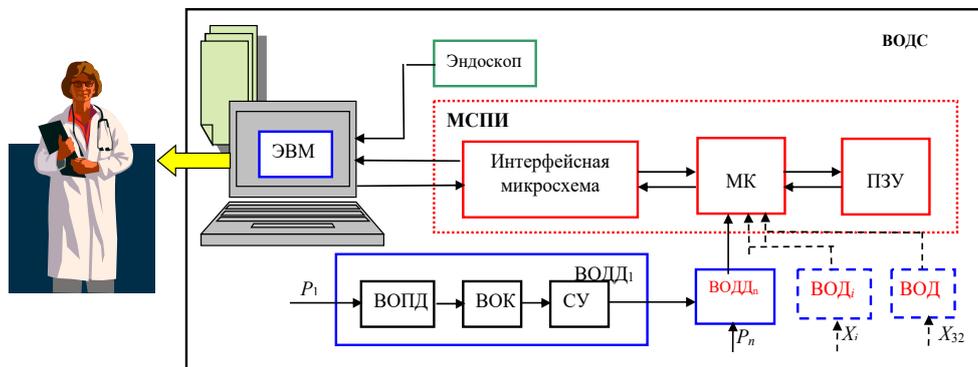
языком. Световой поток Φ_0 , сформированный источником излучения, по ПОВ передается в зону измерений в направлении зеркальной поверхности. Отраженные световые потоки $\Phi_P=f(P)$ и $\Phi_K=const$ по ООВ_Р и ООВ_К поступают на рабочий и компенсационный приемники излучения соответственно. Приемники излучения преобразуют оптические сигналы $\Phi_P(P)$ и Φ_K в электрические сигналы $I_P(P)$ и $I_K(X=const)$ соответственно. Электрические сигналы $I_P(P)$ и I_K с выхода рабочего (РПИ) и компенсационного (КПИ) приемников излучения соответственно поступают на вход модуля сбора и преобразования информации (МСПИ). Для улучшения метрологических характеристик можно с помощью МСПИ осуществить или логометрическое или амплитудно-фазовое преобразование сигналов.

При логометрическом преобразовании формируется отношение разности сигналов на выходе рабочего и компенсационного каналов к их сумме $[I_P(P)-I_K]/[I_P(P)+I_K]$ [6]. Наличие двух гармонических сигналов на выходе ВОПД позволяет также реализовать амплитудно-фазовое преобразование сигналов $U_P(P)$ и U_K [12]. За счет разнополярного питания рабочих и компенсационных приемников излучения сигнал U_K первоначально сдвинут относительно сигнала $U_P(P)$ на угол 180 градусов. Путем подбора элементов фазосдвигающей цепи создается постоянный сдвиг фаз $90 < \varphi_0 < 180^\circ$ между сигналами $U_P(P)$ и U_K . Сигналы $U_P(P)$ и U_K суммируются. Суммарный сигнал $U_\Sigma(X)$ поступает на один из входов фазометра, на второй вход которого поступает опорный сигнал U_K . Зависимость фазы φ суммарного сигнала $U_\Sigma(P)$ от значения давления является выходным сигналом ВОДД:

$$\varphi = \arctg \frac{\sin \varphi_{12}}{\cos \varphi_{12} + \frac{U_K}{U_P(P)}} \quad (1)$$

то есть $\varphi=f(P)$. Так как в выражении (1) сигналы $U_P(P)$ и U_K находятся в отношении, то пропорциональные изменения этих сигналов, обусловленные изменением параметров источников и приемников излучения, напряжения питания, изгибами оптических волокон и т.п., не влияют на результаты измерений.

Блок-схема разрабатываемой волоконно-оптической диагностической системы (ВОДС) на базе ВОДД приведена на рисунке 2. Входные величины $P_1, \dots, P_n, \dots, X_{32}$ поступают соответственно на входы ВОДД₁,... ВОДД_n,...ВОДД₃₂, которые, в свою очередь, состоят соответственно из волоконно-оптических преобразователей давления ВОПД₁, ...ВОПД_i, волоконно-оптических кабелей (ВОК) ВОК₁, ВОК₂,...ВОК₃₂, согласующих устройств СУ₁, СУ₂,...СУ₃₂. ВОПД предназначен для преобразования измеряемого давления в изменение интенсивности светового потока.



ВОДС - волоконно-оптическая диагностическая система; $P_1 \dots P_n$ - значения измеряемого давления; ВОДД₁...ВОДД_n - волоконно-оптические датчики давления; ВОД₁... ВОД₃₂ - волоконно-оптические датчики других физических величин (например, температуры, артериального давления, уровня жидкости и др.); ВОПД - волоконно-оптические преобразователи давления; ВОК - волоконно-оптические кабели; СУ - согласующие устройства; МСПИ - модуль сбора и преобразования информации, МК - микроконтроллер, ПЗУ - программное запоминающее устройство, Э - эндоскоп, ПО - разрабатываемое программное обеспечение, БД - база данных, ЭВМ - электронно-вычислительная машина

Рисунок 2. Структурная схема ВОДС на базе волоконно-оптических датчиков давления изгибаемого или аттенуаторно-отражательного типа

Волоконно-оптический кабель (ВОК) необходим для передачи светового потока от источника излучения в зону измерения и обратно к приемникам излучения. Его длина может быть в пределах от 2 до 20 м. Согласующие устройства включают один ИК-светодиод и два приемника излучения (по одному на рабочий и компенсационный каналы), согласованные по спектру со светодиодами и предназначенные для электрооптического и фотоэлектрического преобразования сигналов ВОДД соответственно. ВОДС позволяет в дальнейшем подключать датчики других физических величин X (например, температуры, артериального давления, уровня жидкости и др.), на схеме они обозначены ВОД. Общее количество датчиков, подключаемых к системе, может достигать 32. МСПИ состоит из микроконтроллера, программного запоминающего устройства, интерфейсной микросхемы.

В качестве вычислительного устройства используется 32-х разрядный микроконтроллер 1986VE91T. Микроконтроллеры семейства 1986 имеют наиболее богатый набор периферийных устройств (ПУ): контроллер DMA с функциями передачи «периферия-память», «память-память»; два контроллера CAN интерфейса; контроллер USB интерфейса с функциями работы Device и Host; контроллеры интерфейсов UART, SPI, I2C; три 16-разрядных таймер-счетчика с функциями ШИМ и регистрации событий; до 96 пользовательских линий ввода-вывода. Системная шина и шина данных ядра подключаются к внешним (относительно ядра) блокам микроконтроллера через матрицу шин. Для разрешения конфликтов при запросе на доступ к шине используется арбитраж. Матрица шин образует несколько параллельных соединений между шинами ядра Cortex и другими внешними шинными "мастерами", такими как каналы DMA, статическое ОЗУ и устройства ввода/вывода. Если два шинных "мастера" (например, ядро Cortex и канал DMA) предпринимают попытку доступа к одному и тому же устройству ввода/вывода, то вступит в действие внутренний арбитр, который разрешит конфликт, предоставив доступ к шине тому, кто имеет наивысший приоритет. Архитектура системы памяти за счет матрицы системных шин позволяет минимизировать возможные конфликты при работе системы и улучшить общую производительность.

Механизм, использующийся для непосредственного обмена данными между устройством и оперативной памятью микроконтроллера - контроллер DMA, позволяет ускорить обмен информацией между ОЗУ и периферией без участия процессорного ядра. В качестве ПЗУ используется микросхема 1636PP2У с электрическим перепрограммированием, которая представляет собой электрически стираемое и перепрограммируемое постоянное запоминающее устройство Flash-типа с информационной емкостью 16 Мбит и организацией (2Mx8) бит. Данная микросхема служит для хранения измерительной информации и подключается к микроконтроллеру по шине обмена данными. Связь между ВОДД и ЭВМ осуществляется через интерфейс RS-485. Микропроцессор, используемый в МСПИ для обработки измерительной информации, позволяет обеспечить выполнение следующих функций: обработку и хранение данных, генерацию импульса контроля исправности датчика (самотестирование), аппаратную и программную фильтрацию входного сигнала с целью уменьшения помех.

Основной функционал ВОДС включает в себя: восприятие физической величины – давления, преобразование-усиление выходного сигнала ВОДД, линеаризацию, фильтрацию и расчёт значения выходной величины, температурную коррекцию, преобразование электрической величины на выходе с ВОДД в цифровой сигнал (код), визуализацию измерительного процесса на экране ЭВМ, формирование информационной базы измерений, сравнение значений давления со значениями, занесенными в базу данных, визуализацию информации, необходимой врачу для принятия решений о последующем лечении. Разрабатываемая ВОДС не будет требовать специальной подготовки врачей в части ее использования. От врача потребуются только с помощью эндоскопа правильно установить ВОДД в полости рта. Результаты измерений выводятся на экран ЭВМ. Также на экран ЭВМ выводятся рекомендации по дальнейшим врачебным действиям.

Заключение. Практическая значимость предлагаемой диагностической системы состоит в оснащении стоматологических отделений медицинских учреждений безопасными для здоровья пациентов, надежными, малогабаритными, высокоточными средствами диагности-

ки в полости рта при выявлении челюстно-лицевых патологий, вызванных врожденными расщелинами верхней губы и неба, а также другими аномалиями; повышении помехоустойчивости в условиях воздействия электромагнитных помех сопутствующих электроэнергетических установок, применяемых в медицинских учреждениях; обеспечении экологической безопасности пациентов, в первую очередь, детей. В данной работе новыми являются следующие положения и результаты: конструктивное исполнение и принцип действия ВОДД на небо для использования в терапевтической стоматологии; способ установки ВОПД аттенуаторно-отражательного типа в полости рта пациента; структурная схема и принцип действия ВОДС на базе ВОДД изгибного или аттенуаторно-отражательного типа; рекомендации по применению ВОДС в стоматологии позволит улучшить качество обслуживания маленьких пациентов на начальной стадии диагностики заболевания, связанного с врожденными расщелинами верхней губы и неба и другими аномалиями ротовой полости.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-38-20045

Литература

- 1 Виноградов Д. Постановка голоса. – М: Просвещение, 1997. 110 с.
- 2 Уракова Е.В. Морфофункциональная оценка языка и ее клиническое значение. Диссертация на соискание уч. степени канд. мед. наук. Специальность 14.00.21 - Стоматология. Казань. 1998. 131 с.
- 3 Ямашев И.Г., Матвеев Р.С. Язык: клинико-функциональные методы диагностики патологических состояний. – Чебоксары: АУ Чувашии ИУВ, 2012. С. 48.
- 4 Патент RU 2623309 Способ измерения силы давления мышц языка на сегменты смежных анатомических образований полости рта / Оpubл. 23.06.2017 <http://www.findpatent.ru/patent/262/2623309.html>
- 5 Волоконно-оптические приборы и системы: Научные разработки НТИЦ "Нанотехнологии волоконно-оптических систем" Пензенского государственного университета Ч. I / Т.И. Мурашкина, Е. А. Бадеева. – СПб.: Политехника, 2018. 187 с.
- 6 Волоконно-оптический датчик силы (давления) мышц языка / Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Ю.А. Васильев, Д.И. Серебряков, Т.Ю. Бростилова, Н.А. Хасаншина, Л.Ф. Терещенко // Модели, системы и сети в экономике, технике, природе и обществе. 2019. № 3. С. 83–93.
- 7 Заявка на полезную модель № 2019137248 от 19.11.2019. Волоконно-оптический датчик силы мышц языка – давления языка на небо и способ его сборки / Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Ю.А. Васильев, Д.И. Серебряков, А.В. Арутюнов, Л.Ф. Терещенко, Т.Ю. Бростилова, Н.А. Хасаншина.
- 8 К реализации дифференциального преобразования сигналов в волоконно-оптических преобразователях давления отражательного типа/Л.Н. Коломиец, Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина // Датчики и системы. 2007.№ 3.С. 26–28.
- 9 Бадеева Е.А. Научная концепция проектирования ВОДД с открытым оптическим каналом для ракетно-космической и авиационной техники // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Технические науки. 2016. № 4. С. 103–114.
- 10 Бадеева Е.А. ВОДД аттенуаторного типа для летательных аппаратов // Труды Междоу НТК «Методы и средства измерения в системах контроля и управления», 9-10 сентября 2002, Пенза: Изд-во Пенз. гос. ун-та, 2002. С.26–27.
- 11 ВОДД аттенуаторного типа для летательных аппаратов / Е.А. Бадеева, В.А. Мещеряков, Т.И. Мурашкина и [др.] // Датчики и системы. 2003. № 4. С. 11–14.
- 12 Обоснование возможности амплитудно-фазового преобразования сигналов в волоконно-оптических датчиках давления / Е.А. Бадеева, А.В. Мотин, И.Е. Славкин, Т.И. Мурашкина и др. // Приборы. 2017. №11 (209). С. 11–15.

Сведения об авторах

Елена Александровна Бадеева

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

Пензенский государственный университет

Пенза, Россия

Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru

Арменак Валерьевич Арутюнов

д.м.н., доцент
профессор кафедры мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф
Кубанский государственный медицинский университет

Краснодар, Россия

Эл. почта: armenak@mail.ru

Мурашкина Татьяна Ивановна

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

Пенза, Россия

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Юрий Анатольевич Васильев

ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины
Кубанский государственный медицинский университет

Краснодар, Россия

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Надежда Александровна Хасаншина

инженер-исследователь НТЦ «Нанотехнологии волоконно-оптических систем»
Пензенский государственный университет

Пенза, Россия

Эл. почта: nadin.gloria@mail.ru

Илья Евгеньевич Славкин

аспирант кафедры «Приборостроение»
Пензенский государственный университет

Пенза, Россия

Эл. почта: ilya-slavkin@yandex.ru

Information about authors

Elena Alexandrovna Badeeva

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

Penza state University

Penza, Russia

E-mail: badeeva_elena@mail.ru

Armenak Valerievich Arutyunov

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

Krasnodar, Russia

E-mail: armenak@mail.ru

Tatyana Ivanovna Murashkina

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

Penza, Russia

E-mail: timurashkina@mail.ru

Yuri Anatolyevich Vasiliev

assistant of the Department of public health, public health and history of medicine
Kuban state medical University

Krasnodar, Russia

E-mail: yurii-59@mail.ru

Nadezhda Alexandrovna Khasanshina

research engineer at STC "Nanotechnologies of fiber-optic systems"
Penza state University

Penza, Russia

E-mail: nadin.gloria@mail.ru

Ilya Evgenievich Slavkin

post-graduate student
Penza state University

Penza, Russia

E-mail: ilya-slavkin@yandex.ru

УДК 62.93, 62-791.2
ГРНТИ 59.14, 59.31
DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.02

Е.А. Бадеева¹, Т.И. Мурашкина¹, Н.А. Хасаншина¹,
Д.И. Серебряков², Е.А. Полякова²
¹ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»
²АО «НИИ физических измерений»

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОПТИКО-МЕХАНИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЯ ДАВЛЕНИЯ АТТЕНЮАТОРНО-ОТРАЖАТЕЛЬНОГО ТИПА

В статье предложена волоконно-оптическая диагностическая система на базе волоконно-оптических датчиков давления языка на небо аттенюаторно-отражательного типов для использования в терапевтической стоматологии при диагностике различных отклонений в полости рта, вызванных врожденными расщелинами верхней губы и неба и другими сопутствующими аномалиями.

Ключевые слова: волоконно-оптический датчик, измерительный преобразователь, давление, рабочий и компенсационный канал, воспринимающий элемент, пациент, аномалия челюстно-лицевой области, язык, небо, оптическое волокно, модуль сбора и преобразования информации

MATHEMATICAL MODEL OF OPTICAL-MECHANICAL SYSTEM OF FIBER-OPTIC PRESSURE CONVERTER OF ATTENUATOR-REFLECTIVE TYPE

The article proposes a fiber-optic diagnostic system based on fiber-optic sensors of the tongue pressure on the palate of the attenuator-reflective type for use in therapeutic dentistry in the diagnosis of various abnormalities in the oral cavity caused by congenital cleavages of the upper lip and palate and other accompanying anomalies.

Key words: *fiber-optic sensor, measuring transducer, pressure, working and compensating channel, sensing element, patient, maxillofacial abnormality, tongue, palate, optical fiber, information acquisition and conversion module*

Введение. На начальной стадии диагностики заболевания, связанного с врожденными расщелинами верхней губы и неба и другими аномалиями ротовой полости, необходимы соответствующие медицинские технические средства диагностики. В работе [1] для повышения достоверности и безопасности процедуры диагностирования различных отклонений в полости рта предложена волоконно-оптическая диагностическая система на базе волоконно-оптического датчика давления (ВОДД) изгибного типа с закрытым оптическим каналом, в котором под действием давления языка пациента оптическое волокно испытывает изгибные воздействия, при этом изменяется интенсивность оптического сигнала, пропорционально давлению языка на небо. Но при измерении низких значений давления языка, например у ребенка, чувствительности преобразования данного датчика может быть недостаточно.

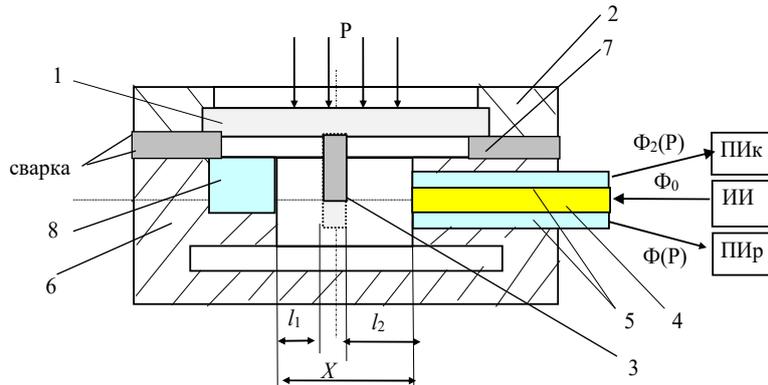
В волоконно-оптических измерительных преобразователях давления (ВОПД) с предельными аттенюаторами, перемещающимися в соответствии с изменением измеряемого параметра, модуляция оптического сигнала осуществляется за счет перемещения границы «непрозрачный экран – воздух» аттенюатора в направлении Z относительно торцов ПОВ и ООВ, расположенных с разных сторон относительно аттенюатора [2 – 4]. Такое расположение требует крутого изгиба оптического волокна в корпусе ВОПД, что ведет, во-первых, к увеличению габаритов датчика, а, во-вторых, снижает уровень сигнала и, соответственно, снижает чувствительность преобразования оптических сигналов в зоне измерения.

В разрабатываемом ВОПД процедура модуляции интенсивности светового потока с помощью предельного аттенюатора, будет отличаться тем, что аттенюатор будет перемещаться между торцами оптических волокон и отражающей поверхностью (см. рисунок 1), тем самым будут исключены перечисленные недостатки. Кроме того, упростится процедура юстировки микро-оптико-механической системы датчика и в целом процесс его сборки. **Цель работы** – повышение чувствительности преобразования оптических сигналов в ВОПД для повышения достоверности процедуры диагностирования различных отклонений в полости рта, вызванных врожденными расщелинами верхней губы и неба и другими сопутствующими патологиями у детей.

Материалы и методы. Предлагаемый ВОПД аттенюаторно-отражательного типа соединяет в себе преимущества волоконно-оптических преобразователей микроперемещений аттенюаторного и отражательного типов: с одной стороны - высокая чувствительность преобразования оптических сигналов, а с другой стороны - простота конструктивно-технологического исполнения и малые массогабаритные размеры. Для снижения большинства погрешностей ВОДД аттенюаторно-отражательного типа предложено ввести в конструкцию датчика компенсационный канал. Для улучшения метрологических характеристик с помощью модуля сбора и преобразования информации (МСПИ) осуществляется логометрическое преобразование сигналов: формируется отношение разности сигналов на выходе рабочего и компенсационного каналов ВОДД к их сумме $[I_P(P) - I_K] / [I_P(P) + I_K]$ [5]. В этом случае наблюдается удвоение чувствительности преобразования, линеаризация выходной зависимости, снижается влияние на точность измерения неинформативных изгибов волоконно-

оптического кабеля, изменения мощности излучения источника излучения и чувствительности приемников излучения. Предложено путем математического моделирования определять конструктивные параметры ВОПД аттенюаторно-отражательного типа, обеспечивающие повышение чувствительности преобразования оптических сигналов.

Результаты исследований. На рисунке 1 приведена упрощенная конструктивная схема разрабатываемого ВОПД аттенюаторно-отражательного типа с компенсационным каналом, разработанного авторами. Датчик содержит подводящее оптическое волокно (ПОВ) 4, отводящее рабочее (ООВ_р) и отводящее компенсационное (ООВ_к) оптические волокна 5, общий торец которых закреплен на расстоянии X_0 от неподвижной зеркальной поверхности 8. Между рабочими оптическими волокнами и зеркальной поверхностью оптической оси ВОПД перемещается аттенюатор 3. С нем контактирует воспринимающий элемент 1. При давлении языка на воспринимающий элемент 1 ВОПД, размещенного в полости рта, аттенюатор 3, который на нем закреплен, перемещается перпендикулярно между торцами рабочих отводящих оптических волокон ООВ_р и неподвижной зеркальной поверхностью.



1 - чувствительный элемент (мембрана); 2 - крышка; 3 -отражательный аттенюатор;4 - подводящее оптическое волокно; 5- отводящие оптические волокна; 6 - корпус; 7 - прокладка; 8 – зеркало; ИИ - источник излучения; ПИр, ПИк - приемники излучения рабочего и компенсационного измерительных каналов

Рисунок 1 - Упрощенная конструкция ВОПД аттенюаторно-отражательного типа

Световой поток Φ_0 , сформированный источником излучения, по ПОВ 4 передается в зону измерений в направлении зеркальной поверхности 8. Отраженные световые потоки $\Phi_P=f(P)$ и $\Phi_K=const$ по ООВ_р и ООВ_к поступают на рабочий ПИр и компенсационный ПИк приемники излучения соответственно. Приемники излучения преобразуют оптические сигналы $\Phi_P(P)$ и Φ_K в электрические сигналы $I_P(P)$ и $I_K(X=const)$ соответственно. Электрические сигналы $I_P(P)$ и I_K с выхода ПИр и ПИк соответственно поступают на вход модуля сбора и преобразования информации (МСПИ).

При перемещении непрозрачного аттенюатора под действием измеряемой физической величины в направлении Z относительно торцов ПОВ и ООВ, расположенных в одной плоскости, лучи света от подводящего оптического волокна ПОВ проходят в прямом направлении расстояние X до зеркала 8 и расстояние X_0 в обратном направлении до ООВ под апертурным углом Θ_{NA} к оптической оси волокна [6, 7]. При этом в плоскости приемного торца ООВ наблюдается освещенная кольцевая зона S_{A-A} шириной $h=2r_c$, внешний и внутренний радиусы которой определяются следующими выражениями: $R_{ВНУТ}=2(Xtg\Theta_{NA} - r_c)$, $R_{ВНЕШ}=2Xtg\Theta_{NA}$.

В нейтральном положении при $Z=0$ аттенюатор установлен относительно общего торца оптических волокон таким образом, чтобы освещенная кольцевая зона S_{A-A} , полученная отражением от неподвижной зеркальной поверхности, расположенной в непосредственной близости от аттенюатора, полностью перекрывала поверхность $S_{ООВ}$ отводящего оптического волокна. При перемещении аттенюатора в направлении Z на $Z=Z_i$ изменяется освещенная отраженным световым потоком площадь $S_{ПР}$ приемного торца ООВ, т.е. $S_{ПР}=f(Z)$.

Функция преобразования $\Phi(Z)$ имеет вид: $\Phi(Z)=K(Z)\Phi_0$, где $K(Z)$ – коэффициент передачи тракта “ПОВ – зеркальная поверхность - ООВ”; Φ_0 – световой поток, введенный в зону

измерения. Очевидно, что при $\Phi_0 = \text{const}$ поведение функции преобразования $\Phi(Z)$ будет оцениваться по поведению функции передачи оптического тракта, то есть коэффициента $K(Z)$, который определяется выражением (1):

$$K(Z) = \rho \frac{\sum_{i=1}^k S_{\text{ПП}}}{S_{\text{А-А}}}, \quad (1)$$

где ρ – коэффициент отражения зеркальной поверхности; $\sum_{i=1}^k S_{\text{ПП}}$ – суммарная площадь приемных торцов ООВ, освещенная отраженным от зеркальной поверхности световым потоком; $i=1, 2 \dots k$ – количество ООВ; $S_{\text{А-А}} = 4\pi r_c (2X_0 \text{tg} \Theta_{\text{НА}} - r_c)$, где $X_0 = D/2 \text{tg} \Theta_{\text{НА}}$. При $D = d_{\text{ОВ}}$, $X_0 = d_{\text{ОВ}}/2 \text{tg} \Theta_{\text{НА}}$, тогда $S_{\text{А-А}} = 4\pi r_c (d_{\text{ОВ}} - r_c)$.

$$\text{В соответствии с рисунком 2 } S_{\text{ПП}} = \frac{r_c^2}{2} \left(\frac{\pi \alpha}{180} - \sin \alpha \right).$$

$$\text{Но } \sin \frac{\alpha}{2} = \frac{a}{2r_c}, \text{ соответственно } \alpha = 2 \arcsin \frac{a}{2r_c},$$

$$\text{где } \frac{a}{2} = \sqrt{r_c^2 - (r_c - Z_i)^2} = \sqrt{2r_c Z_i - Z_i^2},$$

тогда

$$S_{\text{ПП}} = \frac{r_c^2}{2} \left[\frac{\pi}{180} 2 \arcsin \left(\frac{\sqrt{2r_c Z_i - Z_i^2}}{r_c} \right) - \sin \left(2 \arcsin \left(\frac{\sqrt{2r_c Z_i - Z_i^2}}{r_c} \right) \right) \right]. \quad (2)$$

Коэффициент преобразования $K(Z)$ определится выражением:

$$K(Z) = \frac{\rho}{4\pi r_c (2X_0 \text{tg} \Theta_{\text{НА}} - r_c)} \times \times \sum_{i=1}^k \frac{r_c^2}{2} \left[\frac{\pi}{180} 2 \arcsin \left(\frac{\sqrt{2r_c Z_i - Z_i^2}}{r_c} \right) - \sin \left(2 \arcsin \left(\frac{\sqrt{2r_c Z_i - Z_i^2}}{r_c} \right) \right) \right]. \quad (3)$$

Коэффициент преобразования $K(Z)$ зависит от расстояния X_0 от торца ПОВ до зеркальной отражающей поверхности и от расстояния D между оптическими осями ПОВ и ООВ. Изменяя параметры D , X_0 можно целенаправленно управлять поведением функции $K=f(Z)$. Управление конструктивными параметрами ВОПД в данном случае обеспечивает максимальную чувствительность преобразования при максимально достижимых линейности функции преобразования и глубине модуляции оптического сигнала. С учетом выражения (3) функция преобразования ВОПД будет иметь вид:

$$\Phi(Z) = \Phi_0 \frac{\rho}{4\pi r_c (2X_0 \text{tg} \Theta_{\text{НА}} - r_c)} \times \times \sum_{i=1}^k \frac{r_c^2}{2} \left[\frac{\pi}{180} 2 \arcsin \left(\frac{\sqrt{2r_c Z_i - Z_i^2}}{r_c} \right) - \sin \left(2 \arcsin \left(\frac{\sqrt{2r_c Z_i - Z_i^2}}{r_c} \right) \right) \right]. \quad (4)$$

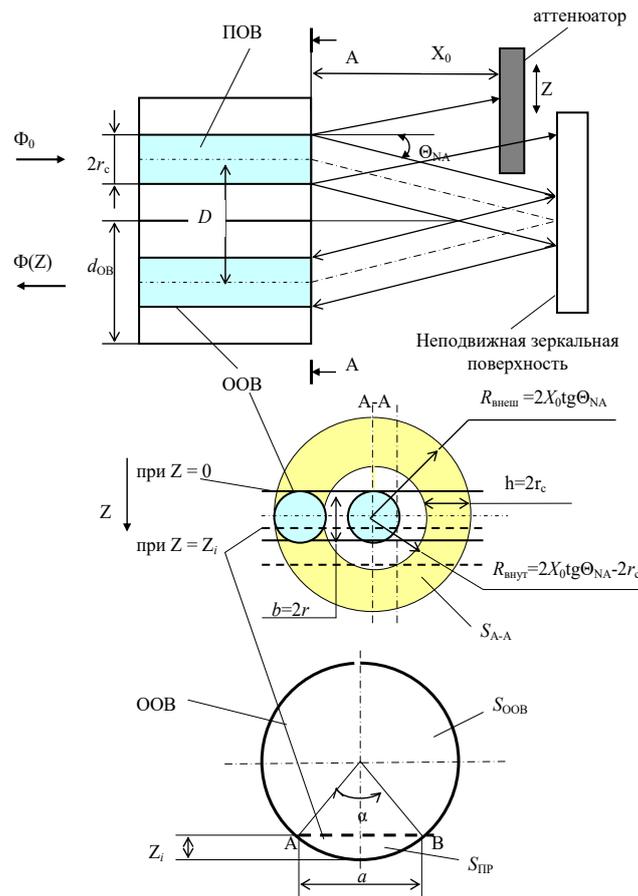


Рисунок 2 – Геометрические построения, поясняющие процесс модуляции интенсивности светового потока с помощью аттенюатора и зеркала

Анализ выражения (4) показывает: вид функции преобразования ВОПД аттенюаторно-отражательного типа с компенсационным каналом определяется следующими параметрами: радиусом сердцевины r_c , внешним диаметром d_{OB} , апертурным углом Θ_{NA} оптического волокна (т.е. типом используемого ОВ); количеством k ООВ; расстоянием D между оптическими осями ПОВ и ООВ; начальным расстоянием X между торцом оптических волокон и отражающей поверхностью.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: конструктивное исполнение и принцип действия ВОДД аттенюаторно-отражательного типа; геометрические построения, поясняющие процесс модуляции интенсивности светового потока с помощью аттенюатора и зеркала; функция преобразования оптической системы, определяющая конструктивные параметры ВОПД. Практическая значимость предлагаемой работы состоит в оснащении стоматологических отделений медицинских учреждений безопасными для здоровья пациентов, надежными, малогабаритными, высокоточными ВОДД, обеспечивающих повышении помехоустойчивости в условиях воздействия электромагнитных помех сопутствующих электроэнергетических установок, применяемых в медицинских учреждениях; обеспечении экологической безопасности пациентов, в первую очередь, детей.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-38-20045

Литература

1 Волоконно-оптический датчик силы (давления) мышц языка / Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Ю.А. Васильев, Д.И. Серебряков, Т.Ю. Бростилова, Н.А. Хасаншина, Л.Ф. Тер-

щенко // Модели, системы и сети в экономике, технике, природе и обществе. 2019. № 3. С. 83–93.

2 Бадеева Е.А. ВОДД аттенюаторного типа для летательных аппаратов // Труды Международной НТК «Методы и средства измерения в системах контроля и управления», 9-10 сентября 2002, Пенза: Изд-во Пенз. гос. ун-та, 2002. С. 26–27.

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

4 Бадеева Е.А. Обоснование конструктивного исполнения предельных аттенюаторов волоконно-оптических датчиков // Датчики и системы. 2003. № 7. С. 47–49.

5 Волоконно-оптические приборы и системы: Научные разработки НТЦ "Нанотехнологии волоконно-оптических систем" Пензенского государственного университета Ч. I / Т. И. Мурашкина, Е. А. Бадеева. СПб.: Политехника, 2018. 187 с.

6 Разработка теории распределения светового потока в оптической системе ВОП физических величин отражательного типа: Монография / Е.А. Бадеева, Л.Н. Коломиец, Н.П. Кривулин и [др.] / Под общ. ред. проф. Мурашкиной Т.И. –Пенза: ИИЦ ПГУ, 2008 С. 48–52. 102 с.

7 Конструирование ВОДД отражательного типа / Е.А. Бадеева, В.А. Мещеряков // Надежность и качество: Тр. Международ. симп. 2005. С. 377–380.

Сведения об авторах

Елена Александровна Бадеева

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

Пензенский государственный университет
Пенза, Россия

Эл. почта: badeeva_elen@mail.ru

Мурашкина Татьяна Ивановна

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

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Надежда Александровна Хасаншина

инженер-исследователь НТЦ «Нанотехнологии
волоконно-оптических систем»
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»
Пенза, Россия

Эл. почта: nadin.gloria@mail.ru

Серебряков Дмитрий Иванович

к. техн. наук
начальник технологической лаборатории
АО «НИИ физических измерений»
Пенза, Россия

Эл. почта: sdikoi@mail.ru

Полякова Екатерина Алексеевна

начальник отдела надежности
АО «НИИ физических измерений»
Пенза, Россия

Эл. почта: sdikoi@mail.ru

Information about authors

Elena Alexandrovna Badeeva

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

Penza state University
Penza, Russia

E-mail: badeeva_elen@mail.ru

Tatyana Ivanovna Murashkina

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

E-mail: timurashkina@mail.ru

Nadezhda Alexandrovna Khasanshina

research engineer at STC "Nanotechnologies of
fiber-optic systems"
Penza state University

Penza, Russia

E-mail: nadin.gloria@mail.ru

Serebryakov Dmitry Ivanovich

candidate of technical Sciences
head of the technology laboratory
Research Institute of physical measurements
Penza, Russia

E-mail: sdikoi@mail.ru

Polyakova Ekaterina Alekseevna

head of department of reliability
Research Institute of physical measurements
Penza, Russia

E-mail: sdikoi@mail.ru

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЧАТ-БОТА ПРИ ЛЕЧЕНИИ АНОМАЛИЙ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

В статье рассматриваются возможности использования современных информационных технологий, в частности чат-бота, в стоматологии при лечении пациентов с врожденными аномалиями развития лицевого скелета. С целью улучшения информированности как врачей, так и родителей на всех этапах получения медицинской помощи и реабилитации.

Ключевые слова: информационные технологии, стоматология, чат-бот, машинное обучение, расщелина губы и неба

A.V. Zobenko, Yu.A. Vasiliev
Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare
of the Russian Federation

PROSPECTS FOR THE USE OF CHAT-BOT IN THE TREATMENT OF ANOMALIES OF THE MAXILLOFACIAL REGION

The article discusses the possibilities of using modern information technologies, in particular chatbot, in dentistry in the treatment of patients with congenital malformations of the facial skeleton. In order to improve the awareness of both doctors and parents at all stages of receiving medical care and rehabilitation.

Keywords: information technology, dentistry, chat bot, machine learning, cleft lip and palate

Введение

Информационные технологии в последнее время оказывают значительное влияние на все сферы человеческой жизни.

Внедряются информационные технологии в здравоохранение [1], образуя комплексную систему мероприятий, направленную на поддержку принятия управленческих решений, а также решения вопросов по диагностике, лечению и профилактике заболеваний.

Информатизация медицины формирует единое пространство, в котором взаимодействуют между собой врачи, оно дает возможность пользоваться накопленным архивом медицинских данных, библиотек.

Одним из проявлений масштабного распространения информационных технологий является чат-бот.

Целью данной работы является рассмотрение перспектив развития информационных технологий и возможностей использования чат-бота в стоматологии при лечении врожденных пороков развития челюстно-лицевой области (коды по МКБ-10 Q35, Q36, Q37).

Чат-бот (от англ. chat-болтать, bot-робот) – это компьютерная программа, которая может взаимодействовать с человеком посредством голоса или текста.

Существует два вида подобных программ. Первый обрабатывает заранее известные запросы по заданному алгоритму. Второй вид основан на принципах машинного обучения, использует искусственный интеллект, поэтому программа способна к самообучению в ходе решения схожих задач.

Чат-боты нашли применение в различных сферах жизнедеятельности человека: в туристическом бизнесе, торговле, сфере услуг, образовании [4] и медицине. С помощью ботов не только можно автоматизировать рутинные процессы, но создать колл-центры, поисковые системы.

Важным преимуществом чат-ботов является их способность давать быстрые ответы на запросы без участия человека. Они предлагают гибкость за счет автоматизации задач и помощи в сборе информации. Схематично принцип работы чат-бота заключается в том, что пользователь отправляет запрос на специальный сервер, там информация обрабатывается и генерируется ответ.

Чтобы создать простого чат-бота не обязательно обладать навыками программирования, многие конструкторы подобных программ обладают интуитивно понятным интерфейсом и, при наличии доступа в сеть Интернет, настраиваются без особых усилий.

Примером успешно внедренного и функционирующего чат-бота может являться сервис Ada. В этом мобильном приложении человек может задать вопросы, описать свои симптомы, после чего система, по информации в своей базе данных, дает рекомендации и, при необходимости, советует обратиться к врачу [2].

Российские разработчики внедряют специализированных чат-ботов в медицинские информационно-аналитические системы (МИС) различных учреждений здравоохранения, которые способны напоминать пользователю о записи к врачу [5].

Виртуальные ассистенты используются в качестве информационной поддержки пациента после операции эндопротезирования [3].

Анализ возможных реализаций чат-бота в стоматологии

По оценкам ВОЗ, от пороков развития в течение первых 4 недель жизни ежегодно умирают 303 000 детей [8].

Врожденная расщелина губы и/или неба (ВРГН) является одним из наиболее распространенных пороков развития челюстно-лицевой области (ЧЛЮ) с тенденцией к увеличению. Занимая 3–4-е место в структуре врожденных аномалий, она остается на одном из первых мест по тяжести анатомических и функциональных нарушений [10].

Ежегодно в РФ рождаются более 20 тысяч детей с ВРГН [11].

Поскольку дети с врожденной расщелиной губы и неба - это пациенты с наличием местного анатомического дефекта и сопутствующими системными нарушениями они требуют комплексного подхода к лечению и одновременной работы группы специалистов: педиатра, невролога, ортодонта, челюстно-лицевого хирурга, отоларинголога, логопеда, дефектолога, психолога, социального работника. И от того, насколько согласовано они будут действовать зависит успех лечения.

В ряде случаев специалисты отмечают необходимость создания медицинской базы данных, содержащую информацию о пациенте, его R-снимки, цифровые фотографии, модели челюстей, описание хода операций для трансляции опыта комплексной реабилитации. Так как объем и сложность информации, которую врачи должны знать в процессе оказания медицинской помощи постоянно растут, возрастают проблемы обработки и контроля этой информации. В настоящее время ведется создание экспертных систем с применением инновационных технологий, аккумулирующих профессиональные знания и умения квалифицированных специалистов имеет связь с повышением эффективности комплексной реабилитации пациентов с врожденной расщелиной губы и неба [9].

Специалистами создаются автоматизированные системы управления и учета данных в комплексной реабилитации пациентов с ВРГН для поддержки решения врача относительно тактики лечения [6].

Существенным дополнением к таким системам стало бы использование чат-бота в качестве электронного консультанта. Он бы позволил осуществлять быстрый поиск необходимой информации.

Специалисты отмечают, что недостаточная информированность врачей и родителей, обуславливает несвоевременное оказание специализированной помощи детям с данной патологией. Отсутствие доступной информации о методах и результатах лечения может привести к непоправимым последствиям. Утрата веры в возможность благополучного решения проблем ребенка – зачастую основная причина отказа от него [11].

Низкая информированность родителей о доступных формах логопедической помощи, отсутствие рекомендаций по срокам и длительности реабилитационной программы приводит к несвоевременному получению данного вида помощи [7].

Родители, которые имеют детей с расщелиной губы и неба, не осведомлены о причинах ее возникновения, о структуре дефекта, его сущности, дальнейшего развития ребенка. Такая неосведомленность может негативно сказаться на дальнейшем речевом и психофизическом развитии ребенка.

При обнаружении дефектов челюстно-лицевой области у родителей возникает ряд вопросов, связанных с лечением и реабилитацией, ответы на которые требуют участия не-

скольких специалистов. Родителей волнуют ряд вопросов по вопросу диспансерного наблюдения, получения бесплатной медицинской помощи. Вопросы, связанные с хирургическим лечением, связанными с ним рисками, что требуется для прохождения данной процедуры, как осуществлять уход за послеоперационной раной. Родителей беспокоят по поводу качества жизни их ребенка после операции, сроков и условиях проведения ортодонтического лечения, последующей логопедической помощи таким детям. Матери обеспокоены тем как кормить ребенка с врожденной патологией. Чтобы убрать опасения, снизить тревожность и облегчить процесс получения информации для родителей можно применять чат-бота.

Чат-бот может выступать в качестве персонального консультанта, который будет подсказывать как взаимодействовать с ребенком, чему учить. Можно проводить стоматологическое просвещение, разъяснительную работу среди родителей, чтобы обеспечить своевременное предупреждение и профилактику осложнений. Достаточная осведомленность будет способствовать улучшению психоэмоционального климата в семье, самостоятельности и меньшей зависимости от специалиста. Чат-бот может содержать инструкции по ежедневному выполнению упражнений, в том числе миогимнастики, рекомендации по уходу.

Реализация доступа к информации подобного рода может осуществляться посредством мессенджеров, таких как Slack, WhatsApp или Telegram, социальных сетей Vkontakte или Facebook. Уже установленная на устройстве программа обмена сообщениями не требует дополнительной регистрации, высоких технических возможностей компьютера и, таким образом, и облегчает доступ к чат-боту.

Так как проблема получения актуальной информации по вопросам лечения и реабилитации детей с ВРГН для врачей и родителей стоит очень остро, по применению чат-бота в данной сфере повысит информированность всех участников лечебного процесса.

Заключение

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

1. Была актуализирована возможность использования чат-бота в медицине;
2. Описаны перспективы использования данной информационной технологии в узкоспециализированном разделе стоматологии;
3. Обозначена цель использования данной технологии, а именно: интеграция знаний в различных областях в единую медицинскую базу для выбора наиболее оптимальной тактики лечения и поддержки принятия решений. Применение в качестве электронных консультантов, для оказания информационной поддержки родителям, в целях своевременного оказания пациентам с ВРГН медицинской помощи, снижения тревожности и создания благоприятного психо-эмоционального климата в семье.

Литература

1. Белоглядова И.А. Васильев Ю.А. Модель информационной экосистемы по целевым контурам пациентов с врожденными пороками челюстно-лицевой области // Инновации в образовании: Материалы конференции. – ФГБОУ ВО КубГМУ, 2020. С. 52–57.
2. Березкина И.А. Приземина И.Н. Зелинский С.С. Роль информатизации и цифровизации системы здравоохранения в эффективности управления и оказания медицинской помощи // Социальная работа: современные проблемы и технологии. 2020. № 1. С. 22–30.
3. Дудкин Д.М. Сибирный Н.Д. Чат-бот информационной поддержки пациента после операции эндопротезирования // Смотр-конкурс научных, конструкторских и технологических работ студентов Волгоградского государственного технического университета. 2019. 199 с.
4. Зобенко А.В. Зобенко В.Я. Возможности использования чат-бота в образовательном процессе // Инновации в образовании: Материалы конференции. – ФГБОУ ВО КубГМУ, 2020. С. 180–183.
5. Кухтичев А.А. Поповкин А.В. Юров И.Б. Специализированные чат боты в приложениях мгновенных сообщений медицинской информационно-аналитической системы «Циф-

роМед» // Материалы XX юбилейной международной конференции по вычислительной механике и современным прикладным системам (ВМСППС'2017). 2017. С. 150–151.

6. Мамедов Ад. А. Поддержка решений врача при лечении детей с врожденной расщелиной губы и неба // Врач и информационные технологии. 2007. № 6. С. 28–32.

7. Мосьпан Т. Я. Гинтер О. В. Современный подход к логопедическому сопровождению детей раннего возраста с врожденной расщелиной губы и неба // Специальное образование. 2017. № 1 (45). С. 5–16.

8. Пороки развития. Всемирная организация здравоохранения: сайт. URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies/> (дата обращения: 15.02.2020)

9. Супиев Т.К. Негаметзянов Н.Г. Катасонова Е.С. Нигай Г.А. Утепов Д.К. Оптимизация комплексной реабилитации детей с врожденной расщелиной губы и неба с применением информационных технологий // Стоматология детского возраста и профилактика. 2009. № 3 (30). С. 6–11.

10. Топольницкий О.З. Чуйкин С.А. Лечение врожденной расщелины губы и неба: Монография. 2017. 584 с.

11. Фомичев И.В. Флейшер Г.М. Лечение детей с врожденной расщелиной губы и неба // Медицинский алфавит. 2014. № 20. С. 39–44.

Сведения об авторах

Александра Владимировна Зобенко

ассистент

Эл. почта: alexzobenko@mail.ru

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
Краснодар, Россия

Юрий Анатольевич Васильев

ассистент

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
Краснодар, Россия

Information about authors

Alexandra Zobenko

assistant

E-mail: alexzobenko@mail.ru

Kuban state medical University
Krasnodar, Russia

Yuri Anatolyevich Vasiliev

assistant

E-mail: yurii-59@mail.ru

Kuban state medical University
Krasnodar, Russia

АНАЛИЗ СИСТЕМ ДОСТАВКИ CO₂ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Проанализированы системы доставки излучения, применяемые в CO₂ лазерных хирургических установках: зеркальный манипулятор, оптоволокно, полый волновод. Показано, что эти устройства можно использовать в методе автодинного детектирования процессов лазерного испарения биотканей.

Ключевые слова: CO₂ лазер, автодинное детектирование, оптоволокно, полый волновод, биоткань.

V.N. Kortunov, A.K. Dmitriev, A.N. Kononov, V.A. Ulyanov
FRC "Crystallography and Photonics" RAS

ANALYSIS OF CO₂ DELIVERY SYSTEMS FOR LASER RADIATION

This paper analyzes the radiation delivery systems used in CO₂ laser surgical devices: mirror manipulator, optical fiber, and hollow waveguide. It is shown that these devices can be used in the method of autodyne detection of laser evaporation of biotissues.

Keywords: CO₂ laser, autodyne detection, optical fiber, hollow fiber, biotissues

Введение

В лазерной хирургии широко применяются установки на основе компактных углекислотных лазеров (длина волны излучения 10.6 мкм) с выходной мощностью 5-30 Вт для рассечения и перфорации биотканей, выпаривания поверхностных новообразований и т.п. [1].

Для оперативной диагностики типа выпариваемой сфокусированным излучением биоткани нами был предложен метод автодинного детектирования [2], заключающийся в регистрации высокочастотных биений выходной мощности лазера, возникающих при рассеивании излучения, сдвинутого по частоте за счет эффекта Доплера, от продуктов разрушения биотканей и поверхности кратера обратно в резонатор лазера. Этот метод может позволить в масштабе реального времени контролировать процессы лазерного испарения многослойных биотканей.

Чувствительность метода автодинного детектирования зависит от типов CO₂ лазера и средства доставки силового лазерного излучения к месту воздействия.

Для доставки излучения используются механические многозеркальные шарнирные манипуляторы и гибкие световоды на основе поликристаллических материалов и полых трубок. К дистальному концу присоединяются наконечники с фокусирующими линзами, обеспечивающие требуемую плотность лазерной мощности на биоткани. Ранее нами проанализированы основные коммерческие CO₂ лазеры на предмет использования их в методе автодинного детектирования [3]. Вопрос использования разных средства доставки CO₂ лазерного излучения и возможность их применения в методе автодинного детектировании остается открытым.

Цель работы

В работе проведено сравнение основных систем доставки с целью их использования в автодинной диагностики процессов лазерного испарения биотканей.

Методы и материалы

Исследования проводились на стенде, детально описанным в [3].

Мы использовали волноводный CO₂ лазерный излучатель с высокочастотной (частота до 80 МГц) накачкой (ВЧ) Diamond C-20 (Coherent, США). В лазере C-20 регулировка мощности излучения осуществляется изменением скважности импульсов накачки частотой 10 кГц. Лазерное излучение направлялось на поверхность вращающегося металлического диска или образца биоткани. Свежеприготовленные образцы биотканей свиньи располагались на подвижной платформе, тем самым моделировались процессы их лазерной резекции с постоянной скоростью 0,8 мм/сек. Для фокусировки излучения использовалась линза с фокусным расстоянием – 40 мм. Часть выходного излучения лазера ответвлялось делительной пластинкой (на приемную площадку быстродействующего фотоприемного устройства (ФПУ)). Сигнал с ФПУ подается на плату АЦП и далее по USB-интерфейсу в компьютер. Оцифро-

ванный сигнал обрабатывался по специальной программе. Основной сравнительной характеристикой автодинного приема являлся параметр G , равный отношению площади спектра мощности автодинного сигнала S к площади спектра мощности шума S_N – параметр сигнал/шум ($G = S / S_N$) в выбранной полосе частот f доплеровского сдвига Δf .

В качестве средств доставки лазерного излучения (СДЛИ) сравнивались:

- 7-ми звенный зеркальный механический манипулятор,
- полый кварцевый волновод внутренняя полость покрыта пленками серебра и йода серебра, *HG HWCA5001200* длиной 1 м внутренним диаметром 500 мкм (Polymicro, США),
- оптическая система на основе оптоволоконного кабеля *PIR* из суперчистых AgCl/AgBr твердых кристаллов (длина 1 м и диаметр 630/700 мкм) с просветленными торцами и узлами ввода и вывода излучения.

Выходное излучение лазера согласовывалось с входом в СДЛИ. В манипулятор излучение заводилось через слабо фокусирующую линзу для компенсации геометрической расходимости луча. В волновод лазерное излучение фокусировалось линзой оптимальным образом [4, 5].

Оптическое пропускание СДЛИ $T[\%]$ рассчитывалось как отношение значений выходной мощности к входной мощности излучения.

Для измерения профиля интенсивности излучения выходных пучков CO₂ лазеров использовался прибор NanoScan2 s Pyro/9/5 Ophir-Spiricon.

Полученные результаты

Измерения показали, что пропускание лазерного излучения зеркальным манипулятором равно $T=75\%$, и не меняется при его разных положениях и изломах.

Оптическое пропускание для оптоволоконного кабеля PIR T находится в пределах $T=73\%–77\%$ и практически не зависит от углов изгиба от 0° до 180°.

Оптическое пропускание полого кабеля *HG* при 5 Вт и 10 Вт оказалось равным $T=61\%$. В полой кабеле *HG* при механическом изгибе радиусом 20 см на угол 180 град потери увеличиваются в 1.3 раза до 55%. При уменьшении радиуса изгиба кабеля до 10 см потери излучения увеличиваются еще на 10%.

Профили лазерных пучков, измеренные прибором NanoScan, представлены на рис.1.

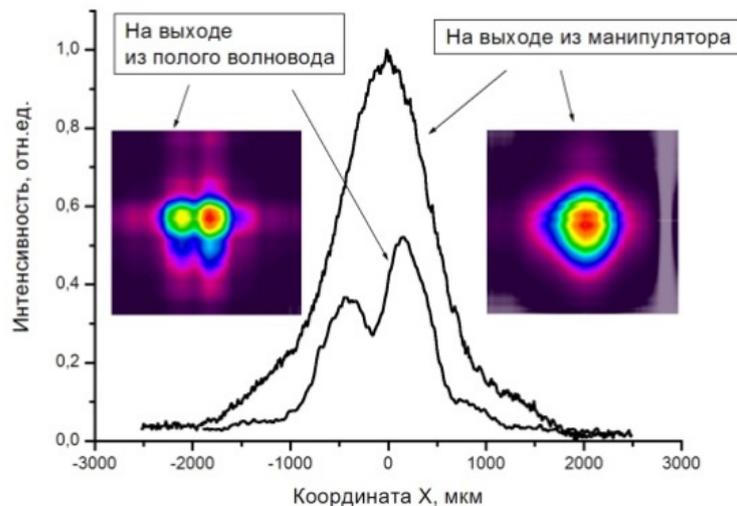


Рис. 1. Профили интенсивности лазерного пучка лазера С-20 на выходе из манипулятора (справа) и полого волновода *HG* диаметром 500 мкм (слева), мощность 5 Вт.

Измерения при разных мощностях генерации излучения показали, что в лазере С-20 с зеркально-линзовым манипулятором профили интенсивности выходных пучков имеют гладкий колоколообразный вид, отклонение от гауссова профиля составляет не более 10-20%. На

выходе полого волновода *HG* регистрировалось многомодовое распределение, которое изменялось во время измерений.

Таким образом, зеркальный манипулятор практически не меняет профиль лазерного пучка при его прохождении.

Измерения показали, что оптоволоконный кабель *PIR* существенно меняет распределение интенсивности первоначального гауссова пучка на нерегулярное распределение, напоминающее спекл-структуру.

Автодинный сигнал в CO_2 лазерах регистрировался ФПУ в диапазоне частот 10кГц – 1МГц при использовании разных систем доставки лазерного излучения и облучении диффузно отражающую мишень – диска.

По спектру мощности находилась средняя мощность сигнала на доплеровской частоте *S*. В этом же частотном диапазоне Δf при средней частоте *f* находилась мощность шумов S_N . На рис. 2 приведена калибровочная кривая автодинного усиления *G* для CO_2 лазера при использовании зеркального манипулятора и полого волновода *HG*.

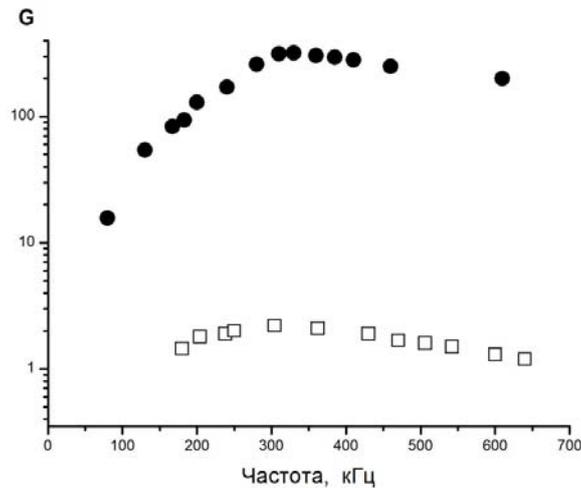


Рис.2. Калибровочная кривая АЧХ автодинного усиления CO_2 лазера - Diamond C-20:
 □ - с полым волокном, ● - с зеркально-линзовым манипулятором.

Параметр *G* при мощности лазерного излучения 4,5 Вт и частоты доплеровского сдвига обратно отраженного излучения от диска $f=300\text{кГц}$ оказался равным $G\approx 300$ для зеркального манипулятора и $G\approx 2$ для полого волновода.

Лазерное рассеяние биомодели - жировая ткань/мышечная ткань осуществлялось с одновременной записью автодинного сигнала (рис.3). Цель измерений - определение момента пересечения лазерным излучением границы слоев с различным типом тканей.

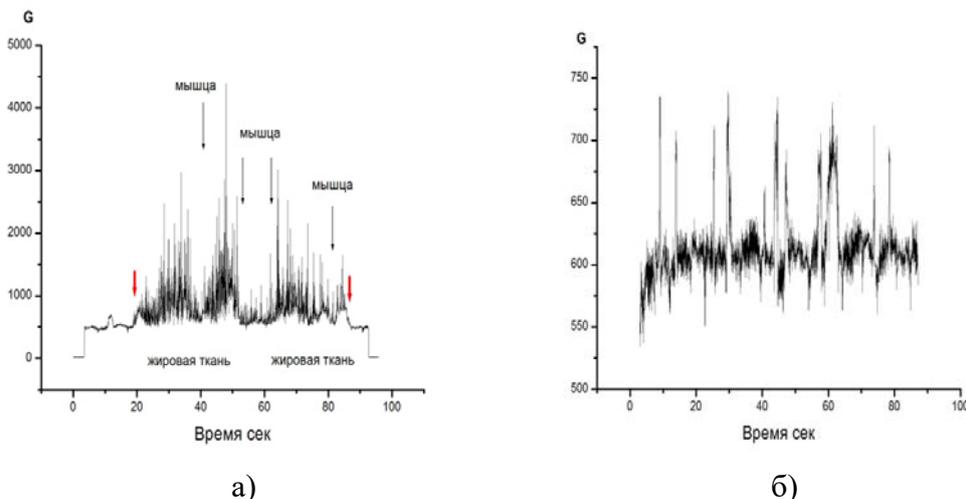


Рис.3. Лазерное рассеяние биомодели - жировая ткань/мышечная ткань, мощность излучения - 4,5 Вт.
 Рис 3а – рассеяние с использованием зеркально-линзового манипулятора, Рис. 3б – рассеяние с использованием полого волокна. Красной жирной стрелкой отмечен момент начала и конца рассеяния биоткани.

Из рис. 3а видно, что момент перехода лазерного луча с мышечной ткани на жировую и обратно в случае использования манипулятора фиксируется достаточно определенно. Отношение сигнал/шум для жировой ткани – 1,7, для мышечной ткани – 1,3. В случае использования полого волокна достоверно определить момент перехода не удалось.

Однако, было определено, что максимумы автодинного сигнала (рис 3б) соответствуют максимальным выбросам продуктов разрушения биоткани из зоны лазерного реза.

Выводы

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

Показана перспективность использования зеркально-линзового манипулятора для автодинной диагностики при проведении рассечения биотканей излучением CO₂ лазера. Различия в величине автодинного сигнала от жировой и мышечной тканей позволяют уверенно определять эти ткани во время их лазерного испарения.

Продемонстрирована возможность регистрации автодинного сигнала в системе «CO₂ лазер с ВЧ накачкой + полый волновод».

Работа выполнена при поддержке Министерства науки в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части развития методов диагностики лазерного испарения биотканей и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-02069-мк) в остальной части.

Литература

1. Скобелкин О.К., Козлов В.И., Гейниц А.В., Данилин Н.А., Дербенев В.А. Применение лазерных хирургических аппаратов «Ланцет» в медицинской практике. – М., 2001.

2. Гордиенко В.М., Дмитриев А.К., Коновалов А.Н., Кортунов В.Н., Панченко В.Я., Ульянов В.А. Лазерная абляция биотканей и ее диагностика по доплеровскому сигналу обратного рассеяния // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2002. Т.3, С. 14–22,

3. Dmitriev A.K., Konovalov A.N., Kortunov V.N., Ulyanov V.A. Possibilities for organizing feedback on the Doppler backscattering signal in surgical CO₂ lasers // Journal of Laser Applications, 32, 022073 (2020).

4. Clarkin J.P., Shannon J.H., Timmerman R.J. Characterization of hollow silica infrared.

5. Waveguides. Proc. SPIE 4957, Optical Fibers and Sensors for Medical Applications III, (1 July 2003).

6. Artjushenko V., Ivchenko N. at all. Infrared cables and catheters for medical applications. SPIE, 1991, 1420 (157–168).

Сведения об авторах

Владимир Николаевич Кортунов

науч. сотр.

Эл. почта: vnkort@yandex.ru

Александр Константинович Дмитриев

науч. сотр.

Эл. почта: dmitriev_a62@mail.ru

Алексей Николаевич Коновалов

канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: alex_konov@mail.ru

Валерий Андреевич Ульянов

канд. тех. наук, вед. науч. сотр.

Эл. почта: vaul595@mail.ru

ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

Москва, Россия

Information about authors

Vladimir Nikolaevich Kortunov

Researcher

E-mail: vnkort@yandex.ru

Alexandr Konstantinovich Dmitriev

Researcher

E-mail: dmitriev_a62@mail.ru

Alexsey Nikolaevich Konovalov

senior researcher, candidate of sciences

E-mail: alex_konov@mail.ru

Valerii Andreevich Ulyanov

leading researcher, candidate of sciences

E-mail: vaul595@mail.ru

FRC "Crystallography and Photonics" RAS

Moscow, Russia

КОНСТРУКЦИЯ И КИНЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РОБОТИЗИРОВАННОГО КРЕСЛА ДЛЯ ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Протонная лучевая терапия приобретает все более возрастающее значение в дистанционной лучевой терапии. В частности, протонная лучевая терапия является наиболее успешным и практически безальтернативным методом лучевого лечения пациентов с внутриглазными злокачественными новообразованиями. Тем не менее в настоящее время кресла для позиционирования пациентов при протонной лучевой терапии в процедурных с фиксированным направлением протонного пучка не имеют функции позиционирования фиксированной головы и шеи. В статье представлен новый дизайн кресла для протонной лучевой терапии с устройством позиционирования головы и шеи, разрабатываемый в рамках создания исследовательского комплекса протонной лучевой терапии онкоофтальмологическими пациентами на базе циклотрона Ц80 в НИИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ. Предложенная конструкция роботизированного терапевтического кресла основана на теории U-TRIZ и требованиях эргономики. Основные составные части кресла: механизм регулировки положения пациента и устройство для фиксации головы. По результатам проектирования был проведен анализ напряжений на предмет выявления частей кресла, не выдерживающих требуемый вес, а также кинематический анализ для механизма регулировки положения кресла. Предлагаемая конструкция кресла для протонной лучевой терапии удовлетворяет требованиям для коррекции осанки и выполняет функцию позиционирования головы и шеи.

Ключевые слова: протонная лучевая терапия, онкоофтальмология, позиционирование, кресло.

A.N. Chernykh
NRC «Kurchatov institute»

DESIGN AND KINEMATIC ANALYSIS OF A ROBOTIZED CHAIR FOR PROTON ADIATION THERAPY

Proton radiotherapy becomes increasingly important in external radiotherapy. In particular, proton beam radiation therapy is the most successful and almost non-alternative method of radiation treatment of patients with intraocular malignant neoplasms. However, currently, the chairs for positioning patients during proton radiation therapy in the treatment rooms using the fixed proton beam direction do not have the functions of positioning the fixed head and neck. This article presents a new design of a chair for proton radiation therapy with a head and neck positioning device, which is being developed as part of the creation of a research complex for proton radiation therapy of patients with ophthalmic oncology based on the cyclotron C80 at the NRC "Kurchatov Institute" – PNPI. The proposed design of the robotic therapeutic chair is based on the theory of U-TRIZ and ergonomics requirements. The main components of the chair are the mechanism for adjusting the patient position and the device for head fixation device. According to design results, the following analyzes were carried out: weight pressure analysis in order to identify the chair parts, that do not support the required weight, and kinematic analysis for the mechanism that adjusts the chair position. Proposed structure of chair for proton radiotherapy meets requirements for correction of posture and performs function of head and neck positioning.

Key words: proton radiation therapy, oncophthalmology, positioning, chair.

1. Введение

В настоящее время протонная лучевая терапия находит широкое применение в клинической практике, что обусловлено, прежде всего, возможностью качественного улучшения дозных распределений, а именно формирование высоких краевых градиентов дозы. Это обеспечивает кардинальное снижение лучевой нагрузки на здоровые ткани по сравнению с традиционно используемыми для этих целей в конвенциональной лучевой терапии пучками электронов и γ -квантов. Риск возникновения лучевых осложнений заметно уменьшается даже при увеличении подводимой к мишени дозы. Увеличение дозы на мишень заметно повышает вероятность ликвидации опухоли.

Во время протонной лучевой терапии пациенты со злокачественными новообразованиями глаза и орбиты, а также в некоторых случаях головы и шеи, располагаются в положении сидя. При этом для удовлетворения требований позиционирования пациентов в положении

сидя ряд научно-исследовательских институтов и компаний-разработчиков медицинской техники создали специальные терапевтические кресла.

Дитер Шардт и Питер Хиг предложили конструкцию кресла для позиционирования при проведении протонной лучевой терапии пациентов со злокачественными новообразованиями головы и шеи с возможностью коррекции их осанки [1]. В 2006 году Соммер и др. предложили серию кресел для позиционирования пациентов во время проведения лучевой терапии [2]. Французский центр протонной терапии Орсе разработал роботизированное кресло для лечения опухолей головы, шеи и глаз. Компания Chengdu Dr. Technology Co., Ltd. разработала роботизированное кресло для протонной и ионной лучевой терапии злокачественных новообразований головы и шеи [3]. В 2017 году Guangdong Hengju Medical Technology Co., Ltd. разработала устройство фиксации пациента в положении сидя для протонной лучевой терапии [4, 5]. Тем не менее существующие кресла для лучевой терапии все еще не подходят для проведения протонной лучевой терапии, в частности, в случаях онкоофтальмологических пациентов. Современные технологии фиксации головы и шеи с применением термопластичной маски в случае протонной лучевой терапии онкоофтальмологических пациентов требуют коррекции первичного положения зафиксированной головы, что при отсутствии дополнительных степеней свободы у устройства для фиксации головы отнимает много времени.

В статье представлен дизайн терапевтического кресла для ПЛТ с дополнительными степенями свободы механизма для фиксации головы пациента. Дизайн разработан для применения в процедурных с фиксированным направлением протонного пучка, в частности, в разрабатываемом исследовательском онкоофтальмологическом комплексе протонной лучевой терапии на базе циклотрона Ц80 в НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ. Устройство облегчает позиционирование области интереса, повышает эффективность, универсальность и удобство позиционирования головы и шеи, сокращая время позиционирования.

2. Методы

2.1. Конструкция роботизированного терапевтического кресла.

2.1.1. Анализ функциональных требований для роботизированного кресла.

Большинство центров ПЛТ оборудованы процедурными помещениями с фиксированным направлением распространения протонного пучка для лучевой терапии пациентов со злокачественными новообразованиями глаза и орбиты, а также головы и шеи. В этом случае пациенты должны размещаться в положении сидя. Для фиксации головы пациента используется специальное устройство, с помощью которого осуществляется совмещение дозового распределения с мишенью [6, 7].

Подводя итог, следует сказать, что кресла для размещения пациентов при проведении протонной лучевой терапии должны выполнять следующие основные функции: 1. Регулировка положения пациента и его осанки. Кресло для лучевой терапии должно быть оснащено не менее, чем шестью степенями свободы (6-DOF), чтобы обеспечить возможность регулировки кресла в соответствии с требованиями планирования лучевой терапии; 2. Точная фиксация головы с быстрой регулировкой ее положения в зафиксированном положении; 3. Кресло должно быть оснащено механизмом перемещения на некоторое расстояние от центра лучевой установки для удобства работы персонала на этапе размещения в нем пациента.

2.1.2. Конструкция механизма регулировки положения.

На основе многолетнего опыта проведения протонной лучевой терапии онкоофтальмологических пациентов в НИЦ «Курчатовский институт» - ИТЭФ выработаны требования к необходимым направлениям перемещения пациента и их диапазонам. Таким образом, механизм регулировки положения пациента и его осанки при протонной лучевой терапии должен обеспечивать поворот кресла вокруг оси Y на 360 градусов, поворот вокруг осей X и Z на ± 15 градусов, линейные перемещения в направлении X, Y, Z в диапазоне 200 мм, смещение на 400 мм вдоль направления Y для регулировки кресла в зависимости от соматотипа пациента (расстояние между сиденьем кресла и механизмом фиксации головы пациента). В результате механизм регулировки положения пациента состоит из 6-DOF системы микропозициониро-

вания типа «гексапод», механизма поворота на 360 градусов, механизма регулировки смещения вдоль направления Y и механизма перемещения на расстояние 1000 мм вдоль оси Z от системы формирования и мониторинга дозы, как показано на рисунке 1.

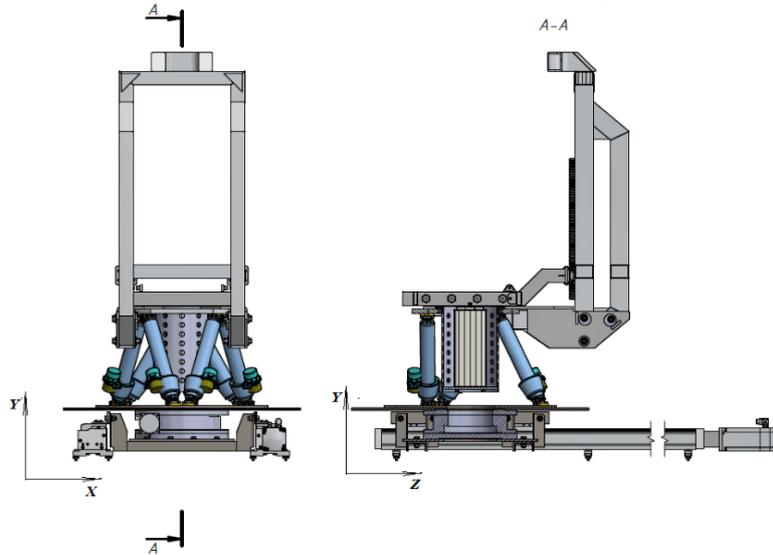


Рисунок 1. Механизм регулировки положения кресла

6-DOF система может обеспечивать поворотные движения вокруг осей X, Y и Z и линейные перемещения вдоль направления XX, YY, ZZ с относительно малым смещением. Таким образом, 6-DOF система дополнена механизмом поворота на 360 градусов, механизмом регулировки смещения вдоль направления Y (вертикальное перемещение) и механизмом перемещения на расстояние 1000 мм вдоль оси Z от системы формирования и мониторинга дозы, чтобы компенсировать отсутствие хода 6-DOF системы в направлении YZ и возможности поворота на 360 градусов вокруг оси Y.

2.1.3. Конструктивное исполнение механизма для фиксации головы

Устройство для фиксации головы обеспечивает возможность иммобилизации головы пациентов со злокачественными новообразованиями глаза и орбиты, головы и шеи, а также дополнительные степени свободы - наклон (влево – вправо) и кивок (вперед – назад) головы пациента на углы $\pm 6^\circ$ [8]. Устройство состоит из несущей рамы (рисунок 2, поз. 3), на которую устанавливаются механизм наклона (рисунок 2, поз. 4), рама для иммобилизации (рисунок 2, поз. 5), механизм кивка (рисунок 2, поз. 2) и универсальный подголовник (рисунок 2, поз. 6).

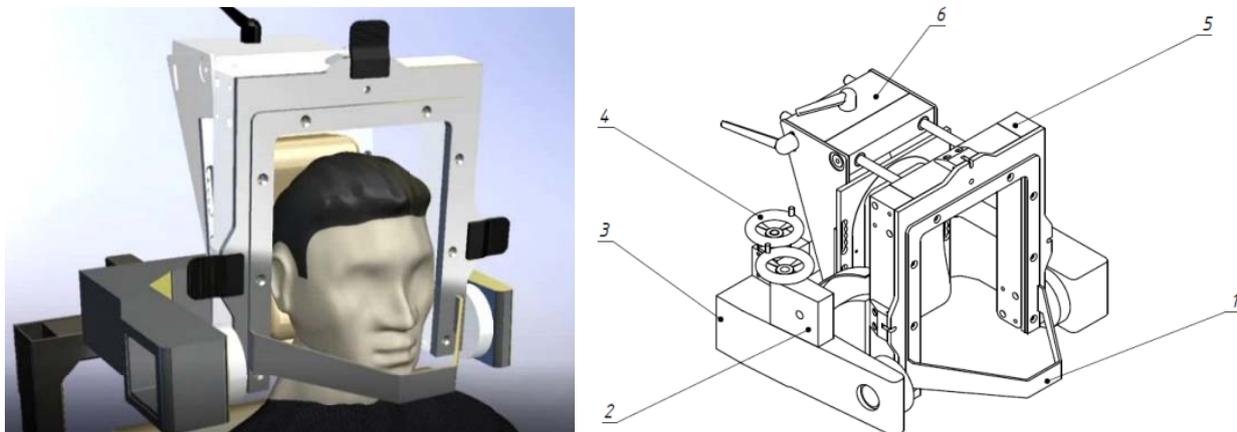


Рисунок 2 Устройство для фиксации головы

Кинематические связи между составными частями устройства для фиксации головы показаны на структурной кинематической схеме (рисунок 3).

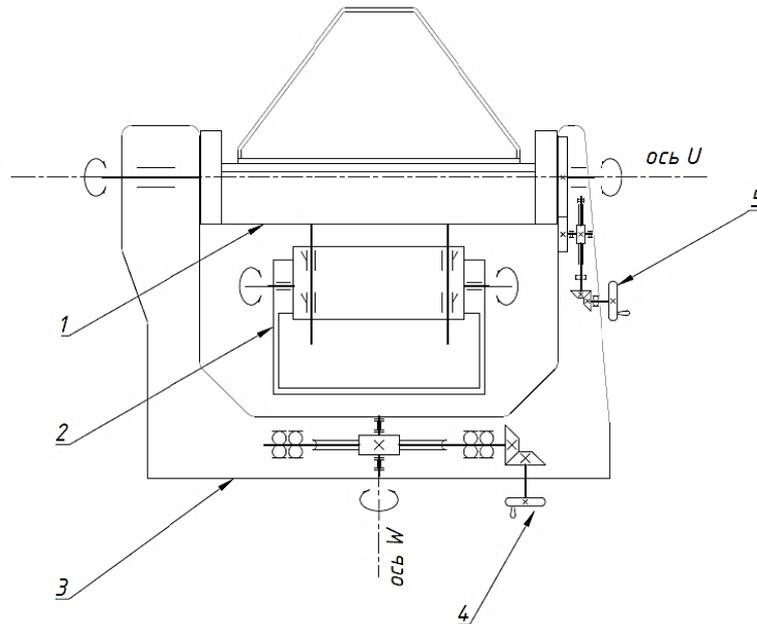


Рисунок 3. Структурная кинематическая схема устройства для фиксации головы

Механизм наклона осуществляет наклон зафиксированной головы пациента путем поворота рамы вокруг оси W (рисунок 3, поз. 4). Механизм наклона предлагается выполнить на основе подшипника LDL 66401V фирмы Franke, который одновременно решает задачу крепления всего устройства для фиксации головы к несущему каркасу кресла.

Механизм кивка интегрирован в иммобилизирующую раму (рисунок 2, поз. 2, 5) и осуществляет поворот рамы вокруг оси U (рисунок 3, поз. 5), которая располагается на уровне плеч пациента.

С целью безопасного осуществления манипуляций с зафиксированной головой пациента механизмы наклона и кивка выполнены с ручным приводом на основе зубчатых передач (рисунок 3, поз. 4, 5).

Для иммобилизации головы пациента используется иммобилизирующая рама (рисунок 2, поз. 5), конструкция которой позволяет использовать индивидуальные подголовник, стоматологическую капу и термопластичную маску из современных быстротвердеющих материалов.

2.1.4. Статический анализ напряжений в конструкции роботизированного кресла для протонной лучевой терапии

Роботизированное кресло для протонной лучевой терапии должно выдерживать вес около 100 ~ 200 кг во время рабочего процесса, поэтому необходим анализ несущей рамы кресла и механизма вертикальной регулировки высоты положения кресла, чтобы убедиться в жесткости предлагаемой конструкции. Так как 6-DOF система микропозиционирования типа «гексапод» в соответствии с техническими характеристиками, предоставляемыми производителями, соответствует требованиям разработки, статистический анализ для этого узла не выполнялся. Трехмерная модель роботизированного кресла для протонной лучевой терапии введена в модуль анализа напряжений программного обеспечения Autodesk INVENTOR Professional (рисунок 4). На рисунке 4 - граничное условие прикладываемой нагрузки на кресло. Желтой стрелкой показан вектор направления силы, приложенной к основанию механизма подъема кресла. Величина приложенной силы составляет 2000 Н. Плоскости сопряжения линейных направляющих механизма смещения на 1000 мм вдоль оси Z с полом процедурного помещения являются неподвижными. На рисунке 5 показана общая величина деформации несущих конструкций кресла. Очевидно, что максимальная деформация кресла происходит на переднем конце рамы подъемного механизма.

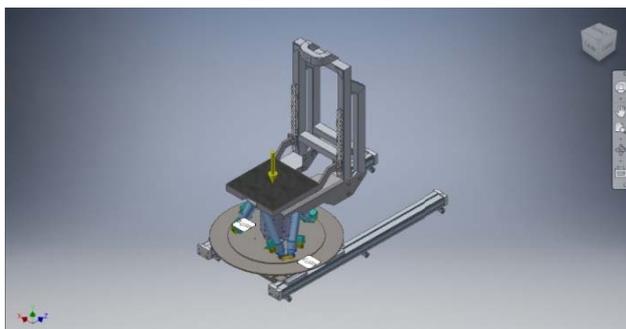


Рисунок 4. Граничное условие нагрузки на несущую раму кресла

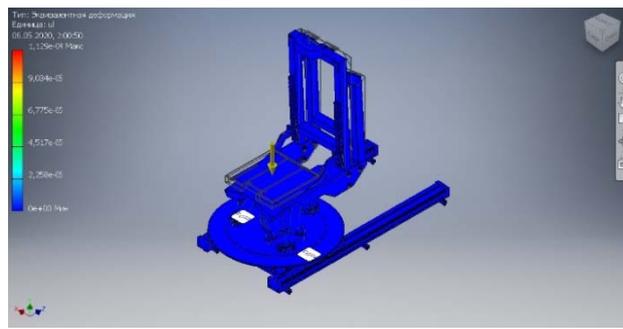


Рисунок 5. Основная деформация

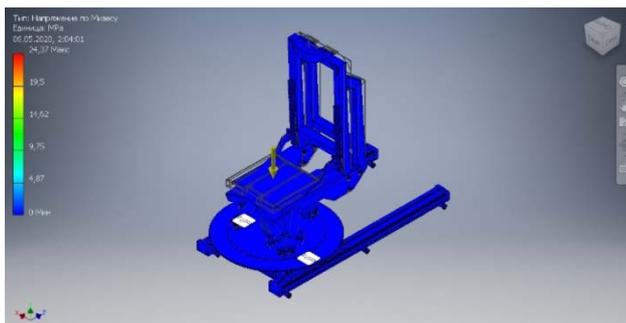


Рисунок 6. Напряжение по Мезису

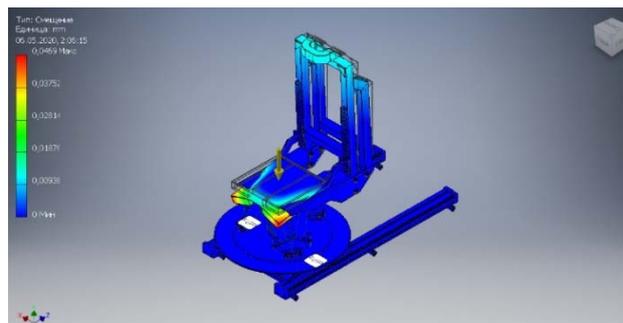


Рисунок 7. Диаграмма смещения

Максимальная деформация конструкции составляет 0,000113 бр. На рисунке 6 представлена диаграмма распределения напряжения по Мезису, максимальное значение напряжения составляет 24,37 МПа. Значение напряжения относительно невелико и соответствует условиям. На рисунке 7 представлена диаграмма смещения, максимальное смещение составляет 0,047 мм. Смещение точки крепления устройства для фиксации головы к несущей раме роботизированного терапевтического кресла составляет 0,018 мм.

В целом, конструкция кресла является разумной, а прочность и жесткость удовлетворяют требованиям точности позиционирования при протонной лучевой терапии.

3. Кинематический анализ

Кинематический анализ имеет большое значение для механизма регулировки положения кресла и обеспечивает теоретическую основу для управления движением и проведения динамического анализа. Механизм регулировки положения кресла представляет собой последовательно-параллельную конструкцию. Основным элементом механизма регулировки положения кресла является 6-DOF система микропозиционирования типа «гексапод».

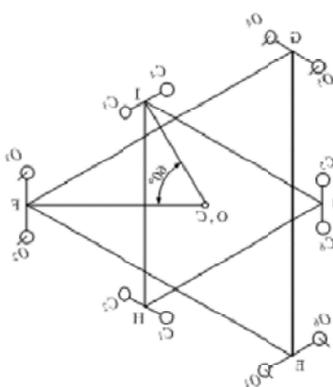


Рисунок 8. Схема расположения шарниров на основании и платформе 6-DOF системы микропозиционирования типа «гексапод»

6-DOF система представляет собой устройство, обеспечивающее шесть степеней свободы выходному звену (платформе) и обладающее высокой точностью позиционирования. Платформа и основание 6-DOF системы связаны между собой шестью штангами, каждая из которых представляет собой электромеханическую поступательную пару. Электромеханический исполнительный механизм является наиболее простым по своему конструктивному исполнению и эксплуатационным характеристикам. Штанга соединена с основанием и платформой сферическими шарнирами и ограничена от вращения относительно продольной оси. Шарниры расположены на отрезках, перпендикулярных высотам равносторонних треугольников на основании и подвижной платформе, и проведены из вершин этих треугольников (рисунок 8).

Такое расположение центров шарниров (не в вершинах треугольника) связано с конструктивной необходимостью разнесения пар шарниров, так как штанги имеют продолжение за пределы рабочего стола в виде трубчатых штанг, на концах которых расположены электродвигатели для привода шариковых винтовых пар. Эти штанги при любом эксплуатационном положении рабочего стола не должны встретиться в пространстве между собой.

Чтобы упростить кинематический анализ, механизм регулировки положения кресла представляет только 6-DOF систему микропозиционирования типа «гексапод» с шарнирами, расположенными в вершинах правильных шестиугольников основания и подвижной платформы. Далее будет приведен анализ обратной кинематики параллельного механизма 6-DOF системы.

3.1. Кинематический анализ 6-DOF системы микропозиционирования типа «гексапод»

Схема 6-DOF системы микропозиционирования типа «гексапод» представлена на рисунке 9.

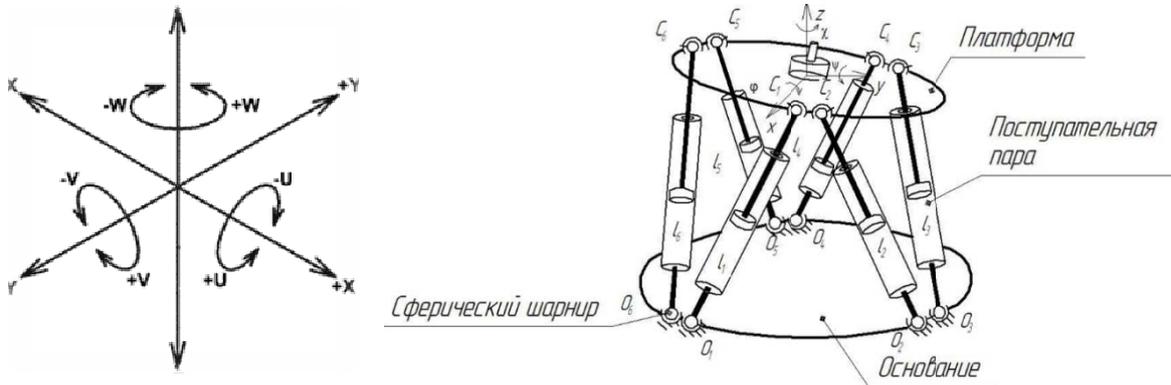


Рисунок 9. 6-DOF система микропозиционирования типа «гексапод» [9]

3.1.1. Решение обратной задачи кинематики 6-DOF системы микропозиционирования типа «гексапод»

Рассмотрим структурную схему 6-DOF системы (рисунок 10). Для решения поставленной задачи центры шарниров на плоскости основания обозначим A_1, A_2, A_3, A_4, A_5 и A_6 , а на подвижной платформе a_1, a_2, a_3, a_4, a_5 и a_6 . Введем следующую систему координат: XYZ – базовая система координат, связанная с неподвижной платформой основания, с началом в точке O , которая располагается в центре неподвижной плоскости $A_1A_2A_3A_4A_5A_6$. Ось X направим вдоль отрезка OA_1 , ось Y лежит в плоскости основания и перпендикулярна осям X и Z , которая направлена вертикально вверх. Из каждой точки A_1, A_2, A_3, A_4, A_5 и A_6 направлен радиус-вектор R_i ($i=1, 2 \dots 6$). xyz – подвижная система координат, связанная с подвижной платформой, полученная параллельным переносом базовой системы координат XYZ на вектор H и началом в точке o .

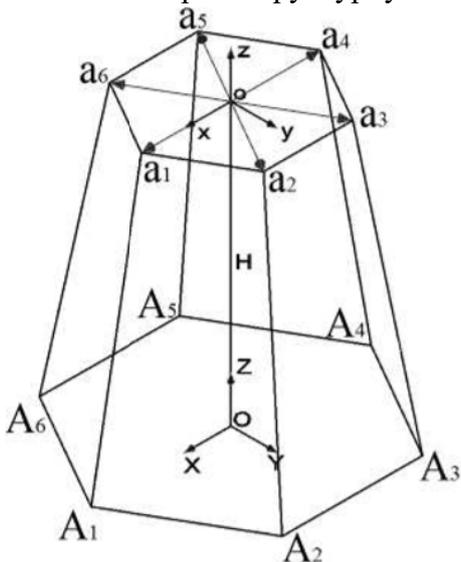


Рисунок 10. Структурная схема 6-DOF системы микропозиционирования типа «гексапод» [10]

Шесть точек на плоскости основания $A_1, A_2, A_3, A_4, A_5, A_6$ расположены на окружности радиусом r_A , и координата каждой точки в базовой системе координат XYZ определяется следующим образом [11].

$$\left\{ \begin{array}{l} A_1 = \left| \begin{array}{ccc} r_A & -\frac{\sqrt{3}}{2}r_A & 0 \end{array} \right|^T \\ A_2 = |r_A \quad 0 \quad 0|^T \\ A_3 = \left| \begin{array}{ccc} r_A & \frac{\sqrt{3}}{2}r_A & 0 \end{array} \right|^T \\ A_4 = \left| \begin{array}{ccc} -\frac{r_A}{2} & \frac{\sqrt{3}}{2}r_A & 0 \end{array} \right|^T \\ A_5 = |-r_A \quad 0 \quad 0|^T \\ A_6 = \left| \begin{array}{ccc} -\frac{r_A}{2} & -\frac{\sqrt{3}}{2}r_A & 0 \end{array} \right|^T \end{array} \right. \quad (1)$$

Вершины правильного шестиугольника подвижной платформы a_1, a_2, a_3, a_4, a_5 и a_6 расположены на окружности с радиусом r_a , и координата каждой точки в базовой системе координат хуз определяется следующим образом.

$$\left\{ \begin{array}{l} a_1 = \left| \begin{array}{ccc} r_a & -\frac{\sqrt{3}}{2}r_a & H_{a1} \end{array} \right|^T \\ a_2 = |r_a \quad 0 \quad H_{a2}|^T \\ a_3 = \left| \begin{array}{ccc} r_a & \frac{\sqrt{3}}{2}r_a & H_{a3} \end{array} \right|^T \\ a_4 = \left| \begin{array}{ccc} -\frac{r_a}{2} & \frac{\sqrt{3}}{2}r_a & H_{a4} \end{array} \right|^T \\ a_5 = |-r_a \quad 0 \quad H_{a5}|^T \\ a_6 = \left| \begin{array}{ccc} -\frac{r_a}{2} & -\frac{\sqrt{3}}{2}r_a & H_{a6} \end{array} \right|^T \end{array} \right. \quad (2)$$

Отношение между подвижной системой координат хуз и неподвижной – XYZ определяется матрицей перехода Т следующим образом:

$$T_a = \begin{vmatrix} {}^A R & P_{a_0} \\ 0 & 1 \end{vmatrix} \quad (3)$$

Кинематический анализ 6-DOF системы микропозиционирования типа «гексапод» может быть упрощен как преобразование координат базовой системы координат XYZ и подвижной системы хуз. Предполагая, что базовая система координат XYZ сначала переместится в координаты x_0 вдоль оси X, y_0 вдоль оси Y, а затем z_0 вдоль оси Z и повернется вокруг оси Z на угол γ , вокруг оси Y на угол β и вокруг X на угол α . Тогда матрица преобразования выглядит следующим образом.

$${}^A R(\alpha, \beta, \gamma) == \begin{vmatrix} \cos \gamma \cos \beta & \cos \gamma \sin \beta \sin \alpha - \sin \gamma \cos \alpha & \sin \gamma \sin \alpha + \cos \gamma \sin \beta \cos \alpha \\ \sin \gamma \cos \beta & \cos \gamma \cos \alpha + \sin \gamma \sin \beta \sin \alpha & \sin \gamma \sin \beta \cos \alpha - \cos \gamma \cos \alpha \\ -\sin \beta & \cos \beta \sin \alpha & \cos \beta \cos \alpha \end{vmatrix} \quad (4)$$

Перемещение подвижной платформы в пространстве может быть описано следующим соотношением векторов, представленным на рисунке 11.

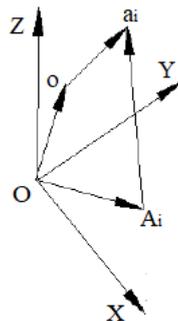


Рисунок 11. Пространственно-векторный график

$$\overline{Oo} + \overline{oa_i} = \overline{OA_i} + \overline{A_ia_i} \quad (i = 1, 2 \dots 6), \quad (5)$$

где $\overline{Oo} = \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix}$, $\overline{OA_i} = \begin{bmatrix} A_{i1} \\ A_{i2} \\ A_{i3} \end{bmatrix}$, $\overline{oa_i} = \begin{bmatrix} a_{i1} \\ a_{i2} \\ a_{i3} \end{bmatrix}$, \overline{Oo} и $\overline{OA_i}$ вектор положения центра подвижной

системы координат хуз и вектор положения точки шарнира A_i в базовой системе координат XYZ соответственно, $\overline{oa_i}$ вектор положения каждой точки a_i в подвижной системе координат хуз.

Из уравнения (5) следует:

$$\overline{A_ia_i} = \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_{i1} \\ a_{i2} \\ a_{i3} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} A_{i1} \\ A_{i2} \\ A_{i3} \end{bmatrix} \quad (i = 1, 2 \dots 6) \quad (6)$$

Длина штока: $l_i = \begin{bmatrix} l_{i1} \\ l_{i2} \\ l_{i3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x \\ y \\ z \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} a_{i1} \\ a_{i2} \\ a_{i3} \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} A_{i1} \\ A_{i2} \\ A_{i3} \end{bmatrix}$.

Таким образом, длина штока 6-DOF системы микропозиционирования типа «гексапод» $l_i = \sqrt{l_{i1}^2 + l_{i2}^2 + l_{i3}^2}$, где l_{ij} ($i = 1, 2 \dots 6, j = 1, 2, 3$) проекция длины штока l_i на три оси базовой системы координат соответственно.

Угол между штоком и плоскостью основания θ_i ($i = 1, 2, 3 \dots 6$) при условии

$$n_i = (n_{xi} \quad n_{yi} \quad n_{zi})^T = \overline{A_ia_i} \times \overline{OA_i}. \quad (7)$$

При этом положение подвижной платформы известно:

$$\overline{A_ia_i} = (x_i \quad y_i \quad z_i)^T, \quad \overline{A_ia_i} = (x'_i \quad y'_i \quad z'_i)^T \quad (8)$$

Из формулы (3) получим следующее:

$$\begin{aligned} n_{xi} &= y_i z'_i - z_i y'_i \\ n_{yi} &= z_i x'_i - x_i z'_i \\ n_{zi} &= x_i y'_i - y_i x'_i. \end{aligned}$$

Таким образом, угол между штоком и плоскостью основания

$$\theta_i = \arcsin \frac{n_{zi}}{\sqrt{n_{xi}^2 + n_{yi}^2 + n_{zi}^2}} \quad (i = 1, 2 \dots 6)$$

4. Выводы

В статье представлены результаты разработки терапевтического кресла для протонной лучевой терапии пациентов, которое позволяет выполнять прецизионные перемещения размещенного в нем пациента. На основе анализа функциональных требований разработаны механизм регулировки положения с шестью степенями свободы и устройство фиксации головы с двумя степенями свободы. Выполнение статического анализа с помощью программного обеспечения Autodesk INVENTOR Professional показало рациональность предлагаемой конструкции несущей рамы кресла. Путем упрощения представления конструкции терапевтического кресла и проведенного анализа кинематических связей рассчитаны уравнения обратной кинематики параллельной структуры 6-DOF, которые закладывают основу для анализа рабочего пространства и структурной оптимизации терапевтического кресла при дальнейшей разработке.

Литература

1. D. Schardt and P. Heeg, "Device for positioning a tumour patient with a tumour in the head or neck region in a heavy ion therapy chamber," 2003. U.S. Patent 20030164459A1.
2. L.V. Behr, "Patient positioning device," U.S. Patent 4446587, 2012.
3. Z.H. Wang and M. Wang, "An automatic chair for treating head and neck cancer with protons and heavy ions," C.N. Patent 107007946A, 2017.
4. W.Q. Qiu, Y.S. Wu, W. Lu, Z.J. Zhang, P.Q. Lan, and A.C. Luis, "Sitting position fixing device for particle radiotherapy," C.N. Patent 106512238A, 2017.
5. Design Analysis and Experimental Study of Robotic Chair for Proton Heavy Ion Radiotherapy.
6. P. Xiao and S. Shao: Current situation of construction of proton and heavy ion radiotherapy equipment in China // Journal of Rare and Uncommon Diseases. 2014. V. 21. No. 2. P. 1–5.
7. Chernykh A.N. Radiation oncology ophthalmic center based on the c-80 accelerator at the NRC "Kurchatov institute" – PNPI / A. N. Chernykh, V. S. Khoroshkov, G. I. Klenov // 26th Russian Particle Accelerator Conference RUPAC2018, Protvino, Russia JACoW, Proceedings of RuPAC–2018. – Protvino, 2018. P. 145–148.
8. Пат. на изобретение RU 2680208. Способ протонной лучевой терапии внутриглазных злокачественных новообразований / Бородин Ю.И., Хорошков В.С., Черных А.Н. и др. – Оpubл. 18.02.2019.
9. Мамаев Ю.А. Динамика движения робота-станка с параллельной кинематикой (гексапода) для окончательной обработки деталей сложной геометрии: Диссертация
10. Шпякин И.К. Получение кинематической и динамической модели гексапода для создания алгоритма управления движением манипулятора.
11. Y.D. Zhang, Z.K. Yang, and S.J. Guo, "Design and kinematic analysis of positioning chair for proton heavy ion radiotherapy," in International Conference on Biological Information and Biomedical Engineering, IEEE, Shanghai, China, 2018. June.

Сведения об авторе

Алексей Николаевич Черных
ст. науч. сотр.
НИИ «Курчатовский институт»
Эл. почта: chernykh-aleksey@yandex.ru
Москва, Россия

Information about author

Aleksey Nikolaevich Chernykh
senior researcher
NRC «Kurchatov institute»
E-mail: chernykh-aleksey@yandex.ru
Moscow, Russia

УДК 612.821
ГРНТИ 76.03.53
DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.06

¹Жаворонкова Л.А., ²Максакова О.А., ¹Кушнир Е.М., ²Скоряткина И.Г.
¹ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
²ФГАУ «НМИЦ» нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И РЕАБИЛИТАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДВОЙНЫХ ЗАДАЧ ПРИ ТРАВМЕ МОЗГА

У пациентов с травмой мозга средней тяжести выявлено доминирование когнитивного дефицита при одновременном выполнении моторных и когнитивных заданий. Включение двойных задач в реабилитационную программу пациентов выявило преимущественное восстановление когнитивных функций.

Ключевые слова: двойные задачи, когнитивные функции, диагностика, реабилитация

¹Zhavoronkova L.A., ²Maksakova O.A., ¹Kushnir E.M., ²Skorjatina I.G.
¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS
²National Medical N.N. Burdenko Neurosurgery Center of Neurosurgery

DIAGNOSTIC AND REHABILITATION OPPORTUNITIES OF DUAL-TASKS FOR BRAIN TRAUMA

Complex clinical, EEG and stabilographic examination revealed predominantly cognitive deficit in patients with moderate traumatic injury (mTBI) while dual tasks were performed. The EEG data demonstrated a decrease in the coherence for slow (delta-theta) rhythms in the frontal-temporal areas predominantly of the left hemisphere during cognitive tasks performance in patients. In healthy subjects an increase of EEG coherence for slow spectral bands was observed in these brain areas by contrast. An increase of EEG coherence was obtained for fast spectral bands - alpha2 and beta, predominantly at the right hemisphere while the motor components of the dual tasks were performed in healthy adults and patients. Rehabilitation course involving the use of dual-tasking contributed to a predominant reduction in cognitive deficits and an increase of EEG coherence at the frontal-temporal areas of the left hemisphere. So, dual-tasks may be used as diagnostic tool in patients after mTBI. Pilot studies allowed the proposed also rehabilitation effect of dual-tasking in mTBI patients with primary and predominant restoration of cognitive functions and recovery of EEG coherence for slow spectral bands after rehabilitation course. So, our data allowed to propose that dual-tasks may be used as diagnostic as well rehabilitation tool in patients after mTB with the most sensitivity of the left hemisphere to traumatic effect and rehabilitation procedures.

Keywords: dual tasks, cognitive functions, diagnostic, rehabilitation

Последствия черепно-мозговой травмы (ЧМТ) средней тяжести часто проявляются в том, что пациенты после такой травмы при отсутствии отчетливых неврологических и психических нарушений нередко сталкиваются с проблемой продолжения своей профессиональной деятельности. Преимущественно это касается профессий, связанных с высокими информационными нагрузками. В таких случаях требуется специальная диагностическая программа, а также специальная реабилитация, способствующая профессиональной и социальной адаптации пациентов. В последние годы в международной научной и практической медицине используются так называемые двойные задачи, моделирующие сложные информационные нагрузки, с которыми встречается человек в современной профессиональной деятельности [1 - 3]. При выполнении двойных задач испытуемый или пациент одновременно выполняет моторную и когнитивную задачу (walking and talking). Несмотря на многочисленные исследования, посвященные данной тематике, нейрофизиологические механизмы особенностей работы мозга здоровых людей и пациентов с последствиями ЧМТ при таких нагрузках изучены недостаточно. В наших исследованиях в течение последних лет мы в качестве моторной задачи использовали поддержание или изменение позы, а в качестве когнитивных задач – счетно-логическую деятельность [4, 5]. Комплексный подход, позволяющий оценить разные стороны деятельности человека в условиях выполнения двойных задач, представляется наиболее эффективным. Именно поэтому мы использовали количественные клинические шкалы для общей оценки деятельности пациентов в различных сферах (когнитивной, моторной и др.). Для оценки особенностей поддержания или изменения позы (моторная составляющая) использовали стабิโลграфическое исследование, а для анализа мозговой деятельности – электроэнцефалографию (ЭЭГ).

В исследовании приняли участие 17 здоровых испытуемых (11 мужчин и 6 женщин, средний возраст $26,7 \pm 5,1$ лет). Группа пациентов включала 11 человек (7 мужчин и 4 женщины, средний возраст $25,6 \pm 5,8$ лет), обследованных в разные сроки (от трех до 12 месяцев) после ЧМТ средней тяжести и отсутствии гемипарезов. Критерием включения пациентов в группу исследования была способность самостоятельно поддерживать и изменять позу и выполнять инструкции экспериментатора, в том числе, способность осуществлять когнитивные задания. Все испытуемые и пациенты в соответствии с опросником Аннет были правшами и подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Количественная оценка дефицита в различных сферах оценивалась с помощью следующих международных клинических шкал: MPAI (Mayo-Portland Adaptability Inventory); FIM (Functional Independence Measure); MMSE (Mini Mental State Examination) и шкала Берга [6]. Стабилографическое исследование осуществлялось на стабилографической платформе ("Стабилан 0.1, Россия). Испытуемого или пациента инструктировали поддерживать или изменять определенную позу. Анализировали комплекс стабилографических показателей. Качество выполнения моторного задания оценивалось автоматически с помощью стабилографического оборудования. Когнитивные задания включали в себя счетно-логические задачи в виде подсчета количества низких звуков при предъявлении чередующихся высоких и низких звуков через слуховой анализатор. При выполнении другой задачи необходимо было посчитать количество предметов определенной категории (еда, одежда и др.).

Телеметрическую монополярную ЭЭГ регистрировали от 19 областей коры ("Энцефалан", Россия) с последующим вычислением параметров когерентности для различных пар отведений и традиционных диапазонов ритмов. Экспериментальная ситуация заключалась в том, что испытуемый сначала выполнял моторные и когнитивные задания изолированно, а потом – одновременно – двойные задачи. У четырех пациентов в качестве пилотного исследования была проведена реабилитация с использованием двойных задач. Важно отметить перечисленные двойные задачи использовались как контрольные до и после реабилитации, а во время реабилитации использовались другие двойные задачи. Это было сделано для того, чтобы пациенты не просто запоминали их, а обучались одновременно выполнять два задания. Курс реабилитации продолжался в течение 1.5-2 месяцев и включал два занятия в неделю по 30-40 минут каждое.

Результаты клинического исследований показали, что у пациентов после ЧМТ максимальные отклонения от нормативных данных наблюдались в когнитивной сфере – MMSE пациентов $23,7 \pm 3,3$, в норме – 30 баллов. Показатели позного контроля отличались от нормативных незначительно – шкала Берга $54,7 \pm 1,3$, при норме – 56 баллов. По данным стабилографии и поведенческим тестам выявлено, что когнитивные нагрузки при выполнении изолированных когнитивных заданий у пациентов были сопоставимы с нормативными данными, в то время как при выполнении двойных задач были достоверно снижены. По данным стабилографии отличия между изолированными и двойными заданиями отличались от нормативных показателей незначительно. По данным ЭЭГ пациентов максимальные отклонения от нормативных показателей выявлялись при выполнении когнитивного компонента в виде снижения показателей когерентности ЭЭГ для медленных ритмов – тета и дельта-диапазонов преимущественно в лобно-височных отделах левого полушария. В отличие от этого у здоровых людей для этих показателей выявлено увеличение показателей когерентности. Можно полагать, что когнитивный дефицит и описанные нарушения реактивных перестроек ЭЭГ с максимальным проявлением для медленных ритмов в лобно-височных отделах левого полушария являются диагностическим маркером нарушения работы мозга пациентов после травматического поражения средней тяжести.

У пациентов с последствиями ЧМТ реабилитация с использованием двойных задач выявила положительную динамику в когнитивной сфере у всех пациентов. По данным ЭЭГ это сопровождалось преимущественным увеличением когерентности медленных ритмов преимущественно в лобно-височных отделах левого полушария. Однако у одного из четырех пациентов такая положительная динамика сопровождалась незначительным снижением по-

казателей позного контроля. Следует отметить, что этот пациент был старше остальных (около 30 лет), срок после травмы также был большим – 12 месяцев. Таким образом, проведенное исследование позволяет предположить, что использование двойных задач имеет положительные перспективы, однако имеет и ограничения в виде сроков после ЧМТ, возраста пациентов и, вероятно тяжести травмы.

На данном этапе исследования не представляется в полной мере оценить эффективность включения в реабилитационный процесс двойных задач из-за малого объема исследований, тем не менее, результаты комплексного исследования позволили выявить у пациентов в ранние сроки после ЧМТ средней тяжести положительную динамику в когнитивной сфере после курса реабилитации с использованием двойных задач. Для получения более убедительных данных в пользу такого предположения, требуется проведение дальнейших специальных исследований, в том числе оценку реабилитационного эффекта в разные сроки после ЧМТ. В то же время уже на этой стадии исследования понятно, что двойные задачи могут быть не только информативным диагностическим инструментом, но и перспективным реабилитационным подходом при создании индивидуальных реабилитационных программ пациентов с последствиями ЧМТ.

Авторами выявлены новые фундаментальные закономерности функционирования мозга человека в условиях травматического поражения, в частности, было показано, что левое полушарие мозга более чувствительно и повреждающим воздействиям травматического генеза, и к реабилитационным процедурам. Это согласуется с предыдущими исследованиями [7], полученными при использовании фМРТ данных у пациентов с такой же формой церебральной патологии.

Поддержано грантом РФФИ №18- 013-00355

Литература

1. Hamilton F., Rochester L., Paul L. (2009) Walking and talking: an investigation of cognitive-motor dual tasking in multiple sclerosis, *Mult. Scler.*, 15, 1215, [https://doi: 10.1177/1352458509106712](https://doi.org/10.1177/1352458509106712)
2. Erickson K.I., Colcombe S.J., Wadhwa R., Bherer L., Peterson M.S., Scalf P.E., Kramer A.F. (2005) Neural correlates of dual-task performance after minimizing task-preparation. *Neuroimage*, 28, 967–979. [PubMed: 16109493]
3. Cocchi L., Zalesky A., Toepel U., Whitford T.J., De-Lucia M.J., Murray M.M., Carter O. (2013). Dynamic changes in brain functional connectivity during concurrent dual-task performance. *Plos One*, 6, 11, e28301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028301>
4. Жаворонкова Л.А., Кушнир Е.М., Жарикова А.В., Купцова С.В., Шевцова Т.П., Куликов М.А., Воронов В.Г. (2015) Электроэнцефалографические характеристики здоровых людей с разной успешностью выполнения двойных задач (позный контроль и счет) // *Журнал Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии*. 65, 5, 597–606.
5. Zhavoronkova L., Shevtsova A. Pozdneev, S. Kuptsova, O. Maksakova, A. Zharikova, E. Kushnir. (2017) Brain mechanisms impairment of dual-task processing in traumatic brain injury patients. *Functional Neurology, Rehabilitation and Ergonomics*. 7, 3, 253–263.
6. Malec, J.F.(2004) Comparability of Mayo-Portland Adaptability Inventory ratings by staff, significant others and people with acquired brain injury. *Brain Inj.*, 18, 6, 563.
7. Zhavoronkova L., Moraresku S., Boldyreva G., Sharova E., Kuptsova S., Smirnov A., Masherov E., Maksakova O, Pronin I. (2019). fMRI and EEG reactions to hand motor tasks in patients with mild traumatic brain injury: left-hemispheric sensitivity to trauma. *Journal of Behavioral and Brain Science*, 9, 273–287. <https://doi.org/10.4236/jbbs.2019.96020>.

Сведения об авторах

Жаворонкова Людмила Алексеевна

д-р биол. наук

Эл. почта: lzhavor@nsi.ru

*Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН*

Москва, Россия

Максакова Ольга Арсеньевна

к-т мед. наук

Эл. почта: omaksakova@nsi.ru

*Национальный медицинский
центр нейрохирургии им. акад. Н.Н Бурденко.*

Москва, Россия

Кушнир Елена Михайловна,

мл. научн. сотр.

Эл. почта: ekushnir@nsi.ru

*Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН*

Москва, Россия,

Скорятина Ирина Геннадиевна

научн сотр,

Эл. почта: iskorjatina@nsi.ru

*Национальный медицинский
центр нейрохирургии им. акад. Н.Н Бурденко.*

Москва, Россия

Information about authors

Zhavoronkova Ludmila Alexeevna

Dr. of biol. sci.,

E-mail: lzhavor@nsi.ru

*Institute of higher nervous activity
And neurophysiology RAS*

Moscow, RF

Maksakova Olga Arsen'evna

Medical PHD,

E-mail: : omaksakova@nsi.ru

*Nationa medical neurosurgical
center named acad. N.N. Burdenko,*

Moscow Russia

Kushnir Elena Mikhailovna,

senior researcher

E-mail: ekushnir@nsi.ru

*Institute of higher nervous activity
And neurophysiology RAS*

Moscow, RF

Skorjatina Irina Gennadievna

scientist researcher

E-mail: iskorjatina@nsi.ru

*Nationa medical neurosurgical
Center named acad. N.N. Burdenko*

Moscow Russia

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ

В этнической группе русских, жителей Республики Башкортостан, установлены возрастзависимые изменения в частотах аллелей и генотипов по SNV генов SOD1, SOD2, PON1, NQO1, GPX1. Ферменты, кодируемые этими генами, участвуют в метаболизме активных форм кислорода первого и второго этапов, а также токсичных соединений эндогенной и экзогенной природы.

Ключевые слова: продолжительность жизни, этническая принадлежность, антиоксидантная система, генетический полиморфизм, анализ ассоциаций

V.V. Erdman¹, T.R. Nasibullin¹, I.A. Tuktarova¹, Ya.R. Timasheva¹,
K.V. Danilko², A.Z. Matua³, T.V. Viktorova²

¹Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Center RAS

²Bashkir State Medical University

³Scientific-Research Institute of Experimental Pathology and Therapy
of the Academy of Sciences of Abkhazia

POLYMORPHISM OF ANTIOXIDANT DEFENSE GENES AND LIFESPAN

In the ethnic group of Russians, residents of the Republic of Bashkortostan, age-dependent changes in the alleles and genotypes frequencies in SOD1, SOD2, PON1, PON2, NQO1, GPX1 genes SNVs were found. Enzymes, encoded by these genes, are involved in the metabolism of reactive oxygen species of the first and second stages, as well as toxic compounds of endogenous and exogenous nature.

Keywords: lifespan, ethnicity, antioxidant system, gene polymorphism, association analysis

Введение. Продолжительность жизни (ПЖ) человека можно расценивать как количественный показатель степени адаптации организма к внешним условиям. Достижение крайне преклонного возраста свидетельствует о наиболее успешном характере ответа организма на генетическом, физиологическом, психо-эмоциональном уровнях на разнообразные стимулы внешней среды. В ряду значимых для гомеостаза организма молекулярно-генетических факторов стоят гены, продукты которых задействованы в формировании первичной ответной реакции клетки на внешние агенты, в частности, на молекулы кислорода и его активные формы (АФК). При этом АФК играют важную роль не только в физиологических, нормальных условиях, но и в условиях воздействия на клетку патогенных факторов. Окислительный стресс является одним из патофизиологических механизмов, принимающих участие в развитии множества возраст-ассоциированных заболеваний, таких, как атеросклероз, нарушение мозгового кровообращения, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет, а также онкологических и нейродегенеративных патологий [1, 2]. Начиная с середины 20 века, концепция свободнорадикальной теории старения рассматривалась как приоритетная [3-5]. И сейчас данный процесс широко изучается в связи со старением организма [6-11]. С другой стороны, результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что АФК, выступая в качестве индукторов огромного количества биохимических каскадов, играют ключевую роль во множестве клеточных и внеклеточных процессов. За счет своих реакционных способностей АФК стимулируют иммунную систему, активируют ионный транспорт, запускают апоптоз, участвуя тем самым в регуляции основных функций клетки. То есть окислительный стресс используется организмом как защитный механизм, а АФК можно расценивать как индукторы адаптационного процесса [12].

Поскольку различные эндогенные и экзогенные вещества и токсичные продукты метаболизма, в том числе свободные радикалы, разрушают макромолекулы и запускают каскад реакций множества сигнальных путей, приводящих к старению, одним из детерминирующих ПЖ факторов может выступать скорость и эффективность работы системы антиоксидантной защиты (АОЗ).

Мы идентифицировали ряд генов, кодирующих ферменты метаболизма свободных радикалов, которые принимают участие в широком спектре биологических процессов, раз-

вивающихся с возрастом, и закономерно ассоциированы с возраст-зависимыми заболеваниями. Индивидуальные особенности функционирования генов во многом детерминированы их структурной особенностью, в частности, присутствием однонуклеотидных замен (SNV – single nucleotide variants) на протяжении всей последовательности гена. Это определяет аллельное состояние гена, ассоциированное с фенотипическими особенностями организма.

Цель исследования состояла в изучении возрастзависимых особенностей распределения частот аллелей и генотипов по полиморфным локусам генов ферментов антиоксидантной защиты у этнических русских, проживающих в Республике Башкортостан (РБ).

Материалы и методы. Исследование выполнено в соответствии с этическими принципами проведения медико-биологических исследований с участием человека в качестве субъекта, закрепленными в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации [World Medical Association, 2013], и одобрено комитетом по биоэтике ИБГ УФИЦ РАН. Все обследуемые лица дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. В целом вся выборка сформирована из лиц, физически сохранных по сердечно-сосудистой и нервной системе. В отношении людей старшей возрастной когорты (лиц пожилого и старческого возраста, долгожителей), у которых возрастное изменение функций органов сердечно-сосудистой системы является, за редким исключением, практически нормой, допускалось наличие в анамнезе атеросклероза, кардиосклероза и церебросклероза. Для долгожителей разработана специальная позиция – так называемая «успешность», проявляющаяся в способности самообслуживания, физической активности, сохранности сознания.

Была сформирована выборка лиц, принадлежащих к этнической группе русских, проживающих на территории Республики Башкортостан, включающая 490 человек в возрасте от 1 до 102 лет. Общая выборка была дифференцирована на возрастные группы, выделенные на основе антропометрических, физиологических и биохимических особенностей онтогенеза [13].

В качестве материала для исследования использовали образцы ДНК, выделенные из 8 мл периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции [14].

Аллельные варианты изучаемых полиморфных сайтов 14ти генов определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей обработкой ампликонов эндонуклеазой рестрикции, с использованием аллель-специфичных праймеров или методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Условия проведения эксперимента, олигонуклеотидные последовательности для идентификации полиморфных локусов генов были подобраны с помощью приложения PrimerSelect 5.05 из пакета программы DNASTar Inc и базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Соответствие наблюдаемых частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди–Вайнберга тестировали в программе Arlequin (V. 3.0). Заключение о наличии ассоциаций отдельных полиморфных локусов с возрастом основывалось на результатах анализа данных попарного сравнения частот генотипов/аллелей в двух контрастных возрастных группах с помощью точного двустороннего критерия Фишера (SPSS V.21.0). В качестве поправки на множественность сравнений использовался FDR-коэффициент (WinPepi V.11.39). Возрастная динамика частот генотипов была изучена с помощью логистического регрессионного анализа; возрастные интервалы определялись с использованием ROC-анализа (SPSS V.21.0).

Результаты и обсуждение. В этнической группе русских установлены возрастзависимые изменения в частотах аллелей и генотипов по SNV генов *SOD1*, *SOD2*, *PON1*, *NQO1* и *GPX1*. Анализ попарного сравнения лиц, принадлежащих к разным возрастным группам, выявил следующее. Среди лиц старческого возраста и долгожителей, по сравнению с лицами второго зрелого возраста, повышена частота генотипа *SOD1**A/A (87.93% и 90.7% против 75.45%, $P=0.009$, $P_{FDR}=0.05$ и 0.043, $P_{FDR}=0.05$ соответственно) и более чем в два раза понижена частота генотипа *SOD1**A/G (11.49% и 9.3% против 24.55%, $P=0.005$, $P_{FDR}=0.08$). Установлено снижение частоты генотипа *SOD2**C/C среди лиц старческого возраста, по сравнению с лицами первого и второго зрелого возраста (11.8% против 23.48% и 21.82%, $P=0.009$,

$P_{FDR}=0.05$ и $0,029$, $P_{FDR}=0.077$ соответственно). Обнаружено снижение частоты генотипа *PONI**A/A среди лиц второго зрелого возраста в сравнении с лицами первого зрелого возраста (51.38 против 64.1%, $P=0.03$, $P_{FDR}=0.077$). Частоты аллеля *NQOI**C и генотипа *NQOI**C/C статистически значимое выше среди лиц старческого возраста (97.19 и 94.38% соответственно) в сравнении с исследуемыми юношеского и первого зрелого возраста (93.38 и 86.76% соответственно), $P=0.03$, $P_{FDR}=0.077$. Для лиц второго зрелого возраста характерно снижение числа носителей генотипа *GPXI**C/T (37.14%) по сравнению с объединенной группой лиц детского, подросткового, юношеского и первого зрелого возраста (50.38%, $P=0.04$, $P_{FDR}=0.08$) и, соответственно, повышение числа носителей генотипа *GPXI**T/T (13.33 против 5.34%, $P=0.03$, $P_{FDR}=0.08$).

Таким образом, в этнической группе русских с возрастом ассоциированы полиморфные маркеры rs1050450 гена *GPXI* и rs662 гена *PONI*, которые отвечают за изменение ферментативной активности глутатионпероксидазы 1 и параоксоназы 1, соответственно, а аллельные варианты выступают рисковыми в отношении развития ряда возраст-зависимых заболеваний. Со старением в исследуемой группе ассоциирован генотип *NQOI**rs1131341*C/C, связанный с нормальной активностью фермента НАД(Ф)Н-хиноноксидоредуктазы-1; также среди лиц старческого возраста снижена частота генотипа *SOD2**rs4880*C/C, ассоциированного с дефицитом супероксиддисмутазы 2. Среди русских, достигших долголетия, наблюдается повышение частоты протективного в отношении ряда возраст-зависимых заболеваний генотипа *SOD1**rs2070424*A/A.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Впервые среди лиц русской этнической принадлежности, проживающих на территории РБ, проведен возраст-зависимый анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфным маркерам генов ферментов метаболизма свободных радикалов, которые участвуют в защите организма от окислительного стресса и регулируют его редокс-статус. С увеличенной ПЖ ассоциированы полиморфные маркеры, кодирующие ферменты метаболизма АФК первого (*SOD1* и *SOD2*) и второго (*NQOI* и *GPXI*) этапов, а также гидролитической биотрансформации токсичных соединений эндогенной и экзогенной природы (*PONI* и *NQOI*). Полученные результаты важно учитывать при медико-генетическом тестировании с целью определения аллелей риска возраст-ассоциированных заболеваний, ограничивающих ПЖ, а также для выявления генетических мишеней для фармакологического воздействия при лечении лиц пожилого и старческого возраста.

Грантовая поддержка. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и АНА в рамках научного проекта № 19-54-40007.

Литература

1. Воробьева Е.Н., Воробьев Р.И. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе болезней системы кровообращения // Сибирский научный медицинский журнал. 2005. № 4. Р. 24–30.
2. Ray R., Shah A.M. NADPH oxidase and endothelial cell function // Clin. Sci. (Lond). 2005. V. 109. № 3. Р. 217–226. <https://doi.org/10.1042/CS20050067>
3. Harman D., Heidrick M.L., Eddy D.E. Free Radical Theory of Aging: Effect of Free-Radical-Reaction Inhibitors on the Immune Response // Journal of the American Geriatrics Society. 1977. V. 25. №. 9. Р. 400-407. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1977.tb00674.x>
4. Harman D. Free radical theory of aging: history // Free radicals and aging. Birkhäuser Basel, 1992. Р. 1–10.
5. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009 // Biogerontology. 2009. V. 10. №. 6. Р. 773. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9234-2>
6. Анисимов В.Н. Приоритетные направления фундаментальных исследований в геронтологии: вклад России // Успехи геронтологии. 2003. № 12. С. 9.
7. Скулачев В.П. Новые сведения о биохимическом механизме запрограммированного старения организма и антиоксидантной защите митохондрий // Биохимия. 2009. Т. 74. № 12. С. 1718–1721.
8. Тодоров И.И. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе // Российский химический журнал. 2007. Т. 51. №

1. С. 93–106.

9. Soerensen M., Dato S., Tan Q. et al. Human longevity and variation in GH/IGF-1/insulin signaling, DNA damage signaling and repair and pro/antioxidant pathway genes: cross sectional and longitudinal studies // *Experimental gerontology*. 2012. V. 47. N. 5. P. 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.02.010>

10. Hegde M.L., Mantha A.K., Hazra T.K. et al. Oxidative genome damage and its repair: implications in aging and neurodegenerative diseases // *Mechanisms of ageing and development*. 2012. V. 133. N. 4. P. 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.01.005>

11. Levy D., Reichert C.O., Bydlowski S.P. Paraoxonases activities and polymorphisms in elderly and old-age diseases: An overview // *Antioxidants*. 2019. V. 8. N. 5. P. 118. <https://doi.org/10.3390/antiox8050118>

12. Новиков В.Е., Левченко О.С., Пожилова Е.В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2014. Т. 12. № 4.

13. Хрисанфова Е.Н. Основы геронтологии (Антропологические аспекты). –М.: Владос, 1999. 151 с.

14. Mathew C. C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // In: J. M. Walker (ed.). *Methods in molecular biology*. New York: Haman Press, 1984. P. 31–34.

Сведения об авторах

Вера Викторовна Эрдман

канд. биол. наук, научн. сотр.

Эл. почта: danivera@mail.ru

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН
Уфа, Россия

Тимур Русланович Насибуллин

канд. биол. наук, старш. научн. сотр.

Эл. почта: nasibullintr@yandex.ru

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН
Уфа, Россия

Ильсияр Авхатовна Туктарова

канд. биол. наук, старш. научн. сотр.

Эл. почта: iltuk@mail.ru

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН
Уфа, Россия

Янина Римовна Тимашева

канд. биол. наук, научн. сотр.

Эл. почта: ianina_t@mail.ru

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН
Уфа, Россия

Ксения Владимировна Данилко

канд. биол. наук, доцент

Эл. почта: kse-danilko@yandex.ru

Башкирский государственный медицинский университет
Уфа, Россия

Алиса Зауровна Матуа

канд. биол. наук, доцент

Эл. почта: azmatua76@mail.ru

Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии АНА
Сухум, Абхазия

Татьяна Викторовна Викторова

докт. мед. наук, проф., зав. каф.

Эл. почта: t_vict@mail.ru

Башкирский государственный медицинский университет
Уфа, Россия

Information about authors

Erdman Vera Viktorovna

Ph.D., research scientist

E-mail: danivera@mail.ru

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,
Ufa, Russia

Nasibullin Timur Ruslanovich

Ph.D., senior research scientist

E-mail: nasibullintr@yandex.ru

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,
Ufa, Russia

Tuktarova Ilsiav Avkhatovna

Ph.D., senior research scientist

E-mail: iltuk@mail.ru

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,
Ufa, Russia

Timasheva Yanina Rimovna

Ph.D., research scientist

E-mail: ianina_t@mail.ru

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,
Ufa, Russia

Danilko Ksenia Vladimirovna

Ph.D., senior research scientist

E-mail: kse-danilko@yandex.ru

Bashkir State Medical University
Ufa, Russia

Matua Alisa Zauravna

Ph.D., senior research scientist

E-mail: azmatua76@mail.ru

Scientific-Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia
Sukhumi, Abkhazia

Viktorova Tatiana Viktorovna

DSc, professor

E-mail: t_vict@mail.ru

Bashkir State Medical University
Ufa, Russia

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ

Установлена экспрессия транскрипционного фактора Oct4 и лиганда Shh в различные этапы постнатального развития коркового вещества надпочечников крыс и их роль в поддержании функциональной активности и тканевого гомеостаза надпочечников.

Ключевые слова: надпочечник, корковое вещество, транскрипционная регуляция, постнатальное развитие, Oct4, Shh

Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V.
FSBI "Research Institute of Human Morphology"

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF ADRENAL CORTEX POSTNATAL DEVELOPMENT AND FUNCTION

Expression of transcriptional factor Oct4 and Shh in rat adrenal cortex during postnatal development and the role for this factors in functional activity of adrenal cortex and tissue homeostasis was determined.

Key words: adrenal gland, adrenal cortex, transcriptional regulation, postnatal development, Oct4, Shh

Постнатальное развитие коркового вещества надпочечников включает формирование структурно-функциональных зон и дальнейшее их развитие. Транскрипционная регуляция постнатального развития коркового вещества мало изучена. Известно, что в пренатальном периоде основными факторами, определяющими формирование адреногонадного зачатка являются Wilm's tumor, экспрессия которого начинается в урогенитальной борозде и продолжается уже в зачатках надпочечников, почек, гонад [1]. Судьбу клеток и их дифференцировку по стероидогенному пути являются Sf1 и Dax [2, 3]. SF1 (стероидогенный фактор) – орфанный ядерный рецептор, является основным транскрипционным фактором, определяющим фенотип будущих кортикостероцитов, чья экспрессия отмечается и в фетальной коре и в дальнейшем во всех структурно-функциональных зонах. Активность SF1 модулируется другим орфанным ядерным рецептором Dax1, являющимся репрессором SF1. По сути его экспрессия поддерживает баланс между самообновлением прогениторных клеток и их дифференцировкой. PBX1, гомеобоксный протеин, характерный для клеток мезодермального происхождения, взаимодействует с вышеуказанными транскрипционными факторами и регулирует экспрессию генов, в частности стероидогенных ферментов. Важную роль в эмбриональном развитии играют транскрипционный фактор Oct4, модулирующий поддержание клетками плюрипотентного состояния и вступление в дифференцировку [4] и лиганда семейства морфогенетических белков Sonic Hedgehog (Shh), характерного для клеток с низкой степенью дифференцировки [5].

Целью исследования было выявить экспрессию транскрипционного фактора Oct4 и Shh сигнального пути и установить роль этих факторов в постнатальном развитии и функционировании коркового вещества надпочечников.

Материалы и методы

Исследование выполнено на самцах крыс Вистар. Изучали строение коркового вещества надпочечников крыс в возрасте 42-х и 70-ти суток, что соответствует периоду активного развития и завершению роста, соответственно. Проводили световую микроскопию и компьютерную морфометрию коркового вещества в экваториальных срезах надпочечников, окрашенных гематоксилином и эозином. Экспрессию Oct4, Shh, Ki-67 и β -катенина в клетках проводили с методом иммуногистохимии. Полученные количественные данные подвергали статистической обработке с помощью пакета программ Statistica.7.0. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

Наши исследования показали, что у крыс в процессе полового созревания скорость морфогенетических процессов изменяется. Клубочковая зона уменьшается в размерах, а ее

функциональная активность повышается. Пучковая зона напротив, активно развивается, увеличиваясь в размерах, но увеличения продукции гормонов не происходит. Размеры сетчатой зоны изменяются незначительно.

Экспрессия *Ost4* была выявлена и в клубочковой, и пучковой и сетчатой зонах. Однако особенности возрастной динамики численности *Ost4*-позитивных клеток в трех зонах отличались (рис. 1).

В клубочковой зоне после окончания роста коркового вещества их число увеличивалось. Наши предыдущие исследования показали, что усиление секреции минералокортикоидов достигается за счет перестройки секреторного аппарата клеток [6, 7]. А именно, происходит реорганизация митохондриального аппарата с увеличением числа и заменой более крупных митохондрий на меньшие по размерам, что позволяет существенно увеличить внутреннюю поверхность мембран, на которых происходит и начальный и конечный этап синтеза альдостерона. То есть одновременно увеличивается нагрузка на кортикостероциты и создается пул клеток, готовых к переходу к плюрипотентное состояние. Мы рассматриваем это как создание резерва для физиологической регенерации, обусловленное повышением функциональной нагрузки на клетки. В пользу этого предположения свидетельствуют и снижение пролиферативной активности и неменяющийся с возрастом уровень активации канонического *Wnt*-сигналинга, являющегося одним из основных движущих факторов в формировании и росте клубочковой зоны. Это предположение полностью подтвердилось при исследовании уровня продукции альдостерона и количества *Ost4*-позитивных клеток в клубочковой зоне. Мы обнаружили выраженную обратную взаимосвязь этих двух показателей как в пубертатном периоде, так и после наступления половой зрелости, когда появилась и прямая взаимосвязь между числом *Ost4*-позитивных клеток и уровнем пролиферации.

Таким образом, нами была выявлена ранее неизвестная природная закономерность, заключающаяся в способности кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крыс экспрессировать транскрипционный фактор *Ost4* в различные периоды постнатального развития и наличие прямой связи между числом экспрессирующих *Ost4* кортикостероцитов и интенсивностью пролиферативных процессов а также обратной зависимости между функциональной активностью клубочковой зоны и содержанием в ней *Ost4*-позитивных клеток.

В пучковой зоне мы наблюдали иную возрастную динамику *Ost4*, а вернее, ее отсутствие. В данном возрастном диапазоне пучковая зона активно увеличивалась в объеме. Это позволяет снизить функциональную нагрузку на ее клетки, что подтвердили электронно-микроскопические исследования. К моменту завершения роста коркового вещества пролиферативная активность клеток в пучковой зоне была низкой, а параметры активации канонического *Wnt*-сигналинга оставались такими неизменными, как и в клубочковой зоне. То есть опять мы увидели логическую связь между созданием пула клеток, готовых к переходу в плюрипотентное состояние, и уровнем функциональной нагрузки на кортикостероцит. Но такой выраженной корреляции этих параметров как в клубочковой зоне мы не наблюдали.

Сетчатая зона коркового вещества является наименее изученной с точки зрения транскрипционной регуляции ее в постнатальном развитии. Мы установили, что при переходе от полового созревания к половой зрелости активность канонического *Wnt*-сигналинга в ней не изменяется как и в клубочковой и пучковой зонах. К моменту завершения развития коркового вещества уровень пролиферативной активности кортикостероцитов в сетчатой зоне был наименьшим, что связано с функциональным угасанием зоны, так как на 70-ые сутки уже активно функционируют гонады. Численность же *Ost4*-позитивных клеток демонстрировала тенденцию к снижению, то есть опять наблюдалась связь между функциональной нагрузкой на клетки и экспрессией *Ost4* в этой зоне.

Естественно, что при изучении экспрессии *Ost4* в корковом веществе, неизбежно возникает вопрос о промежуточной зоне, чьи клетки традиционно считаются низкодифференцированными клетками. Мы в нашем исследовании не обнаружили экспрессии *Ost4* в клетках промежуточной зоны ни в пубертатном, ни в постпубертатном периоде. Более того, все

выявленные нами Oct4-позитивные клетки по своей цитоморфологии являлись типичными кортикостероцитами, входящими в состав либо клубочков, либо пучков.

Таким образом, мы установили, что существует связь между уровнем экспрессии Oct4 и активностью гормоногенеза, но только в зоне с субстратным типом регуляции секреции она является выраженной, а в зонах с гипоталамо-гипофизарной регуляцией она не столь очевидна, поскольку тропные гормоны гипофиза являются индукторами пролиферативных процессов для пучковой и сетчатой зон и являются механизмом физиологической регенерации.

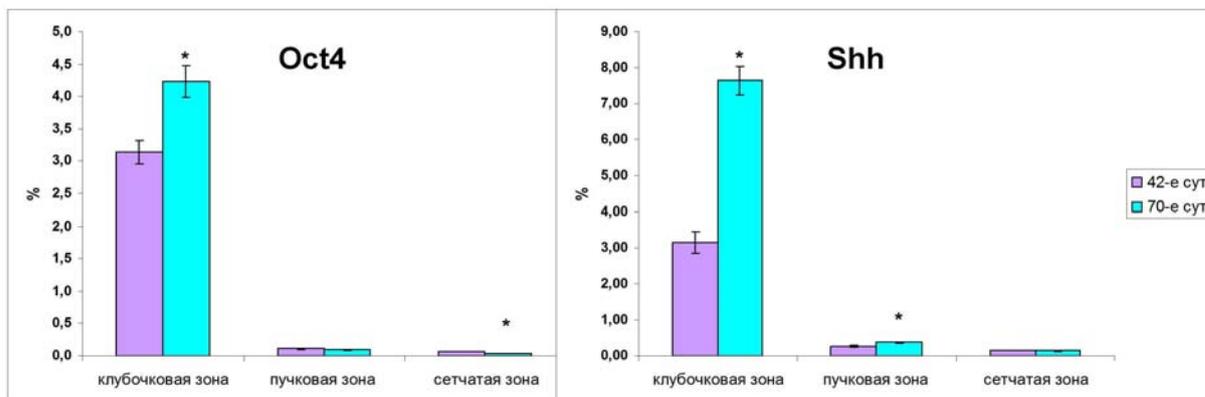


Рис. 1. Изменения численности Oct4- и Shh-позитивных кортикостероцитов в различных зонах коркового вещества надпочечников крыс в постнатальном развитии (M±m).

Примечание: * – статистически значимые отличия от 42-х суток.

В то же время имеется мнение, что транскрипционный фактор Oct4 не играет никакой роли в обеспечении процессов физиологической регенерации [8]. По мнению авторов, доказательством этому является нормальное функционирование органов у нокаутированных по гену Oct4 мышей. С нашей точки зрения, такие утверждения не имеют под собой оснований, так как в организме механизмы всех регуляторных, метаболических и морфогенетических процессов многократно дублируются.

В связи с этим был исследована экспрессия еще одного важного фактора в развитии коркового вещества Sonic hedgehog сигналинг. В связи с тем что Shh-экспрессирующие клетки – это низкодифференцированные клетки, рядом авторов высказывается мнение об их потенциальной роли в поддержании самообновления клеток взрослого организма. Иммуногистохимическое выявление Shh в корковом веществе выявило наличие этого лиганда в ядрах кортикостероцитов всех структурно-функциональных зон коркового вещества (рис. 1). Возрастная динамика численности Shh-позитивных клеток была такой же и у Oct4, но количество их было выше и в периоде роста и после окончания ростовых процессов. В пучковой зоне отличия были более выраженными. И численность Shh-позитивных клеток была выше, и возрастная динамика была иной. Их число увеличивалось с возрастом, то есть создавался пул именно Shh-клеток, а не Oct-позитивных клеток. В сетчатой зоне численность Shh-позитивных клеток не изменялась с возрастом и соответствовала количеству Oct4-позитивных клеток. Численность Shh-позитивных клеток была выше численности Oct4-позитивных клеток и в клубочковой, и пучковой, и сетчатой зонах. То есть у двух функционально значимых для взрослого организма зон – клубочковой и пучковой формировался более крупный пул Shh-позитивных клеток и фактически отсутствие такового в зоне, функциональное значение которой минимизировано, что подтверждает нашу точку зрения о кооперативности факторов, обеспечивающих тканевой гомеостаз и неправомочности утверждения о наличии или отсутствии роли того или иного фактора в физиологической регенерации.

Выводы: Транскрипционный фактор Oct4 и лиганд Shh экспрессируются кортикостероцитами надпочечников и демонстрируют тесную связь с функциональной активностью структурно-функциональных зон и кооперативность в создании пула клеток, необходимых для поддержания тканевого гомеостаза.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: впервые установлена роль эмбриональных факторов поддержания плюрипотентности в постнатальном развитии и физиологической регенерации коркового вещества надпочечников.

Литература

1. Hammer G., Parker K., Schimmer B. Minireview: Transcriptional Regulation of Adrenocortical Development // *Endocrinology*. 2008. Vol. 146. No. 3. P. 1018–1024.
2. Frigeri C., Hanley N.A., Stallings N., Schimmer B.P. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development // *Rec. Prog. Horm. Res.* 2002. Vol. 57. P. 19–36.
3. Phelan J.K., McCabe E.R Mutations in NR0B1 (DAX1) and NR5A1 (SF1) responsible for adrenal hypoplasia congenital // *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 18. P. 472–487.
4. Rizzino A., Wuebben E. Sox2/Oct4: A Delicately Balanced Partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis // *BBA – Gene Regulatory Mechanisms*. 2016. Vol. 1859. N. 6. P. 780–791.
5. Localization of Sonic hedgehog secreting and receiving cells in the developing and adult rat adrenal cortex / L. Guasti [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011. Vol. 336. P. 117–122.
6. Изменения кортикостероцитов клубочковой зоны надпочечников крыс при воздействии низких доз ДДТ в постнатальном развитии / Д.А. Цомартова [и др.] // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2018. № 2 (26). С. 25–30.
7. Возрастные изменения структуры митохондрий – регулятор активности стероидогенеза в кортикостероцитах надпочечников крыс / Н.В. Яглова [и др.] // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2020. Т. 9. № 1. С. 64–70.
8. Webb S. No role for Oct4 in regenerating adult tissues // *Nature Reports stem Cells*. 2007. <https://doi.org/10.1038/stemcells.2007.103>

Сведения об авторах

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл.почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

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

Эл.почта: ober@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Валентин Васильевич Яглов

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

Эл.почта: vyaglov@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Светлана Владимировна Назимова

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

Эл.почта: pimka60@list.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Information about authors

Nataliya Valentinovna Yaglova

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

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obernikhin

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

E-mail: ober@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Valentin Vasilyevich Yaglov

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

E-mail: vyaglov@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: pimka60@list.ru

Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ КЛУБОЧКОВОЙ ЗОНЫ В УСЛОВИЯХ НЕПРЕРЫВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ

Установлена роль транскрипционного фактора Oct4 и канонического Wnt-сигналинга в постнатальном морфогенезе клубочковой зоны надпочечников крыс в условиях пре- и постнатального воздействия низких доз эндокринного дисраптора ДДТ.

Ключевые слова: надпочечник, корковое вещество, транскрипционная регуляция, постнатальное развитие, Oct4, Wnt, эндокринные дисрапторы.

Obernikhin S.S., Yaglova N.V., Yaglov V.V., Nazimova S.V.
FSBI "Research Institute of Human Morphology"

TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF RAT ADRENAL ZONA GLOMERULOSA POSTNATAL DEVELOPMENT EXPOSED TO LOW DOSES OF DDT

The role of the transcription factor Oct4 and canonical Wnt signaling in the postnatal morphogenesis of the glomerular zone of the adrenal glands of rats under the conditions of pre- and postnatal exposure to low doses of DDT endocrine disruptor was determined.

Keywords: adrenal gland, adrenal cortex, transcriptional regulation, postnatal development, Oct4, Wnt, endocrine disrupter.

В последние годы в научной литературе все больше внимания уделяется роли эндокринных дисрапторов, которые представляют собой глобальную проблему для окружающей среды и здоровья человека [1]. Эндокринные дисрапторы – экзогенные соединения, которые могут нарушать синтез, секрецию, транспорт, метаболизм, связывание с рецепторами эндогенных гормонов, тем самым, уменьшают концентрацию эндогенных гормонов, изменяя эндокринную регуляцию и гомеостаз [2]. Имеются данные что, эпигенетические изменения, участвуют в механизмах, связанных с нарушением развития эндокринной системы [3]. Однако механизмы лежащие в основе дисморфогенетического действия эндокринных дисрапторов на постнатальное развитие надпочечников мало изучено. В наших исследованиях было установлено, что пролиферативные процессы в корковом веществе регулируются транскрипционными факторами Oct4 и Nhex [4, 5]. Цель исследования – изучить экспрессию транскрипционного фактора Oct4 и активность канонического Wnt-сигналинга в постнатальном морфогенезе клубочковой зоны надпочечников крыс в условиях пре- и постнатального воздействия низких доз эндокринного дисраптора ДДТ.

Материалы и методы

Работа выполнена на 40 самцах крыс Вистар. Крысы опытной группы (n=20) развивались в условиях непрерывного воздействия низких доз ДДТ. С момента зачатия самки потребляли раствор ДДТ (20мкг/л) вместо питьевой воды, постнатально с молоком матери, а затем самостоятельно. Крысы контрольной группы потребляли питьевую воду. Животных выводили из эксперимента в возрасте 6 недель, что соответствует пубертатному и 10 недель, что соответствует и постпубертатному возрасту, когда рост коркового вещества надпочечника завершается.

Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов надпочечников. Изучение экспрессии Oct4 и β -катенина в кортикостероцитах проводили методом иммуногистохимии с помощью поликлональных кроличьих антител («Abcam» США). Изучение пролиферации кортикостероцитов проводили методом иммуногистохимии с помощью антител к Ki-67 («Cell Marque», США). Реакцию визуализировали с помощью набора реактивов «UltraVision LP Detection System» («ThermoScientific», США). Результаты иммуногистохимических исследований выражали в виде количества иммунопозитивных клеток в мм² площади среза клубочковой, пучковой и сетчатой зон в связи с отсутствием значимых различий в числе кортикостероцитов в единице площади среза на 42-е и 70-е сутки постнатального

развития. В сыворотке крови крыс определяли концентрацию альдостерона методом ИФА с помощью наборов («Cusabio», Китай).

Статистическую обработку данных производили с помощью программы Statistica 7.0 («Statsoft Inc.», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Анализ связи числа β -катенин-, Ki-67-, и Oct4-позитивных кортикостероцитов в клубочковой зоне и концентрации альдостерона проводили с помощью критерия Пирсона. Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

У крыс контрольной группы в возрасте 6-ти недель клубочковая зона была хорошо развита и представляла собой циркулярный слой, располагающийся под капсулой. Отмечалась высокая экспрессия β -катенина кортикостероцитами. β -катенин локализовался преимущественно на цитоплазматических мембранах. Накопление β -катенина в цитоплазме было крайне слабо выражено, но клетки с транслоцированным в ядро β -катенином составляли четверть иммунопозитивных кортикостероцитов (рис.1а). Выявлены высокая пролиферативная активность клеток. Также в клубочковой зоне обнаружено небольшое число Oct4-позитивных кортикостероцитов (рис.2 а). В 10-ти недельном возрасте отмечено уменьшение размеров клубочковой зоны и повышение продукции альдостерона. Число клеток с мембранной локализацией β -катенина уменьшилось, но процент клеток с транслокацией β -катенина в ядро не изменялся. Пролиферативная активность клеток клубочковой зоны уменьшилась, а число Oct4-позитивных кортикостероцитов увеличилось. Наблюдалась обратная корреляция между уровнем экспрессии Oct4 и продукцией альдостерона ($R = -0,83$ $p = 0,0058$) и прямая зависимость числа Oct4- и Ki-67-позитивных клеток ($R = 0,94$ $p = 0,00013$).

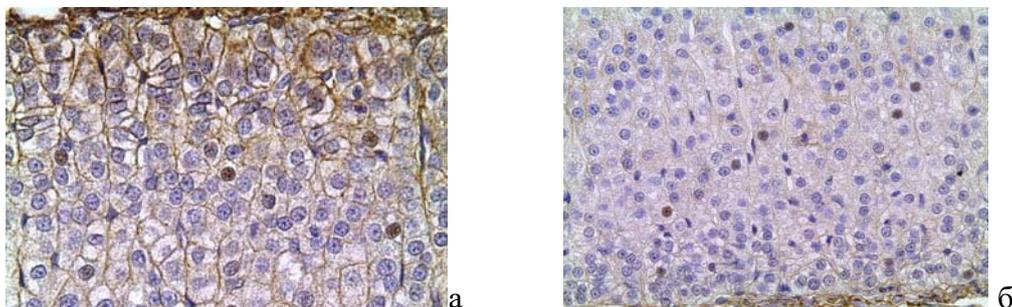


Рис.1. β -катенин-позитивные клетки в клубочковой зоне коркового вещества надпочечников крыс в возрасте 6-ти недель.

а - контрольная группа, б – группа, подвергавшаяся воздействию ДДТ
Иммуногистохимическая реакция с докраской гематоксилином Майера. Ув. 400.

У крыс, подвергшихся воздействию низких доз ДДТ, в возрасте 6-ти недель размеры клубочковой зоны были меньше, так как клубочковая зона имела фрагментарное строение, а продукция альдостерона ниже контрольных значений. Число кортикостероцитов с мембранной локализацией β -катенина было в полтора раза меньше, чем в контрольной группе, а доля клеток с локализацией в цитоплазме превышала контрольные значения. Транслокация β -катенина в ядро была значительно снижена (рис.1б). Пролиферативная активность кортикостероцитов была повышена. Отмечалось увеличение экспрессии Oct4 (рис.2б). В 10-ти недельном возрасте выявлено увеличение размеров клубочковой зоны в отличие от контрольной группы. Пролиферативная активность клеток уменьшилась, как и в контроле. В отличие от контрольных животных, у крыс, развивавшихся при воздействии ДДТ, отмечалось уменьшение Oct4-экспрессирующих клеток. Корреляции между уровнем экспрессии Oct4 и Ki-67, а также продукцией альдостерона сохранялась. Число экспрессирующих β -катенин клеток также уменьшалось с возрастом без изменения его транслокации в ядро в обеих груп-

пах, но уровень активации канонического Wnt-сигналинга был ниже. Однако увеличилось число клеток с накоплением β -катенина в цитоплазме, что указывает на ранние стадии активации Wnt-сигналинга.

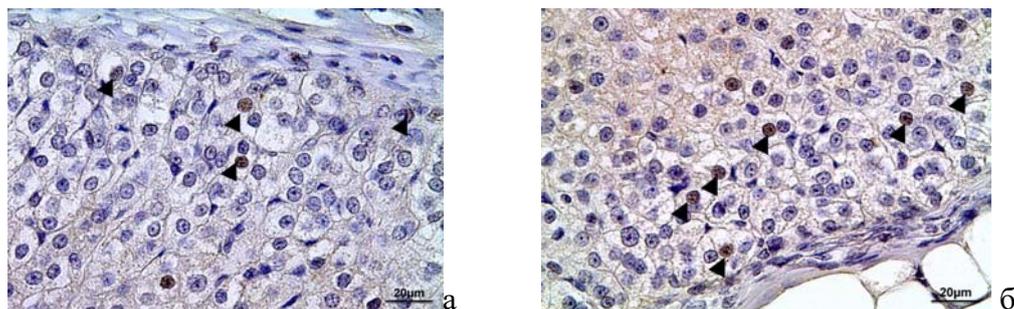


Рис.2 Oct4-позитивные клетки в клубочковой зоне коркового вещества надпочечников крыс в возрасте 6-ти недель.

а - контрольная группа, б – группа, подвергавшаяся воздействию ДДТ.
Иммуногистохимическая реакция с докраской гематоксилином Майера. Ув. 400.

Обсуждение

Результаты морфологического исследования показывают, что пренатальное и постнатальное воздействие эндокринного дисраптора ДДТ приводило к нарушениям морфогенеза клубочковой зоны коркового вещества надпочечника крысы.

Канонический Wnt/ β -катенин-сигналинг – основной транскрипционный регулятор формирования зональности в корковом веществе и развития клубочковой зоны [6]. Его подавление приводит не только к нарушению развития, но и к функциональной незрелости клубочковой зоны, так как он индуцирует экспрессию рецепторов ангиотензина II [7]. Снижение экспрессии β -катенина и активации Wnt-сигналинга в постнатальном развитии приводило к задержке развития клубочковой зоны в возрасте 6-ти недель, а уменьшение числа клеток с локализацией β -катенина в наружной мембране клеток свидетельствовало о повышении их пролиферативного потенциала, что подтверждали результаты определения экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Известно, что при переходе от пубертатного периода к половой зрелости количество Oct4-позитивных кортикостероцитов в клубочковой зоне увеличивается [4]. Высокое содержание Oct4-позитивных кортикостероцитов в отстающей в развитии клубочковой зоны в возрасте 6-ти недель и уменьшение экспрессии Oct4 на фоне активного развития клубочковой зоны у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора, после пубертатного периода, а также связь между экспрессией Oct4 и уровнем пролиферации, а также функциональной активности клеток указывает на роль этого транскрипционного фактора в постнатальном морфогенезе клубочковой зоны и на возможный механизм нарушения эпигенетической регуляции эндокринным дисраптором ДДТ.

Выводы:

Отставание в морфологическом и функциональном развитии клубочковой зоны при пренатальном и постнатальном воздействии эндокринного дисраптора ДДТ связано с увеличением числа кортикостероцитов, готовых к переходу в плюрипотентное состояние за счет увеличения экспрессии Oct4 и подавления канонического Wnt-сигналинга. Уменьшение экспрессии Oct4 в сочетании с активацией Wnt-сигналинга предопределило индукцию роста клубочковой зоны после наступления половой зрелости, что указывает на роль этих транскрипционных факторов как мишеней действия эндокринного дисраптора.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: впервые установлена роль транскрипционных факторов в постнатальном развитии коркового вещества надпочечников и роль этих факторов в качестве мишеней действия эндокринного дисраптора.

Литература

1. Ribeiro E., Ladeira C., Viegas S. EDCs Mixtures: A Stealthy Hazard for Human Health? //

Toxics. 2017. Vol. 7. N. 5. pii: E5

2. De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. J Environ Public Health. 2012. 2012. 713696.

3. Zama AM, Uzumcu M. Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective. // Front. Neuroendocrinol. 2010. Vol. 31. P. 420–439.

4. 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.

5. Регуляция пролиферативных процессов в корковом веществе надпочечников крыс транскрипционным фактором PRH при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм / Н.В. Яглова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 3. С. 381–385.

6. Berthon A., Martinez A., Bertherat J., Val P. Wnt/b-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development // Mol. Cell. Endocrinology. 2012. Vol. 351. P. 87–95.

7. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms / E.M. Walczak [et al.] // Mol. Endocrinol. 2014. Vol. 28. № 9. P. 1471–1486.

Сведения об авторах

Сергей Станиславович Обернихин

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

Эл. почта: ober@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Валентин Васильевич Яглов

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

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Светлана Владимировна Назимова

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

Эл. почта: pimka60@list.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Information about authors

Sergey Stanislavovich Obernikhin

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

E-mail: ober@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Nataliya Valentinovna Yaglova

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

e-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Valentin Vasilyevich Yaglov

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

E-mail: vyaglov@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: pimka60@list.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

УДК 611.018:611.453

ГРНТИ 76.03.00

DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.10

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

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

РЕГУЛИРОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕТЧАТОЙ ЗОНЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ РАЗВИТИИ ОРГАНИЗМА В УСЛОВИЯХ НИЗКОДОЗОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ДДТ

Показано изменение пролиферативной активности клеток сетчатой зоны надпочечников в процессе постнатального развития крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ, и регуляции их транскрипционным фактором PRH

Ключевые слова: надпочечники, сетчатая зона, пролиферация, PRH, эндокринные дисрапторы

Nazimova S.V., Yaglova N.V., Tsomartova D.A.,
Obernikhin S.S., Yaglov V.V.
FSBI "Research Institute of Human Morphology"

REGULATION OF ADRENAL RETICULARIS CELL'S PROLIFERATION IN ORGANISM DEVELOPMENTALLY EXPOSED TO LOW DOSES OF DDT

Altered patterns of cell proliferation in adrenal zona reticularis during postnatal development and regulation of proliferative activity by transcriptional factor PRH were revealed in rats exposed to endocrine disrupter DDT.

Keywords: adrenals, zona reticularis, proliferation, PRH, endocrine disrupter

Формирование и функционирование сетчатой зоны коркового вещества надпочечников имеет важное значение для развития организма в целом, так как активация стероидогенеза в ней обеспечивает начало полового созревания особи.

Эндокринные дисрапторы способны изменять транскрипционную регуляцию некоторых процессов, связанных с клеточным метаболизмом и влиять на развитие эндокринных желёз. Исследования в этой области позволили бы значительно расширить знания о молекулярных механизмах дисрапторных эффектов в патогенезе ряда заболеваний. Показано, что эндокринный дисраптор дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) способен нарушать активацию канонического β -катенин/Wnt-сигналинга, регулирующего пролиферацию и дифференцировку клеток и может приводить к изменению темпов развития органа [1, 2].

Целью исследования было изучить влияние пренатального и постнатального воздействия низких доз эндокринного дисраптора ДДТ на регуляцию пролиферативных процессов клеток сетчатой зоны надпочечников самцов крыс.

Материалы и методы

Исследование проведено на самцах крыс Вистар ($n=62$). Были сформированы две экспериментальные группы с пренатальным и постнатальным воздействием низких доз ДДТ (3мкг/кг/сут) и только постнатальным воздействием с первого дня после рождения. Первая опытная группа ($n=20$) состояла из потомства самок, получавших с первого дня ссаживания с самцами и до окончания подсосного периода у потомства раствор о,п-ДДТ («Sigma-Aldrich», США) с концентрацией 20 мкг/л вместо питьевой воды. Затем потомство самостоятельно потребляло данный раствор. Во второй опытной группе водопроводная вода была заменена на раствор ДДТ той же концентрации с момента рождения. Среднесуточное самостоятельное потребление ДДТ потомством составило $2,90 \pm 0,12$ мкг/кг. В качестве контрольной группы использовали потомство интактных самок ($n=22$). Животных выводили из эксперимента в возрасте 6 недель, когда происходит интенсивное развитие надпочечника, связанное с процессом полового созревания особи и 10-ти недель, когда орган достигает максимума своего развития [3]. Надпочечники фиксировали в формалине, изготавливали парафиновые срезы. Изучение экспрессии транскрипционного фактора PRH в кортикостероцитах проводили методом иммуногистохимии с помощью поликлональных кроличьих антител («Abcam» США). Изучение пролиферативной активности кортикостероцитов проводили методом иммуногистохимии с помощью антител к Ki-67 («Cell Marque», США). Реакцию визуализировали с помощью набора реактивов «UltraVision LP Detection System» («ThermoScientific», США). Вычисляли процент PRH- и Ki-67-позитивных кортикостероцитов в сетчатой зоне. Статистическую обработку данных производили с помощью программы Statistica 7.0 («Statsoft Inc.», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Анализ связи численности Ki-67-позитивных и PRH-позитивных кортикостероцитов проводили с помощью критерия Пирсона. Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

Гистологическое исследование надпочечников крыс контрольной группы 6-ти недель-

ного возраста показало, что корковое вещество было хорошо развито. В нём выделялись клубочковая, пучковая и сетчатая зоны. Доля сетчатой зоны составляла примерно 40% площади коркового вещества. Уровень пролиферативной активности кортикостероцитов был невысоким – Ki-67-позитивные клетки составляли в среднем 3,5% (рис.1). Экспрессия антипролиферативного фактора PRH практически отсутствовала в сетчатой зоне (рис.2).

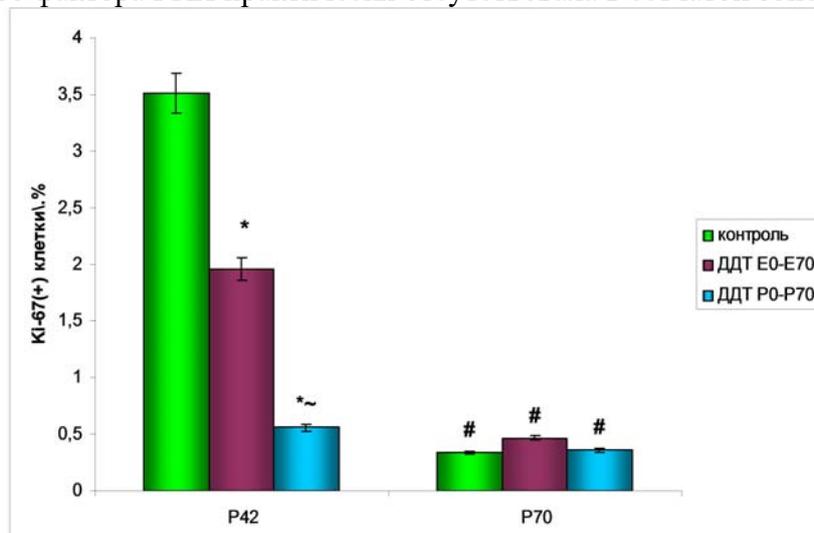


Рис. 1. Возрастные изменения количества Ki-67-позитивных кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечников у крыс при воздействии низких доз ДДТ и контрольной группы (M±m).

Примечания: $p < 0,05$ при сравнении с * – контролем, # – с предыдущим сроком исследования, ~ – между опытными группами.

К периоду полового созревания сетчатая зона у крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, была развита в меньшей степени – размеры сетчатой зоны и количество клеток в единице площади были меньше, чем в контрольной группе. Иммуногистохимическое исследование выявило меньшее число Ki-67-позитивных (рис.1) и отсутствие экспрессии транскрипционного фактора PRH(рис.2).

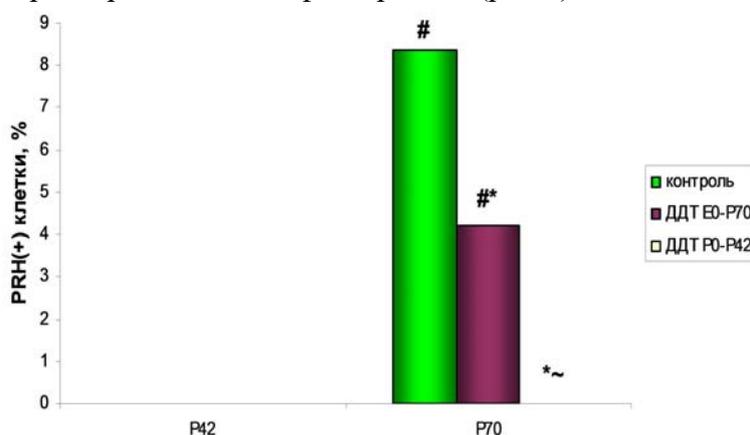


Рис. 2. Возрастные изменения количества PRH-позитивных кортикостероцитов сетчатой зоны коркового вещества надпочечников у крыс при воздействии низких доз ДДТ и контрольной группы (M±m).

Примечания: $p < 0,05$ при сравнении с * – контролем, # – с предыдущим сроком исследования, ~ – между опытными группами.

У животных, потреблявших ДДТ с момента рождения, площадь сетчатой зоны была также меньше контрольных значений, но количество клеток в единице площади было значительно больше, чем в первой опытной группе и в контроле. Пролиферативная активность кортикостероцитов сетчатой зоны была ниже чем, в других соответствующих возрастных группах исследования (рис.1). Синтез транскрипционного фактора PRH не выявлялся (рис.2).

После наступления полового созревания в возрасте 10-недельных крыс доля сетчатой зоны незначительно уменьшилась и составила одну треть площади коркового вещества.

Пролиферативная активность кортикостероцитов значительно снизилась (рис.1), в то же время появились PRH-позитивные клетки (рис.2).

В сетчатой зоне коркового вещества крыс, подвергавшихся пре- и постнатальному воздействию ДДТ, к этому возрасту, как и у контрольных животных, наблюдалось снижение пролиферативной активности эндокриноцитов (рис.1) и появление экспрессии PRH, но амплитуда этих изменений была менее выражена, чем в контрольной группе (рис.2).

У крыс, потреблявших низкие дозы ДДТ с момента рождения, к 70 суткам постнатального развития как размеры сетчатой зоны, так и плотность клеток в ней не претерпели существенных изменений. Транскрипционный фактор PRH по-прежнему не выявлялся (рис.2), количество Ki-67- позитивных клеток не отличалось от значений контрольной группы (рис.1).

Корреляционный анализ выявил наличие обратной связи между числом Ki-67- и PRH-позитивных кортикостероцитов у крыс контрольной группы ($R=-0,74$, $p=0,009$). У крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, зависимость была менее выражена ($R=-0,65$, $p=0,025$).

Обсуждение

Гистологическое исследование показало, что у животных, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора, морфогенез сетчатой зоны был нарушен. К периоду полового созревания сетчатая зона крыс потреблявших ДДТ, была развита в меньшей степени. Наиболее вероятной причиной такого явления была сниженная способность клеток к делению, что подтверждалось меньшим числом Ki-67-положительных кортикостероцитов по сравнению с контролем. Наиболее низкий уровень пролиферации выявлен у крыс, потреблявших ДДТ с первого дня жизни. При завершении развития надпочечников, после достижения половой зрелости в сетчатой зоне митотическая активность кортикостероцитов значительно снижалась, что сопровождалось усилением экспрессии транскрипционного фактора PRH. Корреляционный анализ продемонстрировал тесную связь увеличения экспрессии PRH и снижения пролиферативной активности кортикостероцитов. Эти данные не только подтверждают антипролиферативное действие PRH, описанное в некоторых зародышевых клетках [4,5], но и свидетельствуют о роли этого фактора в постнатальной регуляции морфогенетических и пролиферативных процессов в надпочечниках. Отсутствие динамики пролиферативной активности в группе постнатального воздействия дисраптора не сопровождалось активацией экспрессии PRH. Это также указывает на его роль в торможении пролиферативных процессов после завершения роста органа.

Выводы

Низкодозовое воздействие эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм приводит к дисморфогенезу сетчатой зоны за счёт нарушения активации пролиферации её клеток. Регуляция пролиферации кортикостероцитов осуществляется антипролиферативным фактором PRH. Эндокринный дисраптор ДДТ нарушает экспрессию PRH кортикостероцитами вследствие изменения темпов пролиферации в постнатальном развитии.

Авторы считают, что новыми в данной работе новыми являются следующие положения: воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ нарушает активацию пролиферативных процессов в постнатальном развитии сетчатой зоны, но сохраняет ее регуляцию антипролиферативным транскрипционным фактором PRH.

Литература

1. Цомартова Д.А., Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения активации канонического β -катенин/Wnt-сигналинга в корковом веществе надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) в пренатальном и постнатальном периоде онтогенеза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 164. № 10. С. 495–499.
2. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Назимова С.В. Роль канонического Wnt-сигналинга в морфогенезе и регенерации коркового вещества надпочечников крыс, под-

вергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза // Известия РАН. Серия биологическая. 2019. № 1. С. 81–89.

3. Adrenarche in the rat / D. Pignatelli [et al.] // Journal of Endocrinology. 2006. Vol. 191. No. 1. P. 301–308.

4. Proline-Rich Homeodomain protein (PRH/HHEX) is a suppressor of breast tumour growth / R.Kershaw [et al.] // Oncogenesis. 2017. No. 6. pp. 346.

5. The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth / I. Topisirovic [et al.] // EMBO J. 2003. Vol. 22. P. 689–703.

Сведения об авторах

Светлана Владимировна Назимова

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

Эл. почта: pimka60@list.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Дибакхан Асланбековна Цомартова

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

Эл. почта: dsomartova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

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

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Эл. почта: ober@mail.ru

Валентин Васильевич Яглов

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

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Information about authors

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: pimka60@list.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Nataliya Valentinovna Yaglova

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

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: dsomartova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obernikhin

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

E-mail: ober@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Valentin Vasilyevich Yaglov

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

E-mail: vyaglov@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

УДК 577.175[52+82]:57.044

ГРНТИ 34.39.53

DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.11

Тимохина Е.П., Яглова Н.В., Обернихин С.С.,

Яглов В.В., Назимова С.В., Цомартова Д.А.

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КАТЕХОЛАМИН-ПРОДУЦИРУЮЩИХ СТРУКТУР К ДИСРАПТОРНОМУ ДЕЙСТВИЮ ДДТ

Проведено исследование показавшее, что норадреналин-продуцирующие структуры крыс более чувствительны к дисрапторному действию низких доз ДДТ, чем адреналин-продуцирующие, независимо от того, в каком этапе онтогенеза началось воздействие эндокринного дисраптора на организм.

Ключевые слова: эндокринные дисрапторы, ДДТ, катехоламины, адреналин, норадреналин.

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

SENSITIVITY OF CATECHOLAMINE-PRODUCING STRUCTURES TO DISRUPTIVE ACTION OF DDT

The results of the research revealed that norepinephrine-producing formations demonstrate higher sensitivity to low-dose exposure to endocrine disrupting chemical DDT than epinephrine-producing ones. Differences in sensitivity to endocrine disruption remains unchanged whatever onset of exposure is prenatal or postnatal period of ontogeny.

Key words: endocrine disruptors, DDT, catecholamines, epinephrine, norepinephrine.

Влияние эндокринных дисрапторов на развитие и функциональную активность нейроэндокринной системы является одной из приоритетных проблем фундаментальных и клинических исследований в медицине [1, с.56-61]. Одним из наиболее распространенных эндокринных дисрапторов является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Его метаболиты обнаруживаются в живых организмах по всему земному шару [2, с.115-123; 3]. В литературе имеются данные о нарушении функциональной активности щитовидной железы, надпочечников и половых желез под действием ДДТ [4, с.306-311.; 5, с.760-762.; 6, с.649-664; 7, с.809-818], что приводит к дальнейшим нарушениям высшей нервной деятельности. Однако наши данные указывают также на возможность прямого влияния эндокринного дисраптора на функционирование нервной системы за счет снижения уровня катехоламинов и их дисбаланса [8, с.30-34.]. Катехоламины относятся к биогенным моноаминам, являясь гормонами и медиаторами симпатoadреналовой системы. Биологическая активность катехоламинов заключается в их способности воздействовать на интенсивность метаболических процессов в тканях, а также на функциональное состояние органов и систем [9; 10, с.3-5] Исходя из функций биогенных аминов, можно сказать, что поддержание их баланса в организме очень важно. Нарушение функциональности хотя бы одного из них, приводит к возникновению различных патологий. Так, например, с низким уровнем норадреналина связывают такие патологии как: синдром хронической усталости, нарушения функций центральной нервной системы, фибромиалгия, мигрени, биполярные расстройства, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона [11, с.14-15.]. В связи с этим важно изучить чувствительность катехоламин-продуцирующих структур длительному воздействию ДДТ. Целью исследования было изучить чувствительность катехоламин-продуцирующих структур к дисрапторному воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном периоде развития организма.

Методика исследования

Исследование проведено на самцах (n=36) крыс линии Вистар. Моделировали воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм: пренатальное и постнатальное воздействие на организм (первая опытная группа, n=12) и только постнатальное воздействие с первого дня жизни (вторая опытная группа, n=12). Для этого самки крыс с момента ссаживания с самцами потребляли вместо воды водный раствор с концентрацией о,п-ДДТ 20мкг/л ("Sigma", США). В течение подсосного периода потомство крыс, составившее первую опытную группу, получало низкие дозы ДДТ с молоком матери. По достижению потомством трехнедельного возраста они были переведены на самостоятельное вскармливание с заменой питьевой воды на аналогичный раствор ДДТ. Вторую опытную группу составили крысы, потреблявшие ДДТ только в постнатальном периоде с первого дня жизни, сначала с молоком матери, а затем самостоятельно. Среднесуточное потребление ДДТ крысами составило $3,71 \pm 0,15$ мкг/кг. Расчет потребляемой дозы ДДТ выполняли согласно требованиям к определению низких доз для ДДТ и нормативов содержания ДДТ в продуктах питания в России [12]. Животные контрольной группы (n=10) получали водопроводную воду. Отсутствие в воде и корме ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений было подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Половину животных контрольной и опытных групп выводили из эксперимента в возрасте 6 недель (пубертатный период), остальных животных в возрасте 10 недель (постпубертатный период) передозировкой золетила.

Плазму получали из крови путем добавления этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). В плазме крови проводили определение содержания адреналина и норадреналина иммуноферментным методом с помощью высокочувствительного набора реактивов “CatCombi” (“IBL International”, Германия) с минимально определяемым содержанием адреналина 0,01 нг/мл и норадреналина 0,02 нг/мл. Эксперимент проведен в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977г. Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты исследования

У крыс, подвергшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза, через 6 недель после начала эксперимента, концентрация адреналина снизилась примерно на 20%. Уменьшение же концентрации норадреналина было более выраженным и составило около 45% (рис.1).

У крыс, подвергшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном развитии, через 6 недель после начала эксперимента, также отмечалось уменьшение содержания катехоламинов. Концентрация адреналина была меньше примерно на 9%, а норадреналин снизился более чем на 30% по сравнению с контролем (рис.1).

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза через 10 недель после начала эксперимента, уровень адреналина в плазме крови был меньше контрольных значений на 30%. Концентрация норадреналина оказалась меньше значений контрольной группы на 60% (рис.2)

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ только в постнатальном периоде после наступления половой зрелости содержание адреналина, а также норадреналина в плазме было наименьшим в исследуемых группах. Концентрация адреналина была меньше контрольных значений на 45%. Также как и в предыдущем сроке исследования отмечалось более выраженное уменьшение концентрации норадреналина, в среднем на 76% (рис.2).

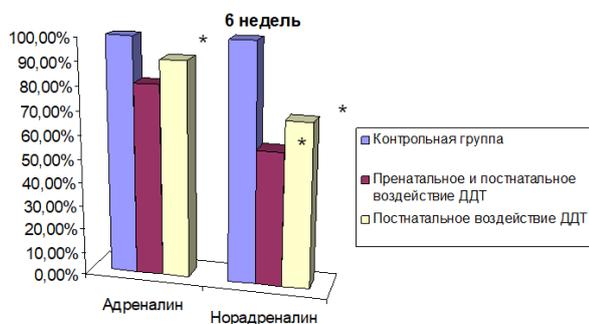


Рис. 1. Концентрация адреналина и норадреналина в плазме крови 6-ти недельных крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах, а также только в постнатальном периоде онтогенеза ($M \pm m$).

Примечания: * – статистически значимые отличия от значений контрольной группы, показатели концентрации катехоламинов контрольных групп были приняты за 100%.

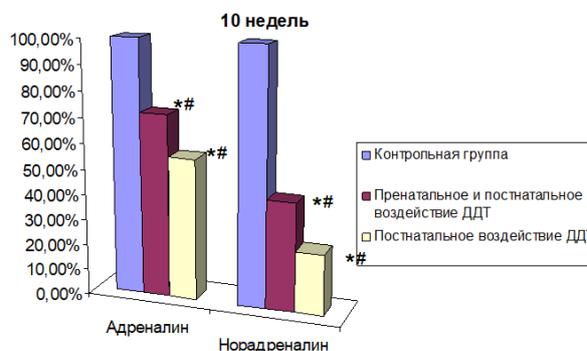


Рис. 2. Концентрация адреналина и норадреналина в плазме крови 10-ти недельных крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах, а также только в постнатальном периоде онтогенеза ($M \pm m$).

Примечания: * – статистически значимые отличия от значений контрольной группы, # – от предыдущего срока исследования, показатели концентрации катехоламинов контрольных групп были приняты за 100%.

Обсуждение

Полученные данные показывают, что у крыс, подвергавшихся длительному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ, уменьшается концентрация как адреналина, так и норадреналина. При этом наибольшую чувствительность к воздействию низких доз дисраптора проявляют норадреналин-продуцирующие структуры. После наступления половой зрелости снижение концентрации катехоламинов становится более выраженным, что говорит о зави-

симости от длительности потребления дисраптора. Самые значительные изменения отмечены у крыс после наступления половой зрелости, потреблявших ДДТ только в постнатальном периоде. Этот факт позволяет говорить о развитии компенсаторных процессов восстановления секреторной деятельности катехоламин-продуцирующих структур у крыс, потреблявших дисраптор с пренатального периода. В отличие от группы крыс, потреблявших ДДТ только в постнатальном периоде, где, вероятно, данные компенсаторные процессы еще не успели завершиться.

Известно, что содержание норадреналина в плазме отражает активность периферической симпатической нервной системы, в то время как содержание адреналина указывает на активность мозгового вещества надпочечников, так как свыше 90% содержащегося в системном кровотоке адреналина поступает в него именно из надпочечников [13, с.1043-1046.]. В симпатических нервных окончаниях норадреналин хранится в синаптических пузырьках и является фактически конечным продуктом синтеза катехоламинов, поскольку превращение его в адреналин происходит в незначительных количествах [14, с.41-48.]. Полученные данные позволяют рассматривать длительное воздействие ДДТ как потенциальный фактор риска, нарушающий функционирование как нервной, так и эндокринной систем.

Выводы:

Норадреналин-продуцирующие структуры крыс более чувствительны к дисрапторному действию ДДТ, чем адреналин-продуцирующие, независимо от того, в каком этапе онтогенеза началось воздействие эндокринного дисраптора на организм.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые выявлено, что эндокринный дисраптор ДДТ, воздействуя на развивающийся организм крысы, нарушает функцию катехоламин-продуцирующих структур, оказывая наиболее выраженный негативный эффект на синтез норадреналина.

Литература:

1. Яглова Н.В., Яглов В.В. Эндокринные дисрапторы – новое направление исследований в эндокринологии // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 67. № 3. С. 56–61.
2. Persistent organic pollutant concentrations in blubber of 16 species of cetaceans stranded in the Pacific Islands from 1997 through 2011 / Bachman M. et al. // Sci Total Environ. 2014. V. 488. P. 115–123.
3. Pesticide residues in food - 2016 evaluations. Part II // World Health Organization. 2017. Toxicological. Geneva.
4. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Особенности продукции стероидных гормонов надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии // Биомедицинская химия. 2017. Т. 63. № 4. С. 306–311.
5. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Changes in thyroid status of rats after prolonged exposure to low dose dichlorodiphenyltrichloroethane // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2014. Vol. 156. N. 6. P. 760–762.
6. Zala S., Penn D. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges // Animal Behaviour. 2004. Vol. 68. P. 649–664.
7. Zoeller R., Rovet J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings // Journal of Neuroendocrinology. 2004. Vol. 16. N. 10. P. 809–818.
8. Изменения секреторной деятельности адреналокитов крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз дихлордифенилтрихлорэтана / Яглова Н.В. и др. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2018. № 3. С. 30–34.
9. Бичкаева Ф.А. Эндокринная регуляция метаболических процессов у человека на Севере. – Екатеринбург: УрО РАН, 2008. 304 с.

10. Абакумова А.В. Роль адреналина и норадреналина в адаптационных процессах организма // Современные тенденции научных исследований. Роль научных исследований в инновационном развитии: Материалы международной научно-практической конференции / под ред. Зарайский А.А. 2018. С. 3–5.

11. Архипова Т.В., Скрипникова М.Н. Влияние адреналина и норадреналина на организм молодёжи // Современные аспекты формирования зож у молодого поколения : Сборник материалов всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых. 2019. С. 14–15.

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

13. Concentrations of L-dopa in plasma and plasma ultrafiltrates / Rizzo V. et al. // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1996. Vol. 14. No. 10. P. 1043–1046.

14. Adrenal Gland: Structure, Function, and Mechanisms of Toxicity / Rosol T. et al // Toxicologic Pathology. 2001. Vol. 29. No. 1. P. 41–48.

Сведения об авторах

Екатерина Петровна Тимохина

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

Эл. почта: rodich-k@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

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

Эл. почта: ober@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Валентин Васильевич Яглов

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

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Светлана Владимировна Назимова

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

Эл. почта: pimka60@list.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Дибакхан Асланбековна Цомартова

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

Эл. почта: dtsomartova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Information about authors

Ekaterina Petrovna Timokhina

0PhD, Research worker of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: rodich-k@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Nataliya Valentinovna Yaglova

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

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obernikhin

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

E-mail: ober@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Valentin Vasilyevich Yaglov

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

E-mail: vyaglov@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: pimka60@list.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova

PhD, Junior Scientific Resercher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: dtsomartova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

УДК 611.452:57.044
ГРНТИ 76.03.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.12

Яглов В.В., Яглова Н.В.,
Цомартова Д.А., Тимохина Е.П.
ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ НА РАЗВИВАЮЩИЙСЯ ОРГАНИЗМ

Установлено, что воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм вызывает ультраструктурные изменения хромаффинных клеток надпочечников, приводящие к снижению их функциональной активности.

Ключевые слова: хромаффинные клетки, надпочечник, митохондрия, секреция, адреналин, ДДТ

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

CHANGES IN FINE STRUCTURE OF ADRENAL CHROMAFFIN CELLS AFTER DEVELOPMENTAL EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTER DDT

Developmental exposure to low doses of endocrine disrupter DDT results in negative changes in fine structure and impaired functional activity of adrenal chromaffin cells.

Key words: chromaffin cells, adrenals, mitochondrion, secretion, epinephrine, DDT

Дисрегуляторное действие эндокринных дисрапторов на секрецию катехоламинов надпочечниками не изучено. Анализ имеющихся данных показывает, низкодозовое воздействие наиболее распространенного эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) не вызывает значимых изменений в функционировании дофаминовой системы [1]. Хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечников обладают регулируемым типом секреции, включающим как выделение содержимого секреторных гранул через поросомы, так и молекулярный способ выделения продуктов [2, 3]. Синтез катехоламинов в надпочечниках является зависимыми от глюкокортикоидов процессом [4]. В наших исследованиях мы показывали выраженные изменения в секреции стероидных гормонов надпочечников при развитии организма в условиях низкодозового воздействия ДДТ [5], что является дополнительным фактором риска по отношению к секреции катехоламинов хромаффинными клетками.

Целью работы было изучение ультраструктурных изменений хромаффинных клеток крыс, развивавшихся при постоянном низкодозовом воздействии ДДТ, в периоде полового созревания.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар (n=20). Экспериментальную группу (n=10) составило мужское потомство самок, которые с первого дня ссаживания с самцами вместо воды получали раствор о,п-ДДТ (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мкг/л. В подсосном периоде новорожденные крысы потребляли ДДТ с молоком матери, а с трехнедельного возраста – самостоятельно тот же раствор о,п-ДДТ до достижения пубертатного возраста. Расчет уровня воздействия ДДТ проводили с учетом требований к определению низких доз и нормативам содержания ДДТ в пищевой продукции согласно Техническому регламенту Таможенного союза ТР ТС 021/2011. Самостоятельное потребление ДДТ самцами крыс составило $2,90 \pm 0,12$ мкг/кг/сут, что соответствует уровню потребления ДДТ человеком с продуктами питания с учетом особенностей метаболизма этого вещества в организме крысы [14]. Крысы контрольной группы (n=10) получали водопроводную воду. Отсутствие в воде и корме для животных ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила в возрасте 6 недель, что соответствует пубертатному периоду.

В плазме крови проводили определение содержания адреналина методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью набора реактивов «CatCombi» (IBL International, Германия).

Для электронномикроскопического исследования мозговое вещество надпочечника фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в какодилатном буфере с постфиксацией в 1% растворе тетраоксида осмия. После стандартной проводки заливали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме PowerTome X (RMC Voeckeler, США). Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением M и стандартной ошибкой среднего значения m . Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью t -критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

У крыс контрольной группы в периоде полового созревания хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечников, большинство из которых являлись А-клетками, имели продолговатую форму и крупные ядра с ровными контурами. В ядрах преобладал эухроматин, гетерохроматин в виде небольших глыбок располагался вдоль внутренней ядерной мембраны. Цитоплазма клеток была просветлена. Митохондрии располагались в основном в парануклеарной области, встречались и субплазмолеммальные митохондрии. Они характеризовались удлинённой формой, наличием септальных крист и электронно плотным матриксом. Комплекс Гольджи выявлялся в парануклеарной области. Он был представлен канальцами и везикулами. Также в цитоплазме выявлялись канальцы гранулярной эндоплазматической сети (гЭПС). Цитоплазма клеток содержала большое количество секреторных гранул. У большинства из них наблюдалось просветление вокруг плотного ядра. Просветы капилляров содержали плазму или единичные эритроциты, реже в просветах встречались секреторные гранулы хромаффинных клеток.

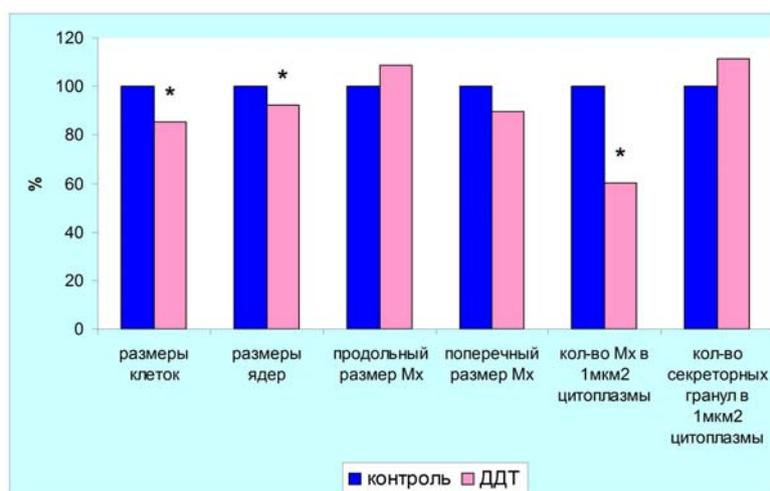


Рис. 1. Изменения ультраструктурных характеристик хромаффинных клеток надпочечников крыс, развивавшихся при воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ.

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

У крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, отмечалось уменьшение размеров как самих хромаффинных клеток, так и их ядер. Отмечалось уменьшение численности митохондрий в клетках. Митохондрии находились в основном в парануклеарной области. Их структурные характеристики не отличались от таковых в контрольной группе. Количество секреторных гранул в цитоплазме не имело существенных отличий от значений контрольной группы. В цитоплазме встречалась умеренно развитая гЭПС. Концентрация адреналина в плазме крови была меньше в среднем на 20%, чем у крыс контрольной группы.

Обсуждение

У крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ, в пубертатном периоде отмечалось снижение секреции адреналина надпочечниками. Электронно-микроскопическое исследование выявило признаки снижения функциональной активности хромаффинных клеток – уменьшение размеров клеток и их ядер, числа митохондрий в цитоплазме. Митохондрии в хромаффинных клетках, располагаясь под плазмолеммой, участвуют в экзоцитозе гранул, регулируя наряду с эндоплазматической сетью содержание и транспорт ионов кальция [6, 7]. У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пренатальном и постнатальном периодах, митохондрии располагались преимущественно парануклеарно, их содержание в клетках было уменьшено. Известно, что секреторные гранулы хромаффинных клеток также способны выделять содержимое за счет растворения и молекулярной секреции, как и тучные клетки, эозинофильные и базофильные гранулоциты [3, 8, 9, 10]. В нашем исследовании мы не выявили признаков усиленного обводнения секреторных гранул, что свидетельствует об уменьшении выделения катехоламинов и подтверждается пониженным содержанием адреналина в системном кровотоке. Таким образом, изменения в митохондриальном аппарате играют значимую роль в нарушениях секреторной деятельности хромаффинных клеток, обусловленной дисрапторным действием ДДТ.

Выводы:

Хромаффинные клетки надпочечников крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, к пубертатному возрасту имеют значимые ультраструктурные отличия от интактных крыс, связанные в основном с уменьшением численности митохондрий и нарушением выделения секреторных продуктов. Эти изменения обуславливают пониженный уровень секреции адреналина в системный кровоток.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: воздействие низких доз на развивающийся организм способно изменять ультраструктуру хромаффинных клеток надпочечников и нарушать, тем самым, их секреторную деятельность.

Литература

1. Disruption of dopamine transport by DDT and its metabolites / J. Hatcher [et al.] // *Neurotoxicology*. 2008. Vol. 29. N. 4. P.682–690.
2. Яглов В.В., Яглова Н.В. Новые концепции биологии диффузной эндокринной системы: итоги и перспективы ее изучения // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012. Т. 67. № 4. С. 74–81.
3. Яглова Н.В., Яглов В.В. Ультраструктурные проявления молекулярного способа выделения секреторного материала тучными клетками щитовидной железы при воздействии липополисахарида // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т. 155. № 2. С. 229–232.
4. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis / M. Ehrhart-Bornstein [et al.] // *Endocr Rev*. 1998. Vol. 19. N. 2. P. 101–143.
5. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Особенности продукции стероидных гормонов надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии // *Биомедицинская химия*. 2017. Т. 63. № 4. С. 306–311.
6. Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells / C. Villalobos [et al.] // *FASEB J*. 2002. Vol. 16. P.343–353.
7. The position of mitochondria and ER in relation to that of the secretory sites in chromaffin cells / J. Villanueva [et al.] // *Journal of Cell Science*. 2014. Vol. 127. P. 5105–5114.
8. Dvorak A. Ultrastructural analysis of human basophil and mast cell recovery after secretion // *Semin. Clin. Immunol*. 1994. N. 8. P. 5–16.
9. Chromaffin Granules in the Rat Adrenal Medulla Release Their Secretory Content in a Particulate Fashion / E. Crivellato [et al.] // *Anat. Rec*. 2004. Vol. 277A. P. 204–208.

10. Piecemeal degranulation of peripheral blood eosinophils: a study of allergic subjects during and out of the pollen season / M. Karawajczyk [et al.] // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2000. Vol. 23. P. 521–529.

Сведения об авторах

Валентин Васильевич Яглов

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

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Дибакхан Асланбековна Цомартова

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

Эл. почта: dtsomartova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Екатерина Петровна Тимохина

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

Эл. почта: rodich-k@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Information about authors

Valentin Vasilyevich Yaglov

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

E-mail: vyaglov@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Nataliya Valentinovna Yaglova

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

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova

PhD, Junior Scientific Resercher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: dtsomartova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Ekaterina Petrovna Timokhina

PhD, Research worker of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: rodich_k@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

УДК 611.018:611.453

ГРНТИ 76.03.00

DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.13.

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

Яглов В.В., Назимова С.В.

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

АКТИВАЦИЯ КАНОНИЧЕСКОГО WNT-СИГНАЛИНГА В РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ УЧАСТКАХ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ

Установлено, что процесс репаративной регенерации пучковой зоны требует снижения активации канонического Wnt-сигналинга, что указывает на его ингибирующую роль в дифференцировке кортикостероцитов пучковой зоны в отличие от клубочковой зоны.

Ключевые слова: Wnt-сигналинг, надпочечник, корковое вещество, пучковая зона, регенерация

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

Yaglov V.V., Nazimova S.V.

FSBI “Research Institute of Human Morphology”

ACTIVATION OF CANONICAL WNT-SIGNALING IN REGENERATING TISSUE OF ADRENAL CORTEX

The study showed that reparation of adrenal zona fasciculata requires downregulation of canonical Wnt signaling. It indicates inhibitory impact of Wnt signaling on maturation of fasciculata cells unlike glomerulosa ones.

Key words: Wnt signaling, the adrenal gland, cortex, zona fasciculata, reparation

Одним из ключевых факторов, регулирующих постнатальный морфогенез, а также физиологическую и репаративную регенерацию коркового вещества надпочечников, является

канонический β -катенин/Wnt-сигналинг [1, 2]. Активация Wnt является ведущей в формировании клубочковой зоны и дифференцировке ее клеток [3]. Роль канонического Wnt в развитии пучковой зоны изучена в значительно меньшей степени. Существует гипотеза, что активация β -катенин/Wnt-сигналинга препятствует дифференцировке клеток пучковой зоны [4].

Цель исследования – изучение активации канонического β -катенин/Wnt-сигналинга в регенерирующих участках коркового вещества надпочечников крыс.

Методика исследования

Моделировали гибель участков пучковой зоны надпочечника крыс Вистар. Для этого использовали воздействие низких доз эндокринного дисраптора ДДТ, который вызывает нарушение микроциркуляции на в наружной части пучковой зоны и гибель ее клеток [5, 6]. Первую экспериментальную группу (n=20) составили самцы крыс, подвергавшиеся пренатальному и постнатальному воздействию низких доз о,п-ДДТ до достижения ими 42-х дневного возраста, то есть пубертатного этапа развития, и 70-дневного возраста, когда рост коркового вещества надпочечника крысы завершается [7]. Пренатальное воздействие осуществлялось вследствие потребления самками с первого дня беременности раствора ДДТ 20 мкг/л вместо питьевой воды, постнатальное воздействие – лактационным путем в течение 21 суток, а затем за счет самостоятельного потребления раствора ДДТ потомством. Вторую экспериментальную группу составили крысы (n=20), подвергавшиеся воздействию ДДТ с начала постнатального развития. В качестве контроля использовали потомство мужского пола интактных самок (n=32). Проводили гистологическое изучение препаратов экваториальных срезов надпочечников. Выраженность активации канонического Wnt-сигналинга определяли по проценту кортикостероцитов с транслоцированным в ядро β -катенином [1], который выявляли методом иммуногистохимии с помощью моноклональных антител («Cell Marque», США). Пролиферацию клеток в пучковой зоне определяли вычислением процента Ki-67-позитивных кортикостероцитов с иммунохимической детекцией антигена («Cell Marque», США). Реакции визуализировали набором реактивов «UltraVision LP Detection System» («ThermoScientific», США). Статистическая обработка данных произведена программой Statistica 7.0 («Statsoft Inc.», США). Количественные данные, имеющие приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Для сравнения групп использовали однофакторный анализ ANOVA и t-критерий Стьюдента. Значимыми различия считались при $p < 0,01$.

Результаты

У крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в возрасте 42-х суток выявлены фокальная гибель клеток вследствие очаговых кровоизлияний и регенерация пораженных участков в наружной части пучковой зоны. Регенерирующие участки представляли собой диффузно расположенные клетки с ядрами, чья структура соответствовала структуре ядра кортикостероцита, и оксифильной зернистой цитоплазмой или скопления клеток. Цитоплазматические мембраны были слабо выражены. Наблюдалось формирование капилляров. Типичная для пучковой зоны гистоархитектоника отсутствовала. Пролиферативная активность кортикостероцитов в пучковой зоне превышала контрольные значения, но в участках регенерации Ki-67-позитивные клетки встречались редко. На 70-е сутки целостность пучковой зоны была полностью восстановлена с формированием типичной структуры. Пролиферативная активность кортикостероцитов не отличалась от контрольных значений.

У крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию, на 42-ые сутки гибели микроциркуляторных нарушений и гибели кортикостероцитов не наблюдалось. Эти изменения, а также развитие репаративных процессов проявились на 4 недели позже к 70-м суткам. На данном этапе пролиферативная активность кортикостероцитов была выше значений группы, подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию. В зоне регенерации клетки отличались пониженной пролиферативной активностью.

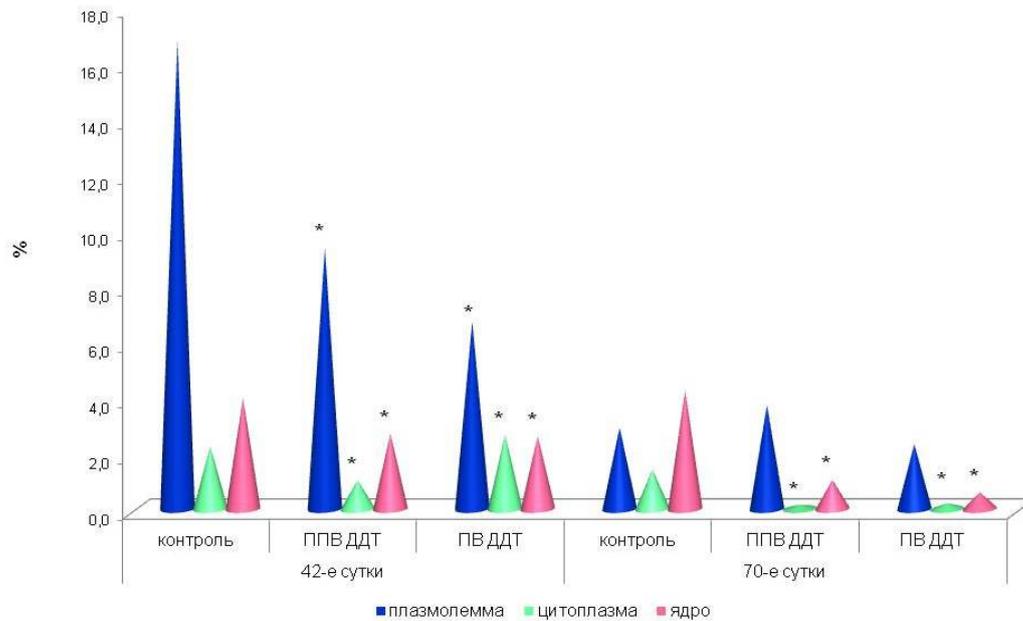


Рис. 1. Процентное содержание клеток с мембранной, цитоплазматической и ядерной локализацией β -катенина в пучковой зоне коркового вещества крыс контрольной группы и крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ (ППВ ДДТ) и постнатальному воздействию ДДТ (ПВ ДДТ) в возрасте 42-х и 70-х суток.

Примечания: * – статистически значимые отличия от контрольной группы соответствующего возраста.

Иммуногистохимическое исследование показало, что новообразованные клетки в зонах регенерации не содержат β -катенин в наружных цитоплазматических мембранах. Выявлялись единичные клетки с наличием β -катенина в цитоплазме. Клетки с транслокацией β -катенина в ядро не обнаруживались. Эти особенности были одинаковыми как для крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному, так и постнатальному воздействию ДДТ. В окружающей ткани активация Wnt-сигналинга также была подавлена, так как процент клеток с ядерной локализацией β -катенина был в несколько раз меньше, чем в контроле как в процессе регенерации, так и после ее завершения (рис. 1).

Обсуждение

Сравнение процессов регенерации в двух экспериментальных группах показало, что на момент исследования восстановление целостности пучковой зоны характеризовалось пониженной пролиферативной активностью, в то время вне зон регенерации клетки активно делились. Особенно это было выражено в группе пренатального и постнатального воздействия, так как у них поражение пучковой зоны развивалось в период активного роста органа. Следовательно, можно сделать вывод, что клетки в зонах регенерации находились в стадии дифференцировки.

Известно, что канонический Wnt-сигналинг является стимулятором пролиферативных процессов в клубочковой зоне [8]. Мы наблюдали ингибирование Wnt-сигналинга и в участках с повышенной пролиферативной активностью, и в участках регенерации с пониженной пролиферацией клеток. Следовательно, Wnt-сигналинг в пучковой зоне в меньшей степени стимулирует пролиферацию клеток, чем в клубочковой зоне. В регенерирующих участках происходило созревание клеток и формирование специфичной гистоархитектоники. И эти процессы протекают на фоне ингибирования β -катенин/Wnt-сигналинга. Наши данные подтверждают результаты фактически единственного исследования [4], показавшего, что активация канонического Wnt/ β -катенин-сигналинга подавляет дифференцировку и функциональную активность кортикостероцитов пучковой зоны, но при этом не обнаруживается в пролиферирующих клетках.

Выводы

Проведенное исследование выявило, что воздействие эндокринного дисраптора ДДТ, вызывает нарушения микроциркуляции в наружной части коркового вещества и очаговую

гибель клеток. В участках регенерации клетки характеризуются низкой пролиферативной активностью, крайне низкой экспрессией β -катенина и отсутствием активации канонического Wnt-сигналинга.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения: гистотипическая регенерация пучковой зоны коркового вещества надпочечников сопровождается снижением экспрессии β -катенина и активации канонического Wnt-сигналинга.

Литература

1. Berthon A., Martinez A., Bertherat J., Val P. Wnt/b-catenin signalling in adrenal physiology and tumor development // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012. Vol. 351. P. 87–95.
2. El Wakil A, Lalli E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer // *Mol. Cell Endocrinol.* 2011. Vol. 332, N. 1-2. P. 32–37.
3. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: a WNT perspective / C. Drelon [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015. Vol. 408. P. 156–164.
4. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms / E. Walczak [et al.] // *Molecular Endocrinology.* 2014. Vol. 28. P. 1471–1486.
5. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Обернихин С.С., Назимова С.В. Морфофункциональные изменения коркового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста, потреблявших низкие дозы эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана с первого дня постнатального онтогенеза // *Вопросы питания.* 2017. Т. 86. № 4. С. 70–76.
6. Цомартова Д.А., Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения активации канонического β -катенин/Wnt-сигналинга в корковом веществе надпочечников крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) в пренатальном и постнатальном периоде онтогенеза // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2017. Т. 164. № 10. С. 495–499.
7. Adrenarche in the rat / D. Pignatelli [et al.] // *Journal of Endocrinology.* 2006. Vol. 191. N. 1. P. 301–308. DOI: 10.1677/joe.1.06972
8. El Wakil A. Towards an integrated view of Wnt signaling in mouse adrenocortical functional zonation // *Egypt. J. Exp. Biol. (Zool.).* 2012. Vol. 8. N. 2. P. 315–321.

Сведения об авторах

Дибакхан Асланбековна Цомартова

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

Эл. почта: dtsomartova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

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

Эл. почта: ober@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Валентин Васильевич Яглов

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

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Светлана Владимировна Назимова

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

Эл. почта: pimka60@list.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Information about authors

Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova

PhD, Junior Scientific Resercher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: dtsomartova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Nataliya Valentinovna Yaglova

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

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obernikhin

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

E-mail: ober@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Valentin Vasilyevich Yaglov

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

E-mail: vyaglov@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD, Senior Researcher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: pimka60@list.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

УДК 591.3.591.443
ГРНТИ 76.03.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.14.

Цомартова Э.С., Яглова Н.В., Обернихин С.С.
ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ТИМОЦИТОВ В ПУБЕРТАТНОМ ВОЗРАСТЕ У КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ НИЗКИХ ДОЗ ДДТ

Воздействие низких доз ДДТ на развивающийся организм изменяет темпы пролиферативных процессов в тимусе крыс. В пубертатном возрасте отмечается более высокая митотическая активность тимоцитов и поддерживается более высокое содержание делящихся низкодифференцированных лимфобластов.

Ключевые слова: тимус, пролиферация, ДДТ, эндокринный дисраптор, развитие

Tsomartova E.S., Yaglova N.V., Obernikhin S.S.
FSBI "Research Institute of Human Morphology"

ALTERED PROLIFERATION OF THYMIC LYMPHOCYTES IN PUBERTAL RATS EXPOSED TO LOW DOSES OF DDT

Low-dose developmental exposure to DDT alters proliferative activity of thymic lymphocytes of rats. Higher proliferation rate and low differentiated lymphoblast content are found in rat thymus during puberty.

Key words: thymus, proliferation, DDT, endocrine disrupter, development

Воздействие низких доз дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на развивающийся организм – глобальная медико-социальная проблема, обусловленная как масштабностью воздействия этого эндокринного дисраптора и высокими рисками для здоровья населения, так как и способностью изменять не только функцию желез внутренней секреции, но и влиять на их развитие [1, 2, 3, 4]. Несомненно, что дисрапторное действие ДДТ вносит вклад в увеличение заболеваемости за счет нарушений функционирования органов иммунной защиты [5, 6]. В наших предыдущих исследованиях мы выявили морфофункциональные изменения тимуса и пролиферации тимоцитов половозрелых крыс, подвергавшихся длительному воздействию аналогичных низких доз [7, 8], а также у новорожденных крыс, подвергавшихся пренатальному воздействию низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) [9]. Полученные данные показывают, что воздействие низких доз ДДТ способно значительно влиять на возрастные изменения процессов пролиферации Т-клеток.

Целью настоящего исследования было изучение пролиферативной активности тимоцитов в пубертатном возрасте у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ.

Материалы и методы

Эксперимент был выполнен на самцах крыс Вистар (n=10), рожденных самками, которые с первого дня ссаживания с самцами до достижения потомством 21-дневного возраста вместо воды получали раствор о,п-ДДТ («Sigma-Aldrich», США) с концентрацией 20 мкг/л. С 22-х суток потомство было переведено на самостоятельное потребление аналогичного раствора ДДТ. Среднесуточное потребление ДДТ составило $2,89 \pm 0,12$ мкг/кг, что соответствует потреблению ДДТ человеком с продуктами питания с учетом максимально допустимых уровней его содержания в пищевых продуктах [10]. В качестве контрольной группы использовали потомство интактных самок (n=10). Животных выводили из эксперимента в возрасте 6 недель, что соответствует пубертатному периоду. После стандартной гистологической проводки и заливки в парафин и изготавливали гистологические препараты, в которых определяли пролиферацию тимоцитов методом иммуногистохимии с использованием поликлональных антител к Ki-67 «Cell Marque», США). Количественную оценку иммуногистохимических реакций проводили методом компьютерной морфометрии с использованием программы «ImageScope» («Leica Microsystems», Германия). Определяли пролиферацию тимоцитов *ex tempore* по методике [11].

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

Результаты

У крыс контрольной группы пролиферативные процессы протекали в основном в корковом веществе. Под капсулой отчетливо выделялся слой тимоцитов, состоящий из компактно лежащих активно делящихся лимфобластов. Под ним делящиеся тимоциты располагались диффузно в корковом веществе. В мозговом веществе их число было меньшим.

У крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ, ширина слоя делящихся лимфобластов была на 20% больше, чем у животных контрольной группы (рис. 1). Процент Ki-67-позитивных лимфоцитов в более глубоких слоях коркового вещества был на треть больше контрольных значений (рис. 1). В мозговом веществе процент Ki-67-позитивных лимфоцитов был в полтора раза больше, чем в контрольной группе (рис. 1).

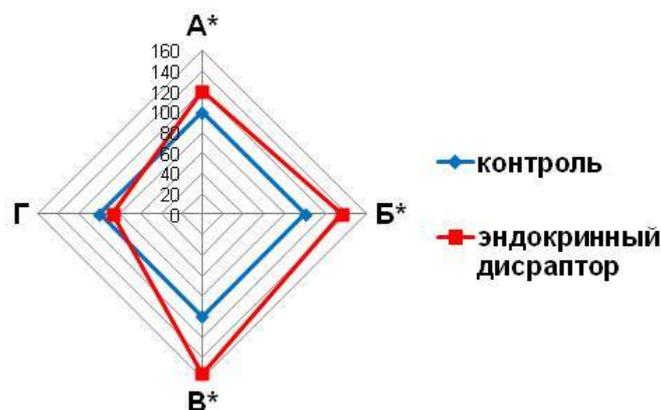


Рис. 1. Относительные изменения параметров пролиферативной активности тимоцитов в пубертатном возрасте у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ.

Примечания: значения контрольной группы приняты за 100%. А – ширина субкапсулярного слоя лимфобластов, Б – процент Ki-67-положительных тимоцитов в более глубоких слоях коркового вещества, В – процент Ki-67-положительных тимоцитов в мозговом веществе, Г – пролиферация ex tempore, * – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

В пубертатном периоде пролиферация ex tempore клеток тимуса крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора, не имела статистически значимых отличий от значений контрольной группы (рис. 1).

Обсуждение

Пубертатный возраст является критическим периодом для тимуса, так как именно в этом возрасте завершается рост органа и начинается его возрастная инволюция. Проведенное исследование показало, что общая пролиферативная активность тимоцитов, определяемая по поглощению меченого тритием тимидина, не превышала контрольных значений, в то время количество Ki-67-положительных тимоцитов было большим в различных участках органа. Наличие более широкого субкапсулярного слоя свидетельствует о наличии большего числа лимфобластов – активно делящихся низкодифференцированных клеток. Большой процент Ki-67-положительных тимоцитов в корковом, а также и в мозговом веществе, где находятся зрелые Т-клетки, также указывает на более активные процессы пролиферации в тимусе крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ. Эти особенности показывают, что количество клеток, находящихся в синтетической стадии митотического цикла уменьшалось, а в других стадиях митоза было увеличено. Второй особенностью было более выраженное увеличение пролиферативной активности в глубоких слоях коркового вещества и в мозговом веществе, нежели в субкапсулярном слое.

Выводы

В пубертатном возрасте у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, отмечалось большее число тимоцитов, в том числе и лимфобластов, в различных фазах митоза, при адекватном контроле числа клеток в синтетической стадии митотического цикла.

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

действие эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм нарушает течение пролиферативных процессов в пубертатном периоде, поддерживая большее число низкодифференцированных клеток в тимусе.

Литература

1. Current knowledge on endocrine disrupting chemicals (EDCs) from animal biology to humans, from pregnancy to adulthood: highlights from a national Italian meeting / M. E. Street [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. Art.1647.
2. Sifakis S., Androutsopoulos V. P., Tsatsakis A. M., Spandidos D. A. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2017. Vol. 51. P. 56–70.
3. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Особенности продукции стероидных гормонов надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии // *Биомедицинская химия.* 2017. Т. 63. Вып. 4. С. 306–311.
4. Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013. Т. 156. № 12. С. 720–722.
5. EDC-2, The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals / A.C. Gore [et al.] // *Endocr. Rev.* 2015. Vol. 36. P. E1–E150.
6. Early-life exposure to p,p'-DDT and p,p'-DDE in South African children participating in the VHEMBE study: An assessment using repeated serum measurements and pharmacokinetic modeling / M.-A. Verner [et al.] // *Environment International.* 2018. Vol. 119. P. 478–484.
7. Яглова Н.В., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Влияние низких доз дихлордифенилтрихлорэтана на морфофункциональное состояние тимуса крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013. Т. 155. № 5. С. 657–660.
8. Изменения пролиферации и апоптоза тимоцитов крыс при хроническом воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана / Н.В. Яглова [и др.] // *Современные технологии в медицине.* 2017. Т. 9. № 14. С. 62–67.
9. Морфологические изменения тимуса новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана во внутриутробном периоде развития / Н.В. Яглова [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2019. Т. 167. № 2. С. 261–264.
10. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». – СПб.: ГИОРД, 2015. 176 с.
11. Яглова Н.В., Обернихин С.С. Морфофункциональные изменения тимуса у потомства мышей в период полового созревания и у взрослых особей после однократного иммуностимулирующего воздействия на материнский организм в ранние сроки беременности // *Иммунология.* 2013. Т. 34. № 1. С. 15–19.

Сведения об авторах

Дибакхан Асланбековна Цомартова

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

Эл. почта: dtsomartova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Наталья Валентиновна Яглова

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Сергей Станиславович Обернихин

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

Эл. почта: ober@mail.ru

ФГБНУ «НИИ морфологии человека»

Москва, Россия

Information about authors

Dibakhan Aslanbekovna Tsomartova

PhD, Junior Scientific Resercher of Laboratory of Endocrine System Development

E-mail: dtsomartova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Nataliya Valentinovna Yaglova

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

E-mail: yaglova@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

Sergey Stanislavovich Obernikhin

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

E-mail: ober@mail.ru

Research Institute of Human Morphology

Moscow, Russia

УДК 591.3.591.443

ГРНТИ 76.29.30

DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.15

Черкасов А.Д.¹, Петрова Е.Н.²

¹ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии

²Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОФИЛАКТИКИ И РЕАБИЛИТАЦИИ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

На 33 участниках исследования изучено влияние реабилитационных немедикаментозных методов на нормализацию артериального давления. Проведён теоретический анализ причин артериальной гипертензии. Сформулирована гипотеза о роли нервной системы в развитии гипертонической болезни.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, реабилитация, почки, симпатическая нервная система, гимнастика.

Cherkasov A.¹, Petrova E.²

¹The institute of general pathology and pathophysiology

²Institute for Information Transmission Problems (Kharkevich Institute) RAS.

PROSPECTS FOR PREVENTION AND REHABILITATION IN ARTERIAL HYPERTENSION

The effect of rehabilitative non-drug methods on the normalization of blood pressure was studied in 33 study participants. A theoretical analysis of the causes of arterial hypertension was carried out. A hypothesis has been formed on the role of the nervous system in the development of hypertension.

Key words: arterial hypertension, rehabilitation, kidneys, sympathetic nervous system, gymnastics.

Введение

С позиции официальной медицины и Комитета экспертов ВОЗ в 95% случаев причины первичной артериальной гипертензии неизвестны, а причины стойкой артериальной гипертензии неизвестны на 85% [7].

Научные исследования причин артериальной гипертензии в рамках системного подхода были начаты ещё в 40-х годах прошлого века. Первым, кто заявил, что гипертония это не болезнь, а обратимое функциональное нарушение в системе регуляции тонуса сосудов, был русский врач Г.Ф. Ланг [5]. Еще в 1922 г. замечательный врач и ученый, глава ленинградской терапевтической школы Г.Ф. Ланг в одной из своих работ писал, что следует четко различать гипертоническую болезнь как самостоятельный недуг и ту гипертонию, которая возникает как симптом каких-то других заболеваний – например, поражения почек. Рядом исследователей убедительно доказано, что эмоциональные стрессы являются одной из ведущих причин артериальной гипертензии и сердечно-сосудистых заболеваний [5, 8]. Установлено, что в саморегуляции артериального давления инициативную роль играют сосудистые барорецепторы, реагирующие учащением импульсной активности на повышение кровяного давления и информирующие по нервам сосудосуживающий нервный центр продолговатого мозга [1, 2]. При этом частота импульсаций барорецепторов зависит в большей степени от скорости подъёма давления, чем уровня кровяного давления. При длительном повышении давления при хронической гипертензии барорецепторы адаптируются к повышенному давлению.

Эксперименты с электрическим раздражением нерва, связывающего аортальные барорецепторы с мозгом, позволили обнаружить в гипоталамусе нейроны, реагирующие на активность барорецепторов [3].

Изучение причин артериальной гипертензии показало многофакторный характер этого заболевания, что требует системного подхода к изучению этой проблемы, учитывающего нервный (нервная регуляция тонуса кровеносных сосудов), гормональный (ренин-ангиотензинная регуляция), гидростатический (изменение объёма кровеносной системы за счёт эластичности сосудов) и гидродинамический (баланс транспорта воды через кровеносную систему) компоненты, а также нейродистрофические процессы в автономной нервной системе и почках.

Стойкая артериальная гипертензия связана с нарушениями механизмов длительной регуляции давления - соотношением между внутрисосудистым объёмом крови и ёмкостью сосудов. Показано, что незначительное (на 2 – 3%) постоянное повышение объёма жидкости в кровеносной системе при выключении симпатической нервной регуляции приводит к повышению кровяного давления почти на 50%. В норме повышение давления при повышении

объёма жидкости в кровеносной системе компенсируется включением нервных сосудистых рефлекторных механизмов кратковременной регуляции, а избыточная жидкость выводится почками прежде, чем произойдёт адаптация нервных механизмов к новым условиям [9, 10]. Таким образом, главным механизмом, ответственным за длительное повышение артериального давления является почечная система контроля жидкости в кровеносной системе.

Следовательно, решение проблемы артериальной гипертензии следует искать в устранении нарушений нервных механизмов регуляции транспорта жидкости через кровеносную систему.

Цель исследования. Поиск немедикаментозных методов нормализации артериального давления путём нормализации нервных механизмов транспорта жидкости через кровеносную систему.

Контингент лиц, участвовавших в исследованиях

В исследованиях принимали участие 33 человека – участники курса оздоровления со средним возрастом 43 ± 7 лет. В состав группы входило 3 врача, принимавшие участие в исследованиях.

Результаты

Наблюдение случая первичной артериальной гипертензии

В клинических условиях в течение 3-х месяцев нам удалось наблюдать развитие артериальной гипертензии с самого начала и использовать экспериментальное немедикаментозное воздействие для нормализации уровня артериального давления. У нашего 60-летнего пациента (вес 74 кг, рост 174 см, отсутствие хронических заболеваний почек и каких-либо других хронических заболеваний в течение более 20 лет), занимавшегося оздоровительным бегом в течение 20 лет, до недавнего времени было стабильное давление 125/80. У данного пациента после длительных стрессов начался симпато-адреналовый криз – давление было 193/90 при пульсе 57 – 60.

После окончания симпато-адреналового криза пришло состояние стойкой артериальной гипертензии – верхнее давление составляло 160 – 180, нижнее давление составляло 110 – 120 при пульсе 100 – 110 в покое. Этот уровень давления держался более двух недель, прежде чем появилось ощущение боли в нижней части спины в области 8-го – 12-го грудных позвонков и 1-го – 2-го поясничных позвонков. Пациенту был проведён сеанс массажа мышечного корсета позвоночника. Через час после массажа давление снизилось с уровня 150/103 до уровня 137/86, а ещё через 2 часа стабильно установилось на уровне 130/83. Этот уровень для пациента был уже нормой.

Состояние хронического стресса у нашего пациента через 2 недели после сеанса массажа вызвало повышение давления до 176/100. И вновь после стрессовых ситуаций были проведены 2 сеанса массажа с контролем артериального давления. В первом случае после массажа произошло снижение давления со 176/97 до 136/83. Во втором случае после массажа произошло снижение давления со 160/97 до 137/88. В третьем случае после массажа произошло снижение давления со 159/100 до 144/95. Массаж происходил утром. К концу дня давление несколько повышалось, но не достигало высокого исходного уровня.

При обследовании пациента было обнаружено, что стрессы вызвали спастические состояния мышц позвоночника в нижнегрудном отделе. Массаж устранял спастические состояния в мышцах. После экспериментальной пробежки и гимнастики спастические состояния мышц также исчезали. Таким образом, установлено, что состояние мышечного корсета позвоночника влияет на регуляцию артериального давления. Гипертонус и спастические состояния межпозвоноковых мышц в области нижнегрудного отдела позвоночника приводят к стойкому повышению артериального давления. Вероятным механизмом такого влияния является компрессия симпатических нервов, управляющих транспортом воды через почки. Устранение гипертонуса и спастических состояний межпозвоноковых мышц с помощью гимнастики для позвоночника регулярно приводило к нормализации артериального давления. Таким образом, артериальная гипертензия на начальной стадии с высокой степенью вероят-

ности вызывается нарушением состояния симпатических нервов, управляющих транспортом воды через почки.

Реабилитация лиц, страдающих артериальной гипертензией

Влияние гимнастики для позвоночника, массажа мышц позвоночника и оздоровительного бега на величину артериального давления

В течение года в НИИ общей патологии и патофизиологии мы проводили исследование влияния оздоровительных факторов на величину артериального давления. Мы имели 33 испытуемых – добровольцев, среди которых были лица, страдающие артериальной гипертензией. Всех испытуемых мы разделили на три группы: лица с нормальным давлением, САД 90 – 120 мм рт. ст. - 16 человек, лица с предгипертензией, САД 120 – 140 мм рт. ст. – 11 человек и лица с артериальной гипертензией, САД более 140 мм рт. ст. – 6 человек. Для всех из них мы применяли массаж мышц позвоночника по 2 -3 раза, устраняющий мышечные блоки в мышечном корсете позвоночника. Один из добровольцев, страдающий артериальной гипертензией, выполнял ежедневно гимнастику для позвоночника и занимался бегом трусцой по 3 км.

У лиц с пониженным давлением сразу после массажа давление снижалось в среднем менее 2 мм рт. ст. До массажа: $108 \pm 8,5 / 69,3 \pm 7,2$. После массажа: $106,5 \pm 12,2 / 69,5 \pm 8,2$ (N=39).

У лиц с нормальным артериальным давлением сразу после массажа давление снижалось в среднем 6,8 мм рт. ст. До массажа: $124,8 \pm 9,1 / 77,5 \pm 7,6$. После массажа: $118 \pm 8,2 / 74,5 \pm 6,0$ (N=39).

У лиц с высоким артериальным давлением сразу после массажа давление снижалось в среднем на 9 мм рт. ст. До массажа: $149 \pm 11,8 / 86 \pm 12,6$. После массажа: $140 \pm 12,7 / 87 \pm 13,4$ (N=22).

Занятия гимнастикой для позвоночника приводило к стойкому снижению давления. До выполнения упражнений давление составляло $147 \pm 14,4 / 91 \pm 6,7$ мм рт. ст. Сразу после выполнения упражнений давление поднималось в среднем на 3 мм рт. ст. и достигало $150 \pm 17,7 / 88 \pm 6,8$ мм рт. ст. Спустя 15 минут оно снижалось в среднем на 7 мм рт. ст. по отношению к исходному и составило $140 \pm 10 / 89 \pm 7,4$ мм рт. ст. (N=13) и сохранялось на длительное время (более 2 часов).

Бег трусцой приводил к снижению давления в среднем на 7 мм рт. ст. спустя 10 мин после окончания бега. Давление до начала пробежки составляло $141 \pm 12,8 / 85 \pm 6,42$ мм рт. ст. После окончания бега давление снижалось до $134 \pm 13,2 / 87 \pm 7,3$ мм рт. ст. (N=9). Спустя час давление снижалось до $121 \pm 9,8 / 80 \pm 6,8$ мм рт. ст. (N=7) и сохранялось таким на время до нескольких часов (4 – 6).

Эти наблюдения показывают, что артериальная гипертензия связана с состоянием мышечного корсета позвоночника. Все добровольцы, принявшие участие в исследованиях и имевшие повышенное давление, имели проблемы с позвоночником. Устранение спастических состояний в межпозвоночных мышцах приводило к нормализации давления у лиц с повышенным артериальным давлением и значительному снижению давления у лиц с артериальной гипертензией. Влияние гимнастических упражнений для позвоночника и бега трусцой на артериальное давление также подтверждает существования нервного компонента артериальной гипертензии. Все эти методы могут быть рекомендованы в качестве профилактических и реабилитационных мероприятий для борьбы с артериальной гипертензией.

Обсуждение

В организме человека непрерывно происходит транспорт жидкостей через желудочно-кишечного тракта. Каждые сутки в кровеносную систему всасывается и из неё выводится до 10 - 12 литров жидкости, что в 2 раза больше объёма крови в кровеносной системе [4]. Это до трех литров воды, потребляемой с пищей, до полулитра метаболической воды, получаемой организмом при сжигании углеводов и до семи литров пищеварительных соков, вырабатываемых слюнными железами (до 1,5 л), желудком (2,5 л) и поджелудочной железой (0,7 л), до 1 л, вырабатываемых проксимальной частью тонкого кишечника (первая половина тонко-

го кишечника) и толстого кишечника (1,4 л). Все эти 10 - 12 л всасываются обратно в кровеносную систему в дистальной части тонкого кишечника и по всей длине толстого кишечника. Жидкость проходит через печень и вбрасывается обратно в кровеносную систему. При этом уровень артериального давления остаётся стабильным. Фактически в кровеносной системе существует «3-й круг кровообращения» – транспорт жидкостей через кровеносную систему. И какое бы ни было артериальное давление, и какой бы ни был тонус кровеносных сосудов, «насосы» тонкого и толстого кишечника всё равно «закачают» в кровеносную систему 10 – 12 л жидкости. Сама кровеносная система будет транспортировать эту жидкость обратно в ЖКТ и выводить её через почки. В таком случае встаёт вопрос: какая именно система поддерживает баланс в перемещении 10 – 12 л жидкости в сутки (200% от объёма) через кровеносную систему? Вполне очевидно, что это управляемая гипоталамусом нервная система почек. При повышении давления на 1 мм рт. ст. выделение воды почками возрастает на 100%. Выделение воды почками может возрасти в 8 раз даже при небольшом увеличении давления крови до 10 мм. рт. ст. [9]. Именно этим достигается стабилизация артериального давления под контролем гипоталамуса.

Денервированные почки путём перерезки симпатического нерва снижают свою характеристику «давление – скорость водного транспорта» в 6 – 8 раз [9]. На долю регуляции давления путём изменения мышечного тонуса артерий и артериол остаётся быстрая компенсация колебаний давления при неравномерном и несбалансированном транспорте жидкостей через кровеносную систему, а также повышение давления при стрессах для реализации оборонительного поведения – «сражаться или бежать и спастись».

Симпатические нервы почек выходят из позвоночника на уровне 9, 10 и 11 грудных позвонков. При появлении мышечных блоков в этом отделе позвоночника возможна компрессия симпатических нервов, которые, в отличие от моторных и сенсорных нервов, не имеют прочной миелиновой оболочки. Компрессия симпатических нервов, управляющих почками, проявляется аналогично денервации, и переводит почки на управление от метасимпатической нервной системы, поддерживающей стабилизацию артериального давления на более высоком уровне. Фактически мы имеем дело с функциональной частичной функциональной денервацией почек. В этом нам видится основная причина артериальной гипертензии.

Мы осознаём, что одиночное наблюдение за развитием артериальной гипертензии с ежедневным мониторингом в течение 5 месяцев не соответствует принципам доказательной медицины и не может быть основанием теории. Вместе с тем, мы считаем его достаточным для формирования гипотезы, нуждающейся в проверке в клинических условиях.

Гипотеза. У лиц, страдающих стойкой артериальной гипертензией, также наблюдается стабилизация кровяного давления, но на более высоком уровне. Контроль за уровнем давления осуществляется симпатическим отделом нервной системы по цепочке: барорецепторы, гипоталамус, симпатические нервные пути, проходящие внутри позвоночника и выходящие из него в области девятого – одиннадцатого грудных позвонков, симпатические волокна спинномозговых нервов, нейроны симпатического ствола, нейроны чревного нервного узла и метасимпатическая нервная система почек. Волокна симпатических нервов не имеют прочной миелиновой оболочки и могут быть подвержены компрессии при прохождении между жесткими спазмированными мышцами позвоночника. При компрессии симпатических нервных волокон почек в области 9 – 11 грудных позвонков нормальное управление выведением жидкости из кровеносной системы нарушается. Метасимпатическая нервная система почек, обладающая более высоким порогом регулирования давления транспорта жидкости, обеспечивает стабилизацию объёма жидкости в кровеносной системе, но уже при более высоком артериальном давлении. Это регулирование при большем уровне давления крови проявляется как стойкая артериальная гипертензия.

Реабилитационные мероприятия по восстановлению симпатической иннервации почек направлены на устранение спастических состояний межпозвоночных мышц (массаж, гимнастика для позвоночника и полноценный отдых). Они способны предотвратить развитие гипертонической болезни на её начальной стадии. На более поздних стадиях развития артери-

альной гипертензии весьма вероятны дистрофические процессы в симпатической иннервации и метасимпатической нервной системе почек, которые не позволят быстро победить состояние артериальной гипертензии. Однако это не означает, что реабилитационные мероприятия будут бесполезны. Массаж мышечного корсета позвоночника приводит к продолжительному снижению давления от 7 до 30 мм рт. ст. Регулярное и продолжительное воздействие на мышечный корсет позвоночника приводит к исчезновению мышечных блоков и устраняет компрессию симпатических нервов, выходящих из позвоночника в составе спинномозговых нервов.

Заключение

Действующие в настоящее время представления о постоянстве объема жидкости в кровеносной системе основано на статической модели, объясняющей гидростатическое давление в кровеносной системе. «Объем крови постоянен, а артериальное давление поддерживается тонусом мышц кровеносных сосудов». На самом деле, здесь должна быть принята динамическая модель:

В течение суток в кровеносную систему независимо от тонуса кровеносных сосудов закачивается из кишечника 10 – 12 литров жидкости, которая затем выводится из кровеносной системы снова в желудочно-кишечный тракт и через почки из организма наружу. Какое бы ни было артериальное давление, этот объем жидкости всё равно будет введен в кровеносную систему кишечными насосами. Артериальное давление контролируется, в основном, поддержанием постоянного объема крови почечной системой удаления жидкости из кровеносной системы. Нервные механизмы управления тонусом кровеносных сосудов посредством нервной регуляции помогают сглаживать кратковременные нарушения баланса в объеме жидкости в кровеносной системе. Стойкая артериальная гипертензия вызвана нарушением работы почек по причине нарушения симпатической иннервации почек, а также хроническими воспалительными процессами в почках (известные 15 % случаев). Представление о повышенном тонусе кровеносных сосудов является заблуждением, приводящим к инвалидности и преждевременной смерти многих тысяч людей от ишемических инсультов вследствие применения гипотензивных препаратов.

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

1. Первичная артериальная гипертензия является не заболеванием, а обратимым функциональным нарушением в симпатической части нервной системы, регулирующей выведение жидкости из кровеносной системы через почки.
2. Реабилитационные мероприятия по устранению спастических состояний в межпозвонковых мышцах и по восстановлению симпатической иннервации почек (массаж, гимнастика для позвоночника и полноценный отдых) способны предотвратить развитие гипертонической болезни на её начальной стадии и улучшить состояние больных со стойкой артериальной гипертензией.

Литература

1. Анохин П.К. Физиологические предпосылки к пониманию патогенеза гипертонической болезни // Гипертоническая болезнь: Новости медицины – М., 1948. Вып. 7. № 4. С. 4–5.
2. Анохин П.К., Шумилина А.И. Анализ афферентной функции аортального нерва в условиях изменяющегося кровяного давления // Физиол., ж. СССР. 1947. Т. 33. № 3. С. 275–278.
3. Каштанов С.И. Конвергенция соматической и вегетативной афферентной импульсации на отдельных нейронах гипоталамической области мозга. – М., 1975. С. 113–118.
4. Киеня А.И., Бандажевский Ю.И. Здоровый человек: Основные показатели. Справ. – Мн. ИП «Экоперспектива», 1997. 108 с.
5. Ланг Г.Ф. Гипертоническая болезнь. – М.: Медгиз, 1946.
6. Мясников А.Л. Гипертоническая болезнь. – М.: Медгиз., 1952.

7. Оганов Р.Г. и др. Борьба с артериальной гипертонией. Доклад Комитета экспертов ВОЗ / Под ред. Р.Г. Оганова, В.В. Кухарчука и А.Н. Бритова. – М.: Гос. НИЦ проф. мед. МЗ РФ, 1997. 139 с.
8. Чазов Е.И. Эмоциональные стрессы и сердечно-сосудистые заболевания / Вестн. АМН СССР, 1975. № 8. С. 3–8.
9. Guyton A.C. Textbook of Medical Physiology, 5th ed, Philadelphia-London, Saunders, 1976.
10. Guyton A.C., Coleman T.G., Cowley A.W., et al. A systems analysis approach to understanding long-range arterial blood pressure control and hypertension / Circulat. Res., 1974. 159 p.

Сведения об авторах

Анатолий Данилович Черкасов

ст. науч. сотр.

Эл. почта: healthsys@mail.ru.

ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии.

Москва, Россия

Елена Николаевна Петрова

ст. науч. сотр.

Эл. почта: petrova@iitp.ru.

Институт проблем передачи информации им. А.А.

Харкевича РАН

Москва, Россия

Information about authors

Anatoliy Cherkasov

senior researcher

E-mail: healthsys@mail.ru,

The institute of general pathology and pathophysiology.

Moscow, Russia

Petrova Elena

senior researcher

E-mail: petrova@iitp.ru,

Institute for Information Transmission Problems

(Kharkevich Institute) RAS

Moscow, Russia

УДК 617.52-007.2:616-07

ГРНТИ 76.75.75

DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.16

¹Арутюнов А.В., ¹Волобуев В.В.,

²Бадеева Е.А., ²Мурашкина Т.И., ¹Васильев Ю.А.

¹ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ

²Пензенский Государственный университет

ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ РАЗВИТИЯ ЛИЦА У ДЕТЕЙ КРУПНОГО РЕГИОНА РОССИИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ

Несращение губы и/или неба занимают лидирующее положение среди пороков развития лица. На территории Краснодарского края данная патология встречается в 1,01-1,15 случаев на 1000 детей. Поэтому актуальным является улучшение диагностической базы. Совместная работа сотрудников Кубанского государственного медицинского университета с Институтом общей генетики им. Н.И. Вавилова и Пензенским государственным университетом позволила разработать диагностические методики на основе молекулярно-генетического анализа и с использованием волоконно-оптических технологий.

Ключевые слова: дети, врождённые пороки развития челюстно-лицевой области, диагностика, генетика, волоконно-оптический датчик

¹Arutyunov A.V., ¹Volobuev V.V., ²Badeeva E.A.,

²Murashkina T.I., ¹Vasilyev Y.A.,

¹FSBEI HE Kuban state medical University

²Penza state university

CONGENITAL MALFORMATIONS OF THE FACE IN CHILDREN OF A LARGE REGION OF RUSSIA: CURRENT STATE OF THE PROBLEM AND PROSPECTIVE DIAGNOSTIC SOLUTIONS

Cleft lip and/or palate occupy a leading position among facial malformations. On the territory of the Krasnodar region, this pathology occurs in 1.01-1.15 cases per 1000 children. Therefore, it is important to improve the diagnostic base. The joint work of the Kuban state medical University staff with Institute of General genetics and Penza state University allowed to develop diagnostic methods based on molecular genetic analysis and using fiber-optic technologies.

Keywords: children, congenital malformations of maxillofacial area, diagnostics, genetic, fiber-optical sensor

Среди врожденных пороков развития (ВПР) лица у детей несращение губы и/или неба (ВНГН) занимают первое место. Частота встречаемости ВНГН варьируется в зависимости от географического региона, расовой и этнической принадлежности, социально-экономических факторов, экологического состояния территории. Доступные литературные источники указывают, что в некоторых регионах России отмечается тенденция к увеличению числа детей, рожденных с этой патологией. Так в Липецкой области за последние 10 лет частота рождаемости детей с ВРГН выросла с 1:954 до 1:800 новорожденных. Однако, частота рождения детей с ВРГН по Оренбургской области за последние 20 лет осталась неизменной – 1:750. По некоторым районам города Уфы она достигает 1:200, несмотря на стабильный показатель по всей Республике Башкортостан – 1:750. Данный факт обусловлен влиянием экологическим состоянием региона исследования. Частота встречаемости врожденной расщелины губы и неба в Республике Саха (Якутия) составляет – 1:820, что приближено к среднему показателю по России [4, с. 185].

Частота рассматриваемых пороков развития на территории Краснодарского края, согласно базе данных наблюдений в течении 25 лет, и оценке службы медицинской статистики Краснодарского края, остается относительно постоянной и составляет 1,01-1,15 на 1000 детей [3, с. 130; 7, с. 40]. Согласно данным Министерства здравоохранения Краснодарского края за период 2012-2017 гг. первичная частота всех врожденных пороков развития варьируется в пределах 7,03-8,79 (на 1000 человек), а ВПР лица – в пределах 0,13-0,22 (на 1000 человек). Анализ показателей общей частоты врожденных пороков развития и ВПР лица показал идентичный характер их динамики (24,79-27,82 и 1,57-1,86 на 1000 человек соответственно) [6, с. 247].

Длительное время сотрудники Кубанского государственного медицинского университета продуктивно взаимодействуют с коллективом ученых Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ИОГен РАН). Общим направлением сотрудничества послужило изучение влияния молекулярно-генетических факторов в развитии врожденной патологии лица у детей Краснодарского края [5, с. 1519; 7, с. 40; 9, с. 1494]. Внедрение молекулярно-генетических методов в практическое здравоохранение позволит улучшить диагностику ВПР у детей. Указанные исследования были подкреплены грантовой поддержкой в течение 2010-2016 гг.

Продолжается совместная работа с Пензенским Государственным университетом. Внедрение волоконно-оптических технологий в медицинский диагностический процесс позволит повысить качество лечения и уменьшить сроки реабилитации пациентов с ВПР лица. Развитие челюстно-лицевой аномалии у детей зависит от многообразия факторов влияния. Одно из направлений влияющее на аномалию развития лицевого скелета ребёнка – это миодинамическое равновесие. Одним из перспективных методов диагностики и прогнозирования возможных вариантов развития и профилактики осложнений в течение заболевания является тензометрия. Тензометрия – метод функциональной диагностики, основанный на регистрации силы мышц без использования электрического потенциала. Данное исследование необходимо для определения физиологических показателей статического давления мышц на окружающие ткани и при функциональной нагрузке, у детей с нормально развивающимся скелетом лица и у пациентов с врождённой аномалией.

Исследование биопотенциалов мышц языка относится к одним из важных методов диагностики течения функциональных посттравматических нарушений и заболеваний языка, при различных аномалиях окклюзии зубных рядов, возрастных изменений в челюстно-лицевой области, также научных исследованиях. Использование оптико-волоконной технологии позволит учесть давление силы мышц языка на развитие костно-хрящевой основы лицевого скелета ребёнка. Для четкого визуального понятия, как происходят изменения в развитии скелета лица, можно наблюдать при динамическом изучении детей с врождённой патологией челюстно-лицевой области [1, с. 31]. Отличительной особенностью предлагаемой методики оценки давления языка на нёбо является применение волоконно-оптических датчиков давления с закрытым оптическим каналом, когда под действием давления языка пациента оптическое волокно испытывает изгибные воздействия, приводящие к изменению интенсивности оптического излучения на выходе оптического волокна [2, с. 92].

Авторы считают, что имеющиеся совместные наработки позволяют расширить диагностическую базу врожденных пороков развития челюстно-лицевой области у детей и могут являться основой для дальнейшей разработки перспективных диагностических методик.

Благодарности Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-38-20045

Литература

1. Арутюнов, А.В. Тензометрия – как альтернативный метод диагностики изменений челюстно-лицевой области / А.В. Арутюнов, Е.А. Бадеева, В.В. Волобуев, Т.И. Мурашкина, Е.Ю. Плотникова, Л.Ф. Терещенко и др. // Инновации в образовании: Материалы региональной межвузовской учебно-методической конференции с международным участием «Инновации в образовании» посвященной 100-летию ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (г. Краснодар, 25 марта 2020 г.) . 2020. С. 30–34.
2. Бадеева, Е.А. Волоконно-оптический датчик силы (давления) мышц языка / Е.А. Бадеева, Т.И. Мурашкина, Ю.А. Васильев, Д.И. Серебряков, Т.Ю. Бростилова, Н.А. Хасаншина и др. // Модели, системы, сети в экономике, технике, природе и обществе. 2019. № 3 (31). С. 83–93.
3. Васильев, Ю.А. Изучение врожденной патологии челюстно-лицевой области у детей крупного региона РФ с учетом пространственно-временной динамики и факторов загрязнения окружающей среды / Ю.А. Васильев, В.С. Учаева, А.С. Грачева, Е.Ю. Плотникова, И.Г. Удина // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: Материалы Международной конференции NT+M&Ec'2019. Весенняя сессия. 2019. С. 128—132.
4. Мамедов, Ад.А. Междисциплинарный подход в лечении детей с расщелиной губы и неба в современных условиях развития здравоохранения России / Ад.А. Мамедов, Ю.И. Кучеров, Ю.В. Жиркова, А.Б. Макленнан, Н.С. Морозова, Ж.А. Блиндер и др. // Врожденная и наследственная патология головы, лица и шеи у детей: актуальные вопросы комплексного лечения: Материалы V Всероссийской научно-практической конференции, под ред. О.З. Топольницкого. 2016. С. 185–192.
5. Курбатова О.Л. Изменчивость морфофизиологических и генетико-демографических признаков в группе детей с врожденными расщелинами губы и неба / О.Л. Курбатова, Ю.А. Васильев, А.С. Прудникова, Е.Ю. Победоносцева, В.С. Учаева, А.Ф. Верапатвелян и др. // Генетика. 2011. Т. 47. № 11. С. 1514–1522.
6. Пильщикова В.В. Эпидемиологические параллели частоты врожденных пороков челюстно-лицевой области и онкопатологии у детей и их использование при подготовке врачей-специалистов / В.В. Пильщикова, Ю.А. Васильев, И.Т. Рубцова // Естественнонаучное образование: стратегия, проблемы, достижения: Сборник научных материалов. 2019. С. 246–249.
7. Удина И.Г. Применение генетико-демографических подходов к оценке риска рождения детей с расщелинами губы и неба в Краснодарском крае / И.Г. Удина, Ю.А. Васильев, В.С. Учаева, Е.Е. Текуцкая, Е.Ю. Победоносцева, А.С. Прудникова и др. // Наука Кубани. 2011. № 3. С. 35–42.
8. Удина И.Г. Пространственно-временная динамика частот врожденных расщелин губы и/или неба в Краснодарском крае / И.Г. Удина, Ю.А. Васильев, Е.Ю. Победоносцева, А.С. Прудникова, А.Ф. Верапатвелян, О.В. Гуленко и др. // Кубанский научный медицинский вестник. 2013. № 1 (136). С. 171–175.
9. Удина И.Г. Молекулярно-генетическое изучение ассоциации SNP A66G гена MTRR с кариезом зубов у детей с врожденными расщелинами губы и/или неба и у детей без патологии / И.Г. Удина, В.С. Учаева, В.В. Волобуев, А.С. Грачева, Ю.А. Васильев // Генетика. 2019. Т. 55. № 12. С. 1491–1496. DOI: 10.1134/S0016675819120129

Сведения об авторах

Арменак Валерьевич Арутюнов

д-р мед. наук, доц., проф. каф. пропедевтики и профилактики стоматологических заболеваний, зав. каф.

Эл. почта: armenak@mail.ru

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России
Россия, Краснодар

Information about authors

Armenak Valeryevich Arutyunov

Dr.Sci.Med., associate professor Department of propaedeutics and prevention of dental diseases, head of the department

E-mail: armenak@mail.ru

FSBEI HE KubSMU
Russia, Krasnodar

Владимир Викторович Волобуев

канд. мед. наук, доц. каф. детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии

Эл. почта: vladimir.volobueff@yandex.ru

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Россия, Краснодар

Елена Александровна Бадеева

д-р техн. наук, доц., проф.

Эл. почта: badeeva_elena@mail.ru

Пензенский государственный университет

Россия, Пенза

Татьяна Ивановна Мурашкина

д-р техн. наук, проф., проф. каф.

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Пензенский государственный университет

Россия, Пенза

Юрий Анатольевич Васильев

ассистент каф. общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Россия, Краснодар

Vladimir Viktorovich Volobuev

Cand.Med.Sci., associate professor of the Department of pediatric dentistry, orthodontics and maxillofacial surgery

E-mail: vladimir.volobueff@yandex.ru

FSBEI HE KubSMU

Russia, Krasnodar

Elena Aleksandrovna Badeeva

Dr.Sci.Tech., associate professor, professor

E-mail: badeeva_elena@mail.ru

Penza state university

Russia, Penza

Tatyana Ivanovna Murashkina

Dr.Sci.Tech., professor, professor

E-mail: timurashkina@mail.ru

Penza state university

Russia, Penza

Yury Anatolyevich Vasilyev

Assistant of the Department of Public Health, Health Care and History of Medicine

E-mail: yurii-59@mail.ru

FSBEI HE KubSMU

Russia, Krasnodar

УДК: 616-001.4:616.9:546.57

ГРНТИ: 76.09.41

DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.17

Мальшко В.В.^{1,2}, Елкина А.А.²

¹ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ

²ЮНЦ РАН

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОСЕРЕБРА ДЛЯ ОБРАБОТКИ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА

Апробирован метод модификации шовного материала наночастицами серебра. В работе представлены результаты сорбции наночастиц на поверхности различных видов полимерных волокон. Показана целесообразность обработки шовных нитей с целью интраоперационной профилактики гнойно-септических осложнений в хирургии.

Ключевые слова: наночастицы серебра, сорбция, профилактика гнойно-воспалительных осложнений, желатин.

Malyshko V.V.^{1,2}, Elkina A.A.²

FSBEI HE KubSMU

²SSC RAS

SILVER NANOPARTICLES USING FOR PROCESSING SUTURE MATERIAL

The method of modifying suture material with silver nanoparticles was tested. The paper presents the results nanoparticle sorption on the surface of different types of polymer fibers. The expediency of processing suture threads for intraoperative prophylaxis of purulent-septic complications in surgery is shown.

Key words: silver nanoparticles, sorption, prevention of surgical site infection, gelatin.

Введение

Наночастицы серебра (AgNPs) широко используются в современной медицине в качестве антибактериального, противоопухолевого, противовирусного агента [1, с. e1701503; 2, с. 732; 3, с. 1421-1430]. При этом наибольший интерес исследователей вызывает именно антибактериальная активность этих соединений. Многие исследования направлены на формирование антибактериального покрытия, состоящего из AgNPs, на поверхности различных протезов, раневых покрытий, имплантов [4, с. 39534-39544; 5, с. 315-327].

Ряд современных раневых покрытий содержит AgNPs, которые должны проявлять свои микробицидные свойства непосредственно в ране. Но при этом необходимо учитывать вероятность попадания и распространения раневой инфекции в мягких тканях за счет «фитильного» эффекта шовного материала. Согласно литературным источникам при распространении

патогенных микроорганизмов в промежутках между волокнами шовного материала фагоцитарная активность лейкоцитов значительно снижается [6, с. 663-8]. В связи с чем для придания шовному материалу антибактериальных свойств используют различные соединения, в том числе хитозан, левофлоксацилин, хлоргексидин [7, с. 384-398; 8, с. 22394-403; 9, с. 185-93], а также AgNPs [10, с. 39]. Однако необходимо учесть, что при выполнении подобной обработки существует вероятность инактивации наночастиц при контакте с материалом нити, особенно при условии необходимого термического воздействия в процессе модификации волокна, что не позволяет применять для аналогичных ситуаций интраоперационную обработку шовных нитей.

Цель работы

Оценить эффективность интраоперационной обработки шовного материала различными композициями, содержащими наночастицы серебра

Материалы и методы

AgNPs были получены методом кавитационно-диффузионного фотохимического восстановления [11, с. 1397-1400], предусматривающим комплексное совместное воздействие ультрафиолетового излучения и ультразвука в присутствии поливинилпирролидона. Затем в полученный раствор был разведен до концентрации серебра 1%, после чего был внесен желатин до 0,9% (желатин-содержащая композиция, или GEL-композиция). В качестве препарата сравнения был использован препарат «Аргогель», представляющий собой гель на основе хитозана, содержащий AgNPs, стабилизированные поливинилпирролидоном.

Для оценки активности сорбции были выбраны различные шовные материалы, в том числе кетгут (классический рассасывающийся), состоящий из коллагеновых волокон; Дексон (искусственный рассасывающийся), представляющий собой полимер гликолевой кислоты; Капроаг (искусственный рассасывающийся), изготовленный из капронового волокна с покрытием, содержащим хлоргексидин; Монофил (нерассасывающийся искусственный) состоящий из полипропилена и имеющий силиконовое покрытие. Выбор разных шовных волокон обусловлен необходимостью оценить особенности сорбции на поверхности как нативного, так и искусственного материала, в том числе имеющего на поверхности различные покрытия, которые могут оказывать влияние на сорбцию AgNPs. Все виды шовных нитей были метрического размера 2.0. Работа выполнена при финансовой поддержке грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - кандидатов наук (Конкурс - МК-2020). (МК-1670.2020.7), а также государственного задания ЮНЦ РАН (AAAA-A19-119040390083-6).

Сорбцию AgNPs обеспечивали погружением отрезка выбранного шовного материала длиной 1 см в исследуемый препарат с продолжительностью экспозиции 1 час и 24 часа. Затем выполняли лиофилизацию полученных образцов и их последующую электронную микроскопию на электронном микроскопе JEOL JSM-7500F с увеличением до 30 000 раз. Сорбцию AgNPs определяли как соотношение относительной площади наночастиц на снимке к общей площади фотографии. Оценку размера исследуемых наночастиц проводили с помощью стандартных маркеров длиной 100 нм и 1 мкм.

Полученные результаты

В результате проведенного эксперимента было установлено, что сорбция AgNPs на поверхности Монофила была одинакова для обоих исследуемых гелей (графики 1, 2).

Вероятнее всего схожие показатели сорбции связаны с наличием силиконового покрытия, которое в равной степени сорбирует AgNPs из Аргогеля и GEL-композиции. Оценка электронных микрофотографий позволила установить, что на поверхности шовного материала Монофил в препарате Аргогель независимо от времени экспозиции преобладали крупные наночастицы свыше 40-50 нм (Рис. 1).

При экспозиции данного шовного материала в GEL-композиции напротив, количественно преобладали некрупные AgNPs размером 5-15 нм (рис. 2).

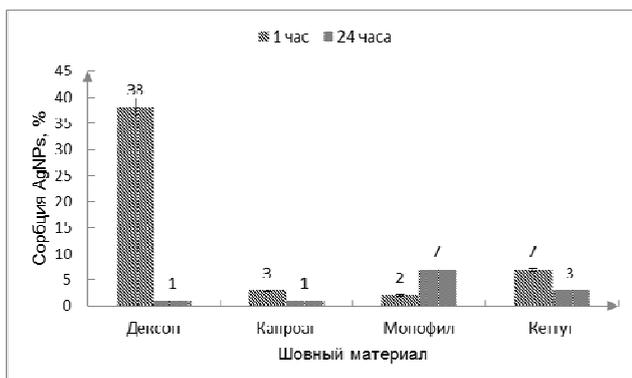


График 1. Сорбция AgNPs поверхности исследуемых шовных материалов при их экспозиции в препарате Аргогель

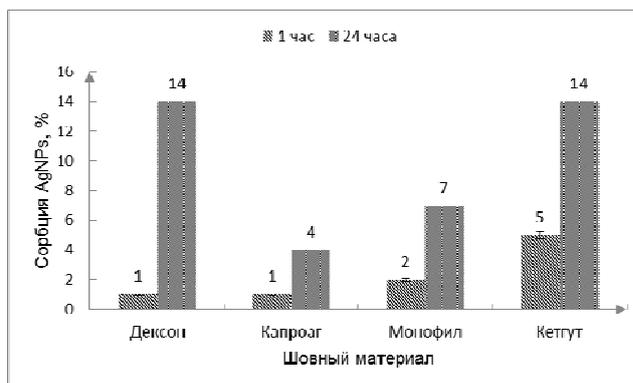


График 2. Сорбция AgNPs поверхности исследуемых шовных материалов при экспозиции в GEL-композиции

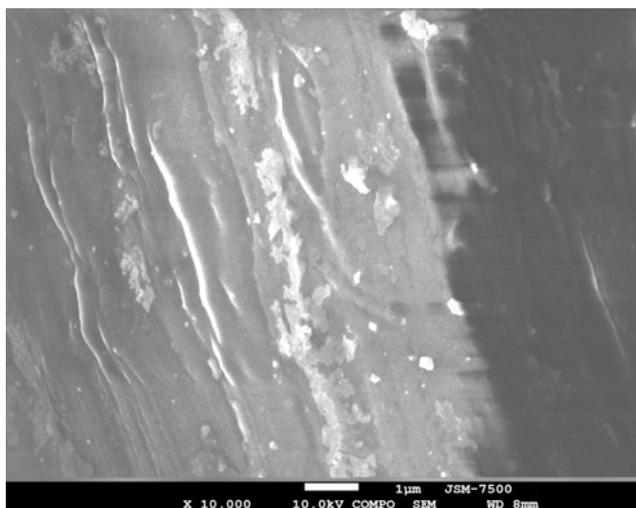


Рисунок 1. – Электронная микрофотография шовного материала Монофил при экспозиции в препарате Аргогель в течение 1 часа.

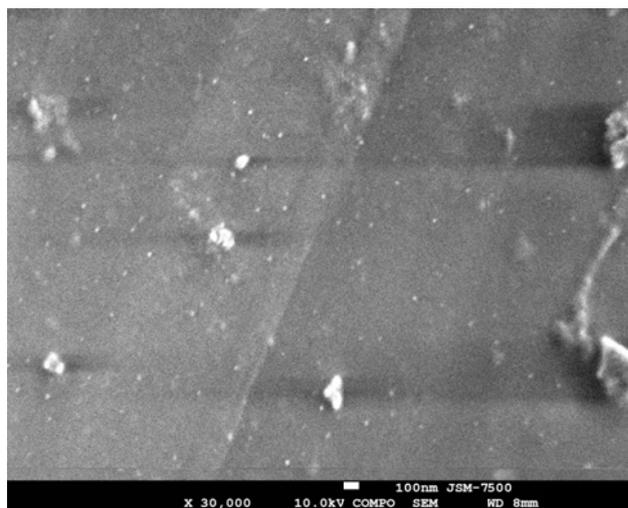


Рисунок 2. – Электронная микрофотография шовного материала Монофил при экспозиции в GEL-композиции в течение 1 часа.

Активность сорбции поверхности других видов волокон существенно отличалась, но, в то же время при экспозиции их в препарате Аргогель нами отмечена десорбция наночастиц разной степени выраженности, а при экспозиции нитей в GEL-композиции напротив, наблюдалось повышение степени сорбции наночастиц. Например, при экспозиции в препарате Аргогель шовного материала Дексон уже через 1 час была достигнута очень высокая степень сорбции AgNPs, составляющая 38%, однако спустя сутки она упала до 1 %, вероятнее всего вследствие выраженной десорбции наночастиц. При использовании GEL-композиции, напротив, степень сорбции AgNPs в течение суток возрастала с 1 до 14 %. Полученные результаты могут быть связаны с наличием желатина в составе разработанной GEL-композиции. При этом в обоих случаях размер преобладающих наночастиц на микрофотографиях увеличивался с 10-15 нм до 30 нм при использовании Аргогеля и свыше 40 нм в случае инкубации в GEL-композиции. При этом на поверхности Кетгута спустя сутки в обоих случаях преобладал размер наночастиц в промежутке от 1 до 5 нм, а на поверхности Капроага он превышал 40 нм.

Таким образом, можно сделать вывод, что препарат Аргогель может быть эффективно применен для обработки искусственных рассасывающихся волокон, что подтверждается значительной сорбцией AgNPs на поверхности шовного материала Дексон. Использование разработанной GEL-композиции позволяет со временем увеличить степень сорбции AgNPs на поверхности различных нитей, а ряде случаев и снизить их агрегацию, что демонстрирует более высокую целесообразность использования GEL-композиции, содержащей наночастицы, полученные методом кавитационно-диффузионного фотохимического восстановления,

для интраоперационной обработки раны и шовного материала с целью предупреждения формирования гнойно-воспалительных осложнений.

Заключение

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

- интраоперационное нанесение гелевой композиции, содержащей наночастицы серебра, на поверхность шовного материала позволяет получить у отдельных видов нитей достаточное количество AgNPs размером от 1 до 5 нм, что может способствовать снижению вероятности развития гнойно-воспалительных осложнений;
- наиболее перспективными для сорбции наночастиц, полученных разработанным способом, являются волокна с химически инертным покрытием, например, нити на основе силикона;
- использование желатина в составе гелевой композиции позволяет повысить степень сорбции наночастиц серебра на поверхности различных по химическому составу волокон;
- степень сорбции наночастиц серебра на поверхности шовного материала зависит не только от используемого лиганда, но и от физико-химических условий их получения.

Литература

1. Tang S., Zheng J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects // *Adv Healthc Mater.* 2018. V. 7 (13):e1701503.
2. Antiviral and Immunomodulatory Activity of Silver Nanoparticles in Experimental RSV Infection // *Viruses.* 2019. V. 11 (8). P. 732.
3. Rageh M.M., El-Gebaly R.H., Afifi M.M. Antitumor activity of silver nanoparticles in Ehrlich carcinoma-bearing mice // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018. V. 391 (12). P. 1421–1430.
4. Bioactive Coating on Ti Alloy with High Osseointegration and Antibacterial Ag Nanoparticles // *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019. V. 11 (43). P. 39534–39544.
5. Antibacterial and immunogenic behavior of silver coatings on additively manufactured porous titanium // *Acta Biomater.* 2018. V. 81. P. 315–327.
6. Osterberg B. Enclosure of bacteria within capillary multifilament sutures as protection against leukocytes // *Acta Chir Scand.* 1983. V. 149. № 7. P. 663–8.
7. Development and characterization of antibacterial braided polyamide suture coated with chitosan-citric acid biopolymer // *J Biomater Appl.* 2017. V. 32 (3). P. 384–398.
8. Antibacterial Surgical Silk Sutures Using a High-Performance Slow-Release Carrier Coating System // *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015. V. 7 (40). P. 22394–403.
9. Antibacterial protection of suture material by chlorhexidine-functionalized polyelectrolyte multilayer films // *J Mater Sci Mater Med.* 2009. V. 20 (1). P. 185–93.
10. Enzyme-mediated formulation of stable elliptical silver nanoparticles tested against clinical pathogens and MDR bacteria and development of antimicrobial surgical thread. // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017. V. 16 (1). P. 39.
11. Власов Р.В., Малышко В.В., Федосов С.Р., Шашков Д.И. Оптимизация физико-химических условий, используемых для получения наночастиц серебра // *Фундаментальные исследования.* 2015. № 2–7. С. 1397–1400.

Сведения об авторах

Вадим Владимирович Малышко

канд. мед. наук, ассистент каф. общей хирургии¹, науч. сотр.²

Эл. почта: Intro-2@rambler.ru

¹ФГБОУ ВО КубГМУ МЗ РФ

Россия, Краснодар

²ЮНЦ РАН

Ростов-на-Дону, Россия

Анна Анатольевна Елкина

научный сотрудник²

Эл. почта: 013194@mail.ru

ЮНЦ РАН

Ростов-на-Дону, Россия

Information about authors

Vadim Vladimirovich Malyshko

Cand. of Med. Sci., Assistant Department of General Surgery¹; Researcher²,

E-mail: Intro-2@rambler.ru

¹FSBEI HE KubSMU

Krasnodar, Russia

²SSC RAS

Rostov-on-Don, Russia

Anna Anatolyevna Elkina

Researcher

E-mail: 013194@mail.ru

SSC RAS

Rostov-on-Don, Russia

АППАРАТ ЛОКАЛЬНОЙ АБДОМИНАЛЬНОЙ ГИПОТЕРМИИ

Статья посвящена обоснованию разработки конструкции аппарата для проведения локальной абдоминальной гипотермии для интенсивной терапии на основе работы элементов Пельтье.

Ключевые слова: локальная абдоминальная гипотермия, интенсивная терапия, перитонит, эффект Пельтье.

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

PIFTPh - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia

LOCAL ABDOMINAL HYPOTHERMIA APPARATUS

The article is discussed of the new method of the local abdominal hypothermia by using elements Peltier in patient with peritonitis.

Key words: local abdominal hypothermia, intensive care, peritonitis, effect Peltier

Многочисленные попытки отечественных и зарубежных ученых создать техническое средство для обеспечения локального снижения температуры тела у больных с тяжелым течением перитонита не удовлетворяют клиницистов по многим причинам, среди которых главная — неудобство для проведения лечебно-диагностического процесса у этой категории больных. Поэтому в реальной клинической практике до сих пор используется старый, но крайне необходимый и эффективный способ — аппликация области живота пузырями со льдом в течение длительного времени.

Целью настоящего исследования является изучение возможности создания конкурентоспособного аппарата для проведения локальной абдоминальной гипотермии на основе работы элементов Пельтье с длительным управляемым охлаждением участков тела больного.

Интенсивная терапия больных перитонитом до настоящего времени в мире остается проблемой номер один для большинства отделений реанимации и интенсивной терапии. Несмотря на постоянное совершенствование методик оперативного вмешательства и интенсивной терапии, появление новых поколений антибиотиков и иммуномодуляторов, летальность больных этой категории остается такой же высокой, как и 25 лет назад [2, 3].

В детальном исследовании Василькова В.Г., 1977 [1] обобщен обширный экспериментальный и клинический материал по применению локальной абдоминальной гипотермии при перитоните. Показано преимущество использования локальных способов гипотермии перед общей гипотермией. Методика локальной абдоминальной гипотермии проводится интенсивным снижением температуры органов брюшной полости путем охлаждения передней брюшной стенки различными способами. При этом развиваются три очень важных патофизиологических эффекта:

- снижения всасывательной способности воспаленной брюшины,
- повышения чувствительности микрофлоры к антибиотикам,
- снижения потребностей тканей в кислороде.

Для клинического использования отечественная промышленность серийно производила различные аппараты для проведения лечебной гипотермии. Однако преимущества использования этой методики нередко нивелировались недостатками технического характера: громоздкость аппаратуры, изготовленной из промышленных холодильных установок, трудность выдерживания температурных режимов, утечки хладоносителя, выраженное шумовое сопровождение, помехи для мониторинга других параметров, дороговизна аппаратуры и технического обслуживания.

В середине 80-х годов прошлого века полностью прекратилось производство отечественного оборудования для гипотермии, существенно уменьшился объем клинического применения методик и научных исследований. В этот же период наблюдался активный рост интереса к проблеме локальной гипотермии в США и странах Западной Европы [5]. Конструк-

тивные решения, использованные ранее в отечественных аппаратах, не претерпели существенных изменений в современных импортных устройствах поверхностного охлаждения.

Развитие электронной промышленности заставило инженеров обратиться к известному эффекту Пельтье с целью создания охлаждающих устройств в электронной аппаратуре. В настоящее время термоэлектрический метод охлаждения приборов достаточно широко распространен благодаря ряду преимуществ по сравнению с другими методами охлаждения (простота управления, возможность тонкого регулирования температуры, бесшумность работы, высокая надежность, отсутствие движущихся частей). При этом на рынке имеется большое количество термоэлектрических модулей с различными рабочими характеристиками, выпускаемые отечественной промышленностью.

Элементы Пельтье могут выполнять первоочередную функцию аппарата для гипотермии – охлаждение, благодаря чему они способны в полной мере заменить хладагент, использующийся в аналогах. Аппараты, выполненные на основе элементов Пельтье, имеют малый вес и габариты, обладают возможностью точной регулировки и настройки режимов охлаждения. Имеют низкое шумовое сопровождение, высокую надежность и могут использоваться в течение длительного времени.

В этой связи нами предложена конструкция аппарата, получившая патент на полезную модель [4].

Единичным элементом ТЭМ является термопара, состоящая из одного проводника (ветки) р-типа и одного проводника n-типа. Термоэлектрический модуль представляет собой совокупность таких термопар, обычно соединенных между собой последовательно по току и параллельно по потоку тепла. Термопары помещаются между двух керамических пластин. Количество термопар может варьироваться в широких пределах – от нескольких единиц до нескольких сотен, что позволяет создавать ТЭМ с холодильной мощностью от десятых долей ватта до сотен ватт.

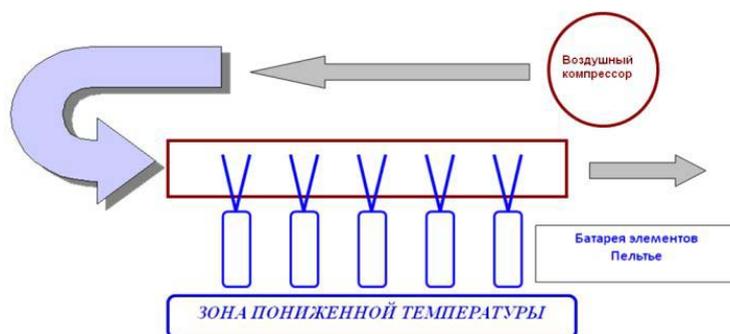


Рисунок 1. Принципиальная схема конструкции аппарата для охлаждения передней брюшной стенки на основе элементов Пельтье

Охлаждающий пояс — основная часть прибора. В основе конструкции использованы термоэлектрические модули Пельтье производителя ИПФ КРИОТЕРМ (г. Санкт-Петербург). ТЭМ в охлаждающем поясе располагаются в шахматном порядке на расстоянии 0,5-1 см друг от друга.

Заключение

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

1. Развитию актуального направления в интенсивной терапии перитонита — локальной абдоминальной гипотермии — в настоящее время препятствует отсутствие в клинике компьютеризированных систем для проведения этой процедуры (как у нас, так и за рубежом) на основе современных достижений медицинского приборостроения, в то время как летальность больных при перитоните за последние 20 лет не снижается.

2. За разработанный в процессе исследования вариант аппарата для проведения локальной абдоминальной гипотермии авторами статьи получен патент на полезную модель, которая прошла стадию доклинических испытаний.

3. Планируется проведение клинического испытания аппарата в отделениях реанимации и интенсивной терапии нашей клиники.

Литература

1. Васильков В.Г. Интенсивная терапия с использованием локальной гипотермии в неотложной хирургии органов брюшной полости. Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – Свердловск, 1977. 34 с.

2. Васильков В.Г., Сафронов А.И., Купцова М.Ф., Филиппова Л.А., Чернова Т.В. Интенсивная терапия перитонита. Четверть века поисков: Матер. XII-го съезда анестезиологов и реаниматологов (19-22 сентября 2010 г. Москва) С. 81–82.

3. Васильков В.Г., Шикунова Л.Г., Сафронов А.И., Купцова М.Ф., Филиппова Л.А., Чернова Т.В. Инновации в интенсивной терапии перитонита: Матер. IV съезда анестезиологов-реаниматологов Узбекистана: Ташкент, 24–25 октября 2013 г. С. 151–152.

4. Патент на полезную модель «Устройство для проведения локальной гипотермии» №198393, зарегистрировано в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации 01 февраля 2017 г. Авторы: Сафронов А.И., Киреев А.В., Васильков В.Г., Осипов К.О.

5. Шевелёв О.А., Бутров А.В. Технологии лечебной гипотермии в интенсивной терапии и реаниматологии // Неотложная медицина. 2010. № 3.

Сведения об авторах

Валерий Григорьевич Васильков

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

Эл. почта: air@piuv.ru

ПИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Пенза, Россия

Алексей Иванович Сафронов

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

Эл. почта: air@piuv.ru

ПИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Пенза, Россия

Дмитрий Владимирович Осинькин

асс. каф. анестезиологии, реаниматологии и скорой медицинской помощи

Эл. почта: air@piuv.ru

ПИУВ – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Пенза, Россия

Information about authors

Valery G. Vasilkov

M.D., Prof., Head of Department of Anesthesiology, Resuscitation and Emergency Care

E-mail: air@piuv.ru

PIFTPh - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia

Penza, Russia

Alexey I. Safronov

Associate Professor, Department of Anesthesiology, Resuscitation and Emergency Care

E-mail: air@piuv.ru

PIFTPh - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia

Penza, Russia

Osinkin Dmitriy V

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

E-mail: air@piuv.ru

PIFTPh - Branch Campus of the FSBEI FPE RMACPE MOH Russia

Penza, Russia

ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ТИОЛОВЫЙ СТАТУС КЛЕТОК ЛИНИИ CACO-2 В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

В статье обсуждается воздействие пероксида водорода в разных концентрациях на клетки Caco-2. Полученные результаты показали, что в условиях окислительного стресса, индуцируемого H₂O₂ в течение 72 часов в концентрациях 50 и 100 мкМ отмечается снижение выживаемости и трансэпителиального сопротивления клеток линии Caco-2. Уровень окисленных тиолов статистически значимо возрастает при концентрации пероксида водорода 10 мкМ за счет легкодоступных SH-групп, при 50 и 100 мкМ H₂O₂ за счет труднодоступных SH-групп.

Ключевые слова: окислительный стресс, пероксид водорода, Caco-2, выживаемость, трансэпителиальное сопротивление клеток, тиоловый статус.

Abalenikhina Y.V., Shchulkin A.V., Erokhina P.D.,
Chernykh I.V., Yakusheva E.N.
Ryazan State Medical University

SURVIVAL AND THIOL STATUS OF CELLS CACO-2 IN THE CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS

Under conditions of oxidative stress induced by H₂O₂ for 72 hours at concentrations of 50 and 100 mM there is a decrease in survival and transepithelial resistance of cell line Caco-2. The level of oxidized thiols increases significantly at the concentration of H₂O₂ of 10 mM due to easily accessible SH-groups, at 50 and 100 mM H₂O₂ due to hard-to-reach SH-groups.

Key words: oxidative stress, hydrogen peroxide, Caco-2, survival, transepithelial resistance of cells, thiol status.

Введение

Клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (линия Caco-2) представляют собой клетки, которые при длительном культивировании способны спонтанно дифференцироваться в эпителиальную структуру, обладающую свойствами кишечного эпителия [8]. В связи с этим, данная клеточная линия широко используется для изучения абсорбции ксенобиотиков в кишечнике.

Формирование эпителиоподобной структуры во многом зависит от дифференциальной активности клеток и их жизнеспособности. В разных условиях данные показатели могут изменяться, что соответственно может влиять на транспорт веществ как по средствам трансцеллюлярного, так и парацеллюлярного механизмов.

Активные формы кислорода (АФК) образуются в клетках в ходе нормального метаболизма в аэробных условиях. Однако в физиологических условиях их количество поддерживается на стационарном уровне, за счет функционирования антиоксидантной системы [4], и они играют в основном регуляторную роль [10]. При развитии патологических процессов может происходить чрезмерная продукция АФК, истощение антиоксидантной системы защиты, что в итоге приводит к развитию окислительного стресса. Окислительный стресс, в свою очередь, сопровождается повреждением макромолекул (липидов, белков, ДНК). При этом наиболее чувствительными к повреждению являются серосодержащие белковые молекулы [10].

Цель работы

Оценить выживаемость, трансэпителиальное сопротивление и уровень окисленных тиолов клеток линии Caco-2 в условиях окислительного стресса разной степени выраженности.

Материалы и методы

Исследования выполнены *in vitro* на линии клеток Caco-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека), полученной из ФГБУН ИНИЦ РАН, Санкт-Петербург. Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) («Sigma-Aldrich», Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ) («Sigma-Aldrich», Германия), 15% бычьей сыворотки («Sigma-

Aldrich», Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («Sigma-Aldrich», Германия) в 96-луночном планшете («Corning», США) – для оценки цитотоксичности пероксида водорода; в 6-луночном планшете («Corning», США) – для оценки влияния пероксида водорода на содержание легко- и труднодоступных SH-групп; в специальных трансвелл-системах (12 mm Transwell® with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, «Corning», США) для для оценки трансэпителиального сопротивления клеток.

Для выявления цитотоксичных концентраций пероксида водорода использовали скрининговый метод оценки выживаемости клеток. Метод основан на реакции восстановления желтой соли тетразолия (МТТ-реактив; 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н тетразолевый краситель) митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до пурпурных кристаллов формазана (МТТ-ф), которые растворяют в диметилсульфоксиде и по оптической плотности полученного раствора оценивают цитотоксичность исследуемого вещества [1]. Оптическую плотность раствора в лунке определяли при 530 нм и вычитали измененное фоновое поглощение при 620 нм с помощью планшетного ридера (написать название Awareness Technology, США).

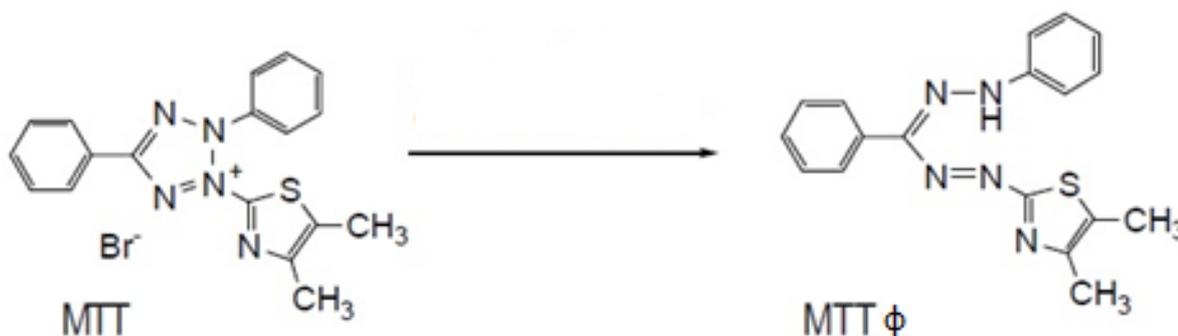


Рис.1 Реакция превращения 3-(4,5-диметилтиазол – 2-ил)-2,5-дифенилтетразолия в нерастворимый пурпурный формазан.

Данный метод отражает метаболическую активность клеток, обусловленную активностью митохондриальных ферментов, и косвенно свидетельствует о цитотоксичности изучаемого вещества.

Выживаемость клеток Сасо-2 в присутствии пероксида водорода в указанных концентрациях рассчитывали по формуле:

$(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность.

Целостность эпителиального барьера оценивали путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) с использованием вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США) и выражали в мОм*см² [6].

Содержание тиоловых групп в лизате клеток определяли в неденатурирующих условиях методом Элмана с DTNB (5,5'-дителиобис(2-нитро)бензоатом, «Serva», Германия) [3].

Легкодоступными тиоловыми группами (SH_л) считали прореагировавшие (при pH=7,4) за первые 3 минуты, а с 3 по 30 минуты реакции считали труднодоступными (SH_т). Показатель соотношения легко- и труднодоступных тиоловых групп (K1) рассчитывали по формуле: $K1 = \text{SH}_л / \text{SH}_т$ [2].

Значения представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. Статистические гипотезы проверяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), post-hoc Ньюмена-Кейсла. Критический уровень значимости принимали равным 0,05.

Полученные результаты

Полученные результаты показывают, что выживаемость клеток Сасо-2 статистически значимо снижалась относительно контроля при инкубации с пероксидом водорода в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ (рис. 2а). Трасэпителиальное сопротивление монослоя клеток не изменялось при инкубации с H₂O₂ в концентрациях 0,1 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ

и статистически значимо снижалось после инкубации с пероксидом водорода в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ (рис. 2б), что согласуется с данными литературы [5].

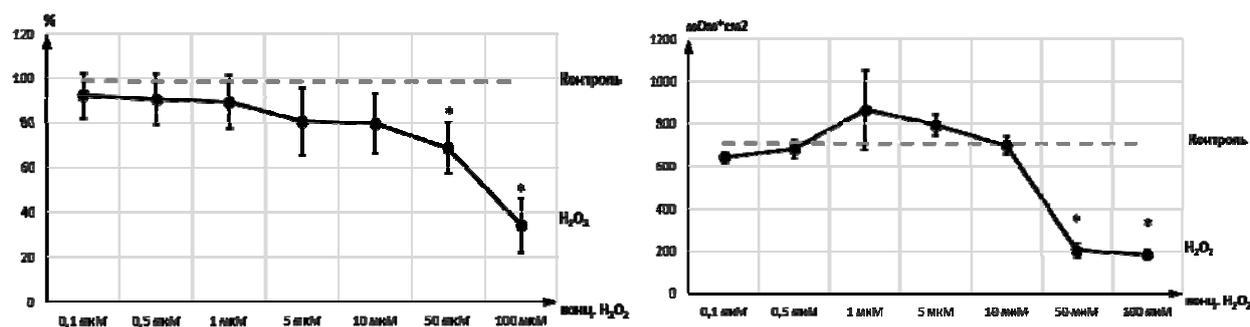


Рис. 2. Изменение выживаемости (слева) и трансэпителиального сопротивления клеток Caco-2 (справа) от времени инкубации с пероксидом водорода 72 ч в концентрациях 0,1-100 мкМ.

Примечание: * - статистически значимые отличия от группы контроль (p<0,05)

Для оценки степени окислительного стресса проводили определение уровня восстановленных тиолов. Сравнение суммарного содержания тиоловых групп клеточного лизата показало, что уровень восстановленных тиолов (SH-групп) статистически значимо снизился в группах при инкубации клеток с H₂O₂ в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ относительно значений контрольной группы. Указанные изменения при концентрации пероксида водорода 10 мкМ обусловлены легкодоступными SH-группами, при концентрации 50 мкМ – труднодоступными, а при концентрации 100 мкМ – легко- и труднодоступными SH-группами. Инкубация клеток в присутствии пероксида водорода в концентрации 0,1 и 0,5 мкМ не сопровождалась изменением тиолового статуса, однако концентрации 1 мкМ и 5 мкМ приводили к изменению соотношения легко- и труднодоступных тиоловых групп (K1) в сторону первых (таблица 1).

Таблица 1

Показатели содержания фракций тиоловых групп в лизате клеток Caco-2 на фоне добавления пероксида водорода в разных концентрациях

	SHл (мМ)	SHт (мМ)	K1 (относ. ед.)	Общее содержание SH-групп (мМ)
Контроль	0,25±0,07	0,26±0,06	0,94±0,07	0,51±0,13
H ₂ O ₂ 0,1 мкМ	0,24±0,09	0,26±0,10	0,92±0,04	0,49±0,19
H ₂ O ₂ 0,5 мкМ	0,26±0,06	0,25±0,05	1,06±0,04*	0,51±0,11
H ₂ O ₂ 1 мкМ	0,22±0,02	0,19±0,01	1,16±0,13*	0,40±0,02
H ₂ O ₂ 5 мкМ	0,27±0,01	0,20±0,01	1,34±0,06*	0,47±0,02
H ₂ O ₂ 10 мкМ	0,19±0,04*	0,21±0,07	1,28±0,30	0,35±0,04*
H ₂ O ₂ 50 мкМ	0,21±0,05	0,16±0,01*	1,34±0,24	0,37±0,06*
H ₂ O ₂ 100 мкМ	0,15±0,02	0,16±0,01*	1,32±0,34	0,38±0,08*

Примечание: * - статистически значимые отличия от группы контроль (p<0,05)

Воздействие пероксида водорода на клетки линии Caco-2 приводит к снижению выживаемости клеток и развитию окислительного стресса разной степени выраженности в зависимости от концентрации H₂O₂.

Реакционная способность тиоловых групп зависит от их локализации в белковой макромолекуле и ее микроокружения. Легкодоступные SH-группы располагаются на поверхности белка и реагируют быстрее, труднодоступные («скрытые») тиолы можно определить только после денатурации молекулы белка [2]. При концентрации пероксида водорода 1 и 5 мкМ изменяется соотношение легко- и труднодоступных белков, в сторону легкодоступных, что свидетельствует о молекулярных изменениях структуры тиолсодержащих молекул. При концентрации H₂O₂ 10 мкМ общее содержание окисленных тиолов возрастает за счет легко-

доступных тиолов, после увеличения концентрации пероксида водорода до 50 мкМ и 100 мкМ наблюдается денатурация белковых молекул, о чем свидетельствует преобладание труднодоступных тиолов.

При развитии окислительного стресса в клетке реагируют различные способы защиты – это сигнальные пути и работа антиоксидантной системы. Известно, что ключевую роль в формировании межклеточных контактов при формировании монослоя играют Src-киназы (с-Src). На данный момент исследована роль Src-киназы в регуляции плотности эпителиального контакта на монослоях клеток Caco-2 [9]. Доказано, что окислительный стресс вызывает активацию и мембранную транслокацию с-Src. Результаты Seltana A. et al. показывают, что экспрессия Src-киназы задерживает вызванное окислительным стрессом разрушение плотных клеточных контактов и ускоряет индуцированное кальцием формирование монослоя в клетках Caco-2, что объясняет сохранение TEER при концентрации H₂O₂ 0,1-10 мкМ. Известным фактом является, что HSP 72 защищает кишечные эпителиальные клетки за счет поддержания целостности актинового цитоскелета [7].

Выводы

1. Выживаемость клеток линии Caco-2 статистически значимо снижается при воздействии H₂O₂ в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ в течение 72 часов.
2. Тиоловый статус клеток линии Caco-2 изменяется при воздействии H₂O₂ в концентрации 10 мкМ за счет легкодоступных SH-групп, после увеличения концентрации пероксида водорода до 50 мкМ и 100 мкМ за счет труднодоступных SH-групп.
3. Трансэпителиальное сопротивление клеток линии Caco-2 сохраняется при концентрации H₂O₂ 1- 10 мкМ и снижается при 50-100 мкМ.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются результаты о воздействии пероксида водорода на тиоловый статус, выживаемость и состояние монослоя клеток Caco-2 в условиях окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода. Полученные данные демонстрируют, что барьерная функция слизистой оболочки кишечника может быть нарушена реактивными метаболитами кислорода, которые увеличивают проницаемость слизистой оболочки и нарушают актиновый цитоскелет, целостность которого важна для поддержания монослоя эпителиальных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-1856.2020.7.

Литература

1. Аникина Л.В., Пухов С.А., Дубровская Е.С., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 12–7. С. 1423–1427.
2. Быков И. М., Попов К. А., Егорова И. А., Сторожук А. П. Оценка показателей тиолового метаболизма плазмы крови больных воспалительными заболеваниями органов малого таза при проведении антиоксидантной коррекции // *Медицинский вестник северного кавказа* 2018. Т. 13. № 2. С. 402–406.
3. Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., Talfournier F., Van Dorsselaar A., Branlant G. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, No. 46. P. 35908–13. DOI: 10.1074/jbc.M006137200.
4. Bulger E.M., Helton W.S. Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology clinics of North America*. 1998. Vol. 27, No.2. P. 403-19 DOI:10.1016/S0889-8553(05)70010-8.
5. Catalioto R.-M., Festa C., Triolo A., Altamura M., Maggi C. A., Giuliani S. Differential effect of ethanol and hydrogen peroxide on barrier function and prostaglandin E2 release in differ-

entiated Caco-2 cells: selective prevention by growth factors. J. Pharm. Sci. 2009. Vol. 98, No. 2. P. 713-727. DOI: 10.1002/jps.21439.

6. Ferraretto A., Bottani M., De Luca P., Cornaghi L., Arnaboldi F., Maggioni M., Fiorilli A., Donetti E. Morphofunctional properties of a differentiated Caco2/HT-29 co-culture as an *in vitro* model of human intestinal epithelium. Biosci Rep. 2018, Vol. 38, No.2. BSR20171497. DOI: 10.1042/BSR20171497.

7. Musch M.W., Sugi K., Straus D., Chang E.B. Heat-shock protein 72 protects against oxidant-induced injury of barrier function of human colonic epithelial Caco2/bbe cells. Gastroenterology. 1999. Vol. 117. No.1. P. 115–122. DOI:10.1016/s0016-5085(99)70557-3.

8. Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stamatii A., Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biol. Toxicol. 2005. Vol. 21, No. 1. P. 1–26. DOI: 10.1007/s10565-005-0085-6.

9. Seltana A., Lepage M., Guezguez A., Basora N. Src family kinase inhibitor PP2 accelerates differentiation in human intestinal epithelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012. Vol. 430, No. 4. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.085.

10. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative stress. Redox. Biol. 2017. Vol. 11. P. 613–619. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.035

Сведения об авторах

Юлия Владимировна Абаленихина

канд. биол. наук., доц. каф. биологической химии с курсом КЛД ФДПО

Эл. почта: abalenihiina88@mail.ru

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Алексей Владимирович Щулькин

канд. мед. наук, доц., доц. каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО

Эл. почта: alekseyshulkin@rambler.ru

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Пелагея Дмитриевна Ерохина

студентка лечебного факультета

Эл. почта: hippopotamus-cat-19@yandex.ru

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Черных Иван Владимирович

канд. биол. наук, зав. каф. фармацевтической химии

Эл. почта: ivchernykh88@mail.ru

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Якушева Елена Николаевна

д-р, мед. наук, проф., зав. каф. фармакологии с курсом фармации ФДПО

Эл. почта: e.yakusheva@rzgmu.ru

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Россия

Information about authors

Yulia V. Abalenikhina

PhD, Associate Professor of the Department biological chemistry

E-mail: abalenihiina88@mail.ru

Ryazan State Medical University,
Ryazan, Russia.

Aleksey V. Shchulkin

MD, PhD, Ass. Prof. of the Department of Pharmacology with Course of PFAPE

E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia.

Pelageya D. Erokhina

student of the therapeutic faculty

E-mail: hippopotamus-cat-19@yandex.ru

Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia

Ivan V. Chernykh

PhD in Biological Sciences, Head of the Department Pharmaceutical chemistry

E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia.

Elena N. Yakusheva

MD, PhD, Professor, Head of the Department of Pharmacology with Course of PFAPE

E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Ryazan State Medical University
Ryazan, Russia.

ТИОЛЫ ГЕМОГЛОБИНА: БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И РЕГУЛЯЦИЯ

Гемоглобин человека имеет два реакционноспособных цистеина (Cys-93β), включение которых в состав динитрозильных комплексов железа регулирует их активность. Тиолы в составе комплексов проявляют повышенную реакционную способность по отношению к электрофилам и оказываются защищенными от окисления гидроперекисью трет-бутила.

Ключевые слова: гемоглобин, тиолы, динитрозильные комплексы железа, пероксид трет-бутила

Kosmachevskaya O.V.², Nasybullina E.I.¹,
Novikova N.N.², Shumaev K.B.¹, Topunov A.F.¹

¹Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,

²National Research Center "Kurchatov Institute",

HEMOGLOBIN THIOLS: BIOLOGICAL SIGNIFICANCE AND REGULATION

Human hemoglobin has two reactive cysteines (Cys-93β) located on the surface of the molecule. Inclusion of these thiols in the composition of dinitrosyl iron complexes is one way of regulating their reactivity. The thiols bound into complexes exhibit enhanced reactivity with electrophiles and are protected from oxidation by tert-butyl hydroperoxide.

Key words: hemoglobin, thiols, dinitrosyl iron complexes, tert-butyl peroxide

Введение

Значение цистеинов для физиологии клетки огромно, поскольку эти аминокислоты подвержены широкому спектру посттрансляционных модификаций, многие из которых обратимы. Тиоловые группы обладают такими свойствами, как нуклеофильность, обратимое окисление-восстановление и способность к связыванию металлов, благодаря которым они чрезвычайно чувствительны к кислотно-основному, окислительно-восстановительному и электрофильно-нуклеофильному равновесию [1-3]. На важную роль цистеинов в функционировании белков указывает и тот факт, что они в белках часто имеют консервативное расположение [4].

В настоящее время доказано, что сульфгидрильные группы играют важную роль в системе проведения сигнала внутри клетки. Посредством модификации SH-групп ферментов, рецепторов, транскрипционных факторов и других белков-регуляторов происходит интеграция различных информационных потоков для выработки оптимального ответа клетки на внешнее воздействие [2, 5-7].

Динитрозильные комплексы железа как модуляторы реакционной способности цистеинов гемоглобина

Среди известных посттрансляционных модификаций цистеина можно отметить формирование динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) – комплексов, содержащих два лиганда, ион железа (Fe^{2+}) и две молекулы оксида азота (NO). Связанные с белковыми цистеинами ДНКЖ являются стабильной формой депонирования NO в организме [8], однако нельзя исключить, что эти комплексы функционируют в качестве регуляторов активности белковой молекулы и настройки ее физико-химических свойств.

Критическими для функционирования белков являются SH-группы, входящие в активный центр, а также расположенные на поверхности молекулы. Гемоглобины позвоночных содержат поверхностные реакционноспособные цистеины [9], многие из которых имеют сходную локализацию. Гемоглобин содержит два реакционноспособных цистеина (Cys-93β) на тетрамер. Показано, что с участием этих цистеинов и формируются ДНКЖ [10, 11].

Ранее нами была показана способность ДНКЖ, связанных с Cys-93β, защищать Hb от окислительной модификации, вызванной гидропероксидами [10-12]. Мы предположили, что связанные с гемоглобином ДНКЖ также могут быть модуляторами реакционной активности Cys-93β.

Поэтому целью настоящей работы было изучение влияния ДНКЖ на реакционную активность SH-групп гемоглобина при действии на него гидропероксида *трет*-бутила, который является водорастворимым аналогом гидропероксидов липидов и широко используется для моделирования процессов перекисного окисления в живых системах [13, 14].

В молекуле гемоглобина человека содержится шесть остатков цистеина: по два в каждой β -цепи (Cys-93 и Cys-112) и по одному в каждой α -цепи (Cys-104). В интактном Hb имеется всего два доступных реакционноспособных цистеина (Cys-93 β) [15], которые расположены вблизи гистидина (His-92), координирующего ион железа. Такая локализация цистеинов делает их чувствительными к конформационным превращениям белка, вызванных присоединением лиганда к гемовому железу. Влияние электронного состояния гема на реакционную способность Cys-93 β было обнаружено еще в 1960-х годах и получило название « Δ SH-эффекта» [16]. Активность SH-групп зависит как от природы гемового лиганда, так и от степени насыщения лигандом гемовых групп.

Для оценки реакционной способности сульфгидрильных групп использовали высокоспецифичный флуоресцентный реагент на восстановленные тиолы – ThioGlo1, образующий ковалентные аддукты с SH-группами [17].

Влияние включения SH-групп в состав ДНКЖ на их реакционную способность изучали в зависимости от концентрации реагента ThioGlo1 и от концентрации окислителя *t*-BOOH. В первом случае флуоресценция тиолового аддукта линейно возрастала при увеличении концентрации ThioGlo1 в реакционной смеси. В экспериментах с Hb-S-ДНКЖ интенсивность флуоресценции была выше по сравнению с Hb-SH. Во втором случае интенсивность флуоресценции тиолового аддукта Hb-S-ДНКЖ также превосходила флуоресценцию Hb-SH, причем с увеличением концентрации окислителя возрастала и эта разница. Вероятно, включение SH-групп в состав ДНКЖ продлевает время их нахождения в форме тиолат-аниона (R-S⁻), характеризующейся выраженными нуклеофильными свойствами, увеличивающими реакционную способность комплексов в отношении ThioGlo1.

Следующим этапом было изучение изменения во времени флуоресценции тиоловых аддуктов с ThioGlo1 после добавления к раствору гемоглобина *t*-BOOH в молярном соотношении 1 : 10. Гидропероксид *трет*-бутила в Hb-SH и Hb-S-ДНКЖ сначала вызывал незначительное (~7%) увеличение интенсивности флуоресценции, а затем снижение, которое свидетельствует об окислении SH-групп. К 80-той минуте интенсивность флуоресценции падала в обоих случаях ~ на 15%. В первые минуты реакции происходил скачок флуоресценции, который, вероятно, связан с образованием активированных форм тиола: тиолат-аниона (R-S⁻) и сульфеновой кислоты (R-SOH). Известно, что образование активированных тиолов происходит в условиях мягкого окисления остатков цистеина [2, 5], что соответствует условиям эксперимента. Следует отметить, что в Hb-S-ДНКЖ нахождения тиолов в активированном состоянии было дольше, чем в Hb-SH.

Чтобы проверить, действительно ли наблюдаемое повышение флуоресценции тиоловых аддуктов связано с их включением в состав комплексов, было исследовано взаимодействие *t*-BOOH с низкомолекулярным тиолом – восстановленным глутатионом (GSH). Добавление к раствору глутатиона *t*-BOOH в молярном соотношении 1 : 2,5 показало, что в GSH тиоловые группы окисляются и к концу измерений (20 минут) их количество составляло 50% от исходного уровня. Ранее нами были получены сходные результаты при окислении GSH и GS-ДНКЖ хлорноватистой кислотой [14]. В GS-ДНКЖ в начале происходило увеличение флуоресценции и только затем снижение. При этом к 20 минуте окислилось только 30% тиолов.

Связанные с белком глутатионовые ДНКЖ слабо реагируют с органическими гидроперекисями. Однако разрушение ДНКЖ может быть спровоцировано оксоферрильной формой Hb (Hb-Fe^{IV}=O), образующейся в реакции с Hb с *t*-BOOH [11]. Возможный молекулярный механизм антиоксидантного действия ДНКЖ в этом случае связан с восстановлением радикалов Hb-Fe^{IV}=O [12, 18]. Антиоксидантное действие также может быть обусловлено восстановлением оксоферрильной формы и нитрозилированием гемовой группы оксидом азота, высвобождающимся при распаде ДНКЖ [18].

Оксоферильная форма гема является очень сильным окислителем, модифицирующим белковую цепь гемопротеидов [19, 20]. При этом в результате одноэлектронного окисления остатков тирозина формируются феноксильные радикалы, которые могут окислять остатки цистеина с образованием тиольных радикалов [21], которые участвуют в образовании дисульфидных связей. Поэтому на следующей стадии была исследована агрегация молекул Hb с помощью SDS-электрофореза в ПААГ с дитиотрептолом (ДТТ), восстанавливающим дисульфидные связи. Анализ полученных электрофореграмм показал, что в присутствии *t*-BOOH в обоих вариантах белка образовывались ковалентно-сшитые димеры. В Hb-SH количество высокомолекулярных форм было больше, чем в Hb-S-ДНКЖ. Поскольку образцы белка содержали ДТТ, то можно заключить, что димеризация Hb обусловлена реакцией тирозиновых радикалов.

Однако в Hb-S-ДНКЖ при концентрациях *t*-BOOH 6,8 и 11 mM возникали крупные белковые агрегаты, которые не входили в разделяющий гель. Это может быть связано с распадом динитрозильных комплексов при высокой концентрации окислителя и высвобождении ионов Fe²⁺, которые реагируют с пероксидами с образованием свободных радикалов, провоцирующих дальнейшее окисление белка. Двойственная роль ДНКЖ как антиоксиданта при низких концентрациях окислителя и прооксиданта при высоких неоднократно подчеркивалась в наших работах [10-12, 22].

Можно высказать и дополнительное объяснение наблюдаемым фактам. Расположенные на поверхности белка тиолы являются легкодоступными мишенями для активных форм кислорода. Вступая в реакцию с окислителем, они тем самым защищают другие аминокислотные остатки от необратимой окислительной модификации. В том случае, если тиолы заблокированы, и не могут прореагировать с АФК, под удар попадают тирозин и триптофан, что приводит к множественным межмолекулярным сшивкам и накоплению крупных белковых агрегатов. Роль Cys-93β в защите гемоглобина от денатурации и полимеризации в реакции с H₂O₂ была показана в работах [23, 24].

Биологическое значение цистеинов гемоглобина

Роль Cys-93β в функционировании гемоглобина и эритроцитов до сих пор до конца не ясна. На важное биологическое значение этих тиолов указывают высокая сохранность Cys-93β у позвоночных [9], аллостерическая регуляция реакционной способности [16] и высокая внутриклеточная концентрация (~10 mM исходя из концентрации Hb в эритроцитах человека при ~40% гематокрите) Активно обсуждается гипотеза об участии Cys-93β в метаболизме оксида азота (NO) и в его экспорте [7, 25-28]. Поскольку реакционная способность Cys-93β зависит от степени насыщения Hb кислородом, эти тиолы могут участвовать во внутриклеточной редокс-сигнализации, которая осуществляется через взаимодействие Hb с компонентами мембраны эритроцита [28]. Тиоловые группы могут участвовать в регуляции равновесия димерной и тетрамерной форм Hb, от которого зависит образование O₂^{•-} и, соответственно, H₂O₂ внутри клетки [29]. Имеются доказательства участия Cys-93β в регуляции окисления Hb. Этот тиол может реагировать с супероксидом, образующимся в гемовом кармане β-цепи в результате автоокисления, с образованием тиольного радикала [30]. Показано, что Cys-93β замедляет зависимое от H₂O₂ окисление оксигенированного Hb примерно в два раза [31]. Высказывается гипотеза, что Cys-93β является аллостерически регулируемым антиоксидантом в эритроцитах [31]. В работе [23] обсуждается роль цистеина 93β в обеспечении безопасного пути для передачи электронов, генерируемых в гемовом кармане. Образующийся в результате этого цистеиновый радикал может быть восстановлен глутатионом, содержание которого в эритроцитах велико.

Заключение

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

1) ДНКЖ могут быть регуляторами реакционной способности белковых SH-групп. В нормальных условиях включение SH-групп в ДНКЖ является обратимой (лабильной) по-

сттрансляционной модификацией, которая снижает их реакционную способность, но при этом не исключает их участия в редокс-превращениях. В условиях окислительного стресса комплексы распадаются, высвобождая тиолат-анион, который находится в состоянии повышенной готовности к реакции с активными формами кислорода и электрофильными соединениями, поскольку не нуждается в предварительном депротонировании. Образование аддуктов с электрофилами приводит к формированию стабильной модификации белка. Таким образом, ДНКЖ являются своеобразной меткой на реакционноспособные цистеины, предрасполагая их к стабильным модификациям, и обеспечивая селективность этой модификации.

2) Настройку реакционной способности цистеинов с помощью ДНКЖ можно отнести к механизмам регуляции структуры и функции белка посредством связывания ионов металлов. При этом связывание металлов цистеиновыми лигандами не только изменяет структуру белка, но также оказывает комплексное защитное действие благодаря одновременному снижению реакционной способности тиола и металла. Это позволяет отсрочить образование стабильных модификаций белковых тиолов в условиях низкого окислительного стресса и, наоборот, ускорить их при высоком стрессе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Литература

1. Paulsen C.E., Carroll K.S. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery // *Chemical Reviews*. 2013. N. 113. P. 4633–4679.
2. Go Y.M., Chandler J.D., Jones D.P. The cysteine proteome // *Free Radic Biol Med*. 2015. N. 84. P. 227–245.
3. Klomsiri C., Karplus P.A., Poole L.B. Cysteine-based redox switches in enzymes // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. 14. 1065–1077.
4. Gupta V., Carroll K.S. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime // *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2013. 1840. 847–875.
5. Wible R.S., Sutter T.R. Soft cysteine signaling network: the functional significance of cysteine in protein function and the soft acids/bases thiol chemistry that facilitates cysteine modification. // *Chem Res Toxicol*. 2017. 30. 3. 729–762.
6. Foyer C.H., Wilson M.H., Wright M.H. Redox regulation of cell proliferation: Bioinformatics and redox proteomics approaches to identify redox-sensitive cell cycle regulators // *Free Radic Biol Med*. 2018. 122. 137–149.
7. Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Электрофильная сигнализация: роль активных карбонильных соединений // *Успехи биологической химии*. 2019. 59. 419–454.
8. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes as a “working form” of nitric oxide in living. / Cambridge Scholars Publishing. 2019. 265 pp.
9. Reischl E., Dafre A.L., Franco J.L., Wilhelm Filho D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins // *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007. 146. 22–53.
10. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin – and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes // *Nitric Oxide*. 2008. 18. 37–46.
11. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress // *Methods in Enzymology*. 2008. 436. 445–461.
12. Шумаев К.Б., Петрова Н.Э., Заббарова И.В., Ванин А.Ф., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа // *Биохимия*. 2004. 69. 5. 699–705.

13. Domanski A.V., Lapshina E.A., Zavodnik I.B. Oxidative processes induced by tert-butyl hydroperoxide in human Red Blood Cells: Chemiluminescence studies. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. 70. 7. 761–769.
14. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O., Grigoryeva D., Panasenko O.M., Vanin A., Topunov A., Terekhova M., Sokolov A., Cherenkevich S.N., Ruuge E.K. Protective effect of dinitrosyl iron complexes with glutathione in red blood cell lysis induced by hypochlorous acid // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. 2019, Article ID 2798154, 12 pages.
15. Blacken G.R., Wang Y., Lopez J.A., X Fu. Cysteine 93 of hemoglobin beta chain is the major target of oxidation during red blood cell storage // *Blood*. 2009. 114. 22. 4040.
16. Riggs A. The binding of N-ethylmaleimide by human hemoglobin and its effect upon the oxygen equilibrium // *J Biol Chem*. 1961. 236. 1948–1954.
17. Hoff S., Larsen F.H Andersen M.L., Lund M.N. Quantification of protein thiols using ThioGlo1 fluorescent derivatives and HPLC separation // *Analyst*. 2013. 138. 2096–2103.
18. Gorbunov N.V., Yalowich J.C., Gaddam A., Thampatty P., Ritov V.B., Kisin E.R., Elsayed N.M., Kagan V.E. Nitric oxide prevents oxidative damage produced by tert-butyl hydroperoxide in erythroleukemia cells via nitrosylation of heme and non-heme iron // *J. Biol. Chem*. 1997. 272. 12328–12341.
19. Reeder B.J., Grey M., Silaghi-Dumitrescu R.-L., Svistunenko D.A., Bülow L., Cooper C.E., Wilson M.T. Tyrosine residues as redox cofactors in human hemoglobin // *J Biol Chem*. 2008. 283. 45. 30780–30787.
20. Vlasova I.I. Peroxidase activity of human hemoproteins: keeping the fire under control // *Molecules*. 2018. 23. 2561.
21. Bhattacharjee S., Deterding L.J., Jiang J., Bonini M.G., Tomer K.B., Ramirez D.C., Mason R.P. Electron transfer between a tyrosyl radical and a cysteine residue in hemoproteins: spin trapping analysis // *J Am Chem Soc*. 2007. 129. 44. 13493–13501.
22. Shumaev K.B., Dudylina A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. Dinitrosyl iron complexes: Formation and antiradical action in heart mitochondria // *Biofactors*. 2018. 44. 3. 237–244.
23. Winterbourn C.C., Carrell R.W. Oxidation of human haemoglobin by copper. Mechanism and suggested role of the thiol group of residue beta-93 // *Biochem J*. 1977. 165. 141–148.
24. Pimenova T., Pereira C.P., Gehrig P., Buehler P.W., Schaer D.J., Zenobi R. Quantitative mass spectrometry defines an oxidative hotspot in hemoglobin that is specifically protected by haptoglobin // *Journal of Proteome. Research*. 2010. 9. 4061–4070.
25. Stamler J.S., Singel D.J., Piantadosi C.A. SNO-hemoglobin and hypoxic vasodilation // *Nat. Med*. 2008. 14. 1008–1009.
26. Gaston B., May W.J., Sullivan S., Yemen S., Marozkina N.V., Palmer L.A., Bates J.N., Lewis S.J. Essential role of hemoglobin beta-93-cysteine in posthypoxia facilitation of breathing in conscious mice // *J Appl Physiol*. 2014. 116. 10. 1290–1299.
27. Zhao Y., Wang X., Noviana M., Hou M. Nitric oxide in red blood cell adaptation to hypoxia // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2018. 50. 7. 621–634.
28. Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф. Связывание эритроцитарного гемоглобина с мембраной как способ осуществления сигнально-регуляторной функции // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019. 55. 2. 107–123.
29. O'Neill J.S., Reddy A.B. Circadian clocks in human red blood cells // *Nature*. 2011. 469. 498–503.
30. Balagopalakrishna C., Abugo O.O., Horsky J., Manoharan P.T., Nagababu E., Rifkind J.M. Superoxide produced in the heme pocket of the beta-chain of hemoglobin reacts with the beta-93 cysteine to produce a thiyl radical // *Biochemistry*. 1998. 37. 13194–13202.
31. Vitturi D.A., Sun C.W., Harper V.M., Thrash-Williams B., Cantu-Medellin N., Chacko B.K., Peng N., Dai Y., Wyss J.M., Townes T., Patel R.P. Antioxidant functions for the hemoglobin β93 cysteine residue in erythrocytes and in the vascular compartment in vivo // *Free Radic Biol Med*. 2013. 55. 119–129.

Сведения об авторах

Ольга Владимировна Космачевская

канд. биол. наук, ст. науч. сотр

Эл. почта: rizobium@yandex.ru

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

Эльвира Ильгизовна Насыбуллина

канд. биол. наук, мл. науч. сотр.

Эл. почта: lvirus198709@rambler.ru

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

Наталья Николаевна Новикова

д-р физ.-мат. наук., зав. лабораторией

Эл. почта: nn_novikova@crys.ras.ru

НИЦ Курчатовский институт

Москва, Россия

Константин Борисович Шумаев

д-р биол. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: tomorov@mail.ru

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

Алексей Федорович Топунов

д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией

Эл. почта: aftopunov@yandex.ru

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Москва, Россия

Information about authors

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya

PhD, Senior research scientist

E-mail: rizobium@yandex.ru

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

Moscow, Russia

Elvira Ilgizovna Nasybullina

PhD, Junior research scientist

E-mail: lvirus198709@rambler.ru

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

Moscow, Russia

Natalya Nikolaevna Novikova

DSc, Head of laboratory

E-mail: nn_novikova@crys.ras.ru

National Research Center "Kurchatov Institute"

Moscow, Russia

Konstantin Borisovich Shumaev

DSc, Senior research scientist

E-mail: tomorov@mail.ru

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

Moscow, Russia

Alexey Fedorovich Topunov

DSc, Head of laboratory

E-mail: aftopunov@yandex.ru

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

Moscow, Russia

УДК 543.544.613.2:615.916

ГРНТИ 34.17.15

DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.21

Текуцкая Е.Е., Рябова И.С.

ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК, ИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ И МАГНИТНЫЕ ПОЛЯ

В работе изучены механизмы повреждений структуры ДНК, выделенной из цельной крови человека, после воздействия на образцы крови различных видов ионизирующего излучения и магнитного поля низкой частоты. Окислительные повреждения азотистых оснований и односторонние разрывы ДНК вызваны образованием активных форм кислорода, генерируемых излучениями.

Ключевые слова: 8-гидрокси-2-деоксигуанозин, односторонние разрывы ДНК, электромагнитное поле, ионизирующее излучение, активные формы кислорода, репарация

OXIDATIVE DAMAGE TO DNA, IONIZING RADIATION AND MAGNETIC FIELDS

In this work, we studied the mechanisms of damage to the structure of DNA extracted from human whole blood after exposure to blood samples of various types of ionizing radiation and a low-frequency magnetic field. Oxidative damage of nitrogenous bases and single-stranded DNA breaks are caused by the formation of reactive oxygen species generated by radiation.

Keywords: *8-hydroxy-2-deoxyguanosine, single-stranded DNA breaks, electromagnetic field, ionizing radiation, reactive oxygen species, repair*

Введение

Эндогенные и экзогенные источники вызывают различные виды повреждений биополимеров в любое время жизни клеточного цикла. Известными проявлениями стресс-реакции в клетках являются повреждения биологически значимых молекул и, прежде всего, ДНК. Нарушение или недостаточность процессов репарации и возникающие при этом мутации могут иметь катастрофические последствия [1]. В ряде статей [2-3] было показано, что при воздействии на взвесь лимфоцитов периферической крови человека электромагнитным излучением происходит образование активных форм кислорода (АФК). Образование АФК может приводить к повреждению первичной структуры ДНК [1] и накоплению окисленных азотистых оснований (8-OHdG), а в дальнейшем к появлению одностранных разрывов (ОР). Одностранные разрывы репарируются по негомологичным концам ДНК на всех этапах клеточного цикла, представляющий основной механизм репарации в G1(гуанин) или гомологичных рекомбинациях в различных фазах клеточного цикла. Они сопровождают действие многих агентов и являются вторичными, промежуточными дефектами при репарации.

Вопросы, связанные с возможностью инициации окислительного стресса ионизирующими излучениями и низкоинтенсивными факторами, такими, как низкочастотные магнитные поля (МП) по-прежнему остаются малоизученными.

Цель работы

Цель работы заключалась в оценке степени окислительных повреждений ДНК периферической крови здоровых доноров после воздействия различных видов ионизирующего излучения и переменным МП в диапазоне частот от 3 до 60 Гц *in vitro* с помощью определения уровня содержания 8-OHdG в ДНК с использованием иммуноферментного анализа и количества ОР ДНК.

Материалы и методы

Объектом исследований были лимфоциты, выделенные из периферической крови здоровых доноров (20 человек), мужчины, некурящие, возраст от 21 до 23 лет. Выделение чистой взвеси лимфоцитов из донорской крови проводили в градиенте плотности фиколлаурографина (плотность 1,077 г/мл). Для изучения влияния СВЧ-излучения на содержание ОР ДНК были использованы СВЧ генераторы: ГКЧ-53, Р2-68, Р2-69 мощностью 3 мВт. Образцы подвергали воздействию излучения в течение 10 минут при разных частотах. При изучении влияния гамма-излучения на содержание ОР ДНК в лимфоцитах был использован радиоактивный препарат ¹³⁷Cs с активностью 0,104 МБк.

Также образцы взвеси лимфоцитов в серии экспериментов обрабатывали импульсным газоразрядным лазером на парах меди с длинами волн генерации 510,6 и 578,2 нм.

Обработку ДНК переменным МП проводили в химически чистой и стерилизованной пластиковой чашке с толщиной облученного слоя 2 мм. В экспериментах использовали устройство для компьютерного исследования биологических жидкостей в переменном МП, описанное в работе [4]. Температуру раствора контролировали температурным датчиком с точностью до 0,2 °С и составляла 23 °С, начальная частота составляла 1 Гц и напряженность 24 ± 4 А / м, продолжительность обработки образца достигала 30 минут. Затем регистриро-

вали интенсивность флуоресценции водных растворов ДНК. После этого микроконтроллер изменял частоту МП с шагом 2 Гц в диапазоне от 1 до 50 Гц.

Количество ОР ДНК определяли после щелочной обработки лизатов и добавления бромистого этидия по интенсивности флуоресценции полученных образцов в кварцевой кювете на флуоресцентном спектрофотометре Hitachi F-2700 при длине волны возбуждения – 540 нм и $\lambda_{\text{полгл}}$ 610 ± 5 нм как это описано в [3].

С помощью иммуноферментного анализа определили содержание окислительных повреждений азотистых оснований 8-OHdG в ДНК лимфоцитов периферической крови человека после воздействия на них переменным МП. Использовался готовый набор DNA Damage ELISA Kit, включающий в себя моноклональные антитела к 8-OHdG. Определение осуществляли согласно протоколу. После внесения стоп-растворов измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере Thermo Fisher Scientific Multiskan (Финляндия).

Определение общего уровня перекисей липидов в образцах плазмы крови проводили с помощью спектрофотометрического метода, используя готовый набор PerOx Immundiagnostic AG (Germany).

Лабораторное диагностическое обследование выполнено в соответствии с обязательным соблюдением этических норм, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 г. с дополнениями 1983 года.

Результаты обрабатывали статистически (ПО StatPlus). Достоверность различий между выборками оценивали, используя непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Полученные результаты

После соответствующей обработки были сняты спектры флуоресценции лизатов лимфоцитов с бромистым этидием, спектральный диапазон регистрации составлял 500-740 нм. Как показали исследования, в лимфоцитах при воздействии гамма-излучения ^{137}Cs наблюдалось увеличение количества ОР ДНК при увеличении времени облучения. При воздействии излучения в течение 30 минут увеличение составляло $44,3 \pm 0,4$ %, в течение 60 минут на $56,5 \pm 0,9$ %, в течение 90 минут на $68,3 \pm 0,8$ % больше, чем в контрольном образце лимфоцитов без облучения.

Рассмотрено влияние СВЧ-излучения на появление ОР ДНК при облучении лимфоцитов на частотах 3,5 ГГц, 50 ГГц, 70 ГГц. В этом диапазоне работают терапевтические устройства для лечения больных облучением миллиметрового диапазона, в частности, для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, онкологических (совместно с традиционными методами) и многих других заболеваний. Примером такого прибора может служить терапевтическая установка „ЯВЪ-1" с рабочей длиной волны 5,60 мм (частота — 53534 ± 10 МГц) и плотностью мощности облучения раскрытия рупора — не менее 10 мВт/кв.см. Лимфоциты облучались СВЧ-излучением в течение 10 минут на частотах 3,5 ГГц, 50 ГГц, 70 ГГц при мощности 3 мВт. Выяснено, что с увеличением частоты количество ОР ДНК в лимфоцитах также увеличивается: при воздействии на них СВЧ-излучением с частотой 3,5 ГГц на $32,3 \pm 0,9$ %, с частотой 50 ГГц на $40,1 \pm 1,1$ %, с частотой 70 ГГц на $49,8 \pm 0,7$ % по сравнению с контрольными образцами. Как видно, повреждающий эффект СВЧ-излучения возрастает с увеличением частоты, поэтому использование в КВЧ-терапии более низких частот, возможно, будет увеличивать сохранность иммунокомпетентных клеток крови.

Известно применение в медицине лазера на парах меди (ЛПМ) с длинами волн генерации 510,6 и 578,2 нм. Взвесь лимфоцитов облучалась при данных длинах волн (578,2 и 510,6 нм) в течение 3 и 5 минут при средней мощности около 10 Вт. Наблюдалось увеличение количества ОР ДНК после облучения лазером при длине волны 510,6 нм на $18,1 \pm 0,7$ % (время облучения 3 мин) и на $6,1 \pm 0,5$ % (время облучения 5 мин) при длине волны 578,2 нм на $18,1 \pm 0,7$ % (время облучения 3 мин) и на $22,3 \pm 0,9$ % (время облучения 5 мин). Было обнаружено, что при длине волны генерации 578,2 нм в лимфоцитах образуется меньше ОР ДНК, чем при длине волны генерации 510,6 нм. При увеличении времени воздействия с 3 до 5 мин количество ОР ДНК лимфоцитов увеличивается в среднем в 2 – 2,5 раза.

Одним из ключевых биомаркеров окислительных повреждений нуклеиновых кислот, опосредованных с генерацией АФК, является образование 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-ОНdG) в ДНК. Уровни содержания 8-ОНdG и его аналогов 8-гидроксигуанозина и 8-гидроксигуанина связаны со многими дегенеративными заболеваниями. Так, взаимосвязь АФК и использование 8-ОНdG в качестве маркера оксидативного стресса были исследованы при многих заболеваниях, включая рак простаты, муковисцидоз, атопический дерматит и ревматоидный артрит.

При обработке образцов крови переменным МП *in vitro* выяснилось, что с увеличением частоты МП содержание 8-ОНdG в ДНК лимфоцитов изменяется сложным образом. Так, обработка МП с частотой 50 Гц не приводила к увеличению окисленных азотистых оснований 8-ОНdG в ДНК. Напротив, при воздействии МП с частотой 3 Гц наблюдалось увеличение количества 8-ОНdG в ДНК в 1,5 раза. Накопление повреждений 8-ОНdG в ДНК не может быть вызвано депуринизацией модифицированного основания, так как данная модификация приводит не к ослаблению, а к повышению устойчивости гликозидной связи.

Известно, что гуанин в ДНК имеет самый низкий окислительно-восстановительный потенциал среди природных оснований [5] и в наибольшей степени подвержен окислению. Как донор электронов, он способен отдавать свой электрон различным акцепторам, образуя гуанин-радикал-катион, который затем мигрирует вдоль цепи ДНК по гуанинам прыжковым способом, пока не происходит его окисление с образованием 8-охоG [6]. Возможно, что под действием МП с частотами 3, 30 Гц происходит и дальнейшее окисление 8-охоG до таких продуктов, как оксазолон, гуанидиногидантоин и спироиминодигидантоин. Таким образом, при воздействии МП с частотами от 3 до 30 Гц скорость доокисления 8-оксогуанина сопоставима со скоростью окисления нативных гуанинов ДНК. Кроме того, в ходе выполнения экспериментов выяснилось, что скорость образования продуктов окисления азотистых оснований ДНК под действием МП зависит от концентрации растворенного кислорода в растворе.

При обработке крови МП с частотами 5, 8, и 50 Гц наблюдалось увеличение содержания перекиси водорода – самой устойчивой формы из активных форм кислорода (АФК).

Наличие кислородного эффекта при низкоинтенсивных воздействиях на молекулу ДНК впервые продемонстрировано в работе [7]. В ней, частности, было показано, что образование продуктов депуринизации, урацила и 8-оксогуанина происходит в ДНК за счет АФК, образующихся в растворе под действием тепла. Это согласуется с мнением, изложенным в работах [2, 3], в которых указывается, что одной из причин изменения хемилюминесценции водных растворов ДНК при действии на них низкочастотного (НЧ) ЭМП может быть образование АФК в водном растворе. Об образовании двух- и односторонних разрывов в растворе ДНК под действием как пероксирадикалов, так и НЧ ЭМП отмечается и авторами статьи [5].

Увеличение уровня окисленных модификаций азотистых оснований 8-охоG в ДНК сыворотки крови здоровых доноров после обработки МП, по-видимому, связано с генерацией АФК при воздействии НЧ МП [3, 6, 7]. Установлено, что первичной мишенью при воздействии таких низкоинтенсивных физических факторов, как тепло, видимый свет, лазерное излучение (632,8 нм) является растворенный в водной фазе кислород [8]. Как отмечают авторы, начальным этапом для этого процесса является переход кислорода из триплетного в синглетное состояние. По оценке Красновского [9] время жизни синглетного кислорода в биологических системах невелико – от 0,2 для цитоплазмы до 1 μs для плазмы крови и 0,05 μs для мембраны эритроцитов, коэффициент диффузии находится в пределах от 4×10^{-6} до 7×10^{-7} cm^2s^{-1} . Даже этого короткого времени достаточно для запуска дальнейших процессов: восстановления синглетного кислорода до супероксид-анион радикала, протонированная форма которого дисмутирует с образованием наиболее долгоживущей АФК – перекиси водорода. Процессы образования АФК в водной среде происходят по типу химического осциллятора и постепенно затухают, если не поддерживаются внешней энергией низкоинтенсивных факторов, к которым можно отнести НЧ МП. Процессы такого характера крайне чувствительны к слабым резонансным воздействиям [2].

Несмотря на то, что энергия НЧ МП чересчур мала для какого-нибудь значительного повреждения ДНК, однако, ее может быть достаточно для перехода растворенного кислорода из триплетного в синглетное состояние и дальнейшей генерации каскада АФК. В хромосомах ДНК-связывающие белки защищают ее от окислительных повреждений, что связано как с компактной упаковкой молекулы ДНК, так и с взаимодействием белковых молекул с образующимися АФК. Однако, установлено [6], что долгоживущие белковые радикалы являются источниками продолжительного образования АФК, посредниками окислительного стресса в биологических системах и способны к переносу радикальных повреждений на ДНК. Так, гидропероксиды гистона H1 индуцируют образование 8-оксогуанина в ДНК [6]. Таким образом, все образующиеся при воздействии на растворы ДНК и образцы крови переменным МП АФК и белковые радикалы могут атаковать молекулу ДНК, тем самым приводя к окислительным повреждениям азотистых оснований и накоплению 8-ОНdG в ДНК [10].

Генетическая стабильность живых организмов в значительной степени определяется функционированием комплекса белков-гликозилаз, восстанавливающих структуру поврежденной ДНК в процессе эксцизионной репарации. Так, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (OGG1) удаляет 8-ОНdG из ДНК, оставляя после себя ОР. При нарушении и недостаточности функционирования слаженного комплекса репарации происходит образование разрывов ДНК.

Таким образом, появление и накопление окислительных повреждений 8-ОНdG ДНК после обработки крови здоровых доноров переменным МП и накопление ОР ДНК после обработки взвеси лимфоцитов СВЧ-, гамма- и лазерным излучениями может свидетельствовать с одной стороны о генерации АФК при воздействии различных видов излучения и переменным МП, а с другой – об участии АФК в повреждении структуры ДНК.

Заключение

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

Генерация активных форм кислорода при воздействии различных видов излучения и переменным МП на образцы крови *in vitro* приводит к накоплению содержания 8-охоG в ДНК.

Дальнейшее развитие окислительного стресса и нарушение процессов эксцизионной репарации ДНК приводит к появлению и накоплению ОР ДНК.

В основе подобных типов повреждений ДНК, приводящих к образованию ОР и продуктов окисления азотистых оснований, по-видимому, лежит универсальный механизм, связанный с генерацией АФК в водном растворе под действием переменных МП и ионизирующих излучений. Данный процесс оказывает существенное влияние на функциональные метаболические свойства биосистем в целом.

Литература

1. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease / M. Dizdaroglu // *Cancer Letters*. 2012. V. 327. P. 26–47
2. Текуцкая Е.Е. Влияние низкочастотного электромагнитного поля на хемилюминесценцию водных растворов ДНК / Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев, Г.П. Ильченко // *Биофизика*. 2015. Т. 60. № 6. С. 1099–1103 DOI 10.1134/S000635091506024X
3. Tekutskaya E.E. Conformational changes in natural biopolymers induced by electromagnetic field and cadmium ion exposure / E.E. Tekutskaya // *Russian Open Medical Journal*. 2019. V. 8. Uss. 2. DOI: 10.15275/rusomj.2019.0202. URL: <http://www.romj.org/2019-02>
4. Барышев М.Г. Устройство для поиска оптимальных параметров обработки биологических объектов переменным магнитным полем / М.Г. Барышев, Г.П. Ильченко, Е.Е. Текуцкая, В.С. Шелистов А.В. Никитин // *Измерительная техника*. 2017. № 6. С. 69–72. DOI: 10.1007/s11018-017-1247-7
5. Страйер Л. Биохимия. Т.3, – М: Мир, 1985.
6. Штаркман И.Н. Влияние аминокислот на образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в воде на образование 8-оксигуанина в ДНК при воздействии рентге-

новского излучения / И.Н. Штаркман, С.В. Гудков, А.В. Черников, В.И. Брусков // Биофизика. 2008. Т. 73. № 4. С. 576–581.

7. Chernikov A.V. Oxygen effect in heat-induced DNA damage / A.V. Chernikov, S.V. Gudkov, I.N. Shtarkman, V.I. Bruskov // Biophysics. 2007. V. 52. № 2. P. 185–190.

8. Гудков С.В. Образование активных форм кислорода в воде под воздействием видимого и инфракрасного излучения в полосах поглощения молекулярного кислорода / С.В. Гудков, О.Э. Карп, С.А. Гармаш // Биофизика. 2012. Т. 57. № 1. С. 5–13.

9. Krasnovsky A.A. Membrane and cell biology. 1998. V. 15. P. 530

10. Текуцкая Е.Е. Генерация активных форм кислорода под влиянием СВЧ-излучения и их генотоксическое действие / Е.Е. Текуцкая, М.Г. Барышев, Г.П. Ильченко // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2018. Т. 52, № 1. С. 56–61.

Сведения об авторах

Елена Евгеньевна Текуцкая

канд. хим. наук, доцент

Эл. почта: tekytska@mail.ru

ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет

Краснодар, РФ

Ирина Сергеевна Рябова

магистрант

Эл. почта: iren_141713@mail.ru

ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет

Краснодар, РФ

Information about authors

E.E. Tekutskaya

candidate of chemical Sciences, associate Professor

E-mail: tekytska@mail.ru

Of the Kuban state University

Krasnodar, Russia

I.S. Raybova

Undergraduate

Email: iren_141713@mail.ru

Of the Kuban state University

Krasnodar, Russia

УДК 616.12.-009.72-
085.849.11(045)-611.018.8
ГРНТИ 34.19.19
DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.22

Реутов В.П.¹, Сорокина Е.Г.², Сукманский О.И.^{3,4}

¹ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН
²ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья
детей Министерства здравоохранения РФ
³Одесский государственный аграрный университет
⁴Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Национальной
АМН Украины

ЦИКЛЫ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ В ОРГАНИЗМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Предлагаемая концепция циклической организации газотрансмиттеров позволяет дать ответ на вопрос: как живые организмы обеспечивают регуляцию и стабилизацию этих физиологически активных соединений, участвующих во внутри- и межклеточной сигнализации.

Ключевые слова: газотрансмиттеры, голографический принцип, принцип цикличности, регуляция содержания активных форм азота и кислорода, цикл оксида азота, цикл супероксидного анион-радикала, цикл сероводорода/диоксида серы.

Reutov V.P.¹, Sorokina E.G.², Sukmansky O.I.^{3,4}

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS;
²National Medical Center for Children's Health of the Ministry of Health of the RF;
³Odessa State Agrarian University, Odessa, Ukraine;
⁴Institute of Stomatology and Maxillo-Facial Surgery of the National Academy of
Medical Sciences of Ukraine; Odessa, Ukraine

GAS TRANSMITTER CYCLES IN THE MAMMAL ORGANISM

The proposed concept of the cyclic organization of gas transmitters allows us to answer the question: how do living organisms provide regulation and stabilization of these physiologically active compounds involved in intracellular and intercellular signaling.

Key words: gas transmitters, holographic principle, cyclic principle, regulation of the content of reactive nitrogen and oxygen species, nitric oxide cycle, superoxide anion radical cycle, hydrogen sulfide / sulfur dioxide cycle.

Введение. Согласно современным представлениям большая часть первичной атмосферы Земли состояла из водорода ($^1\text{H}_2$) и гелия (^4He). Эта атмосфера была сформирована из протопланетного облака в процессе образования солнечной системы в результате захвата гравитационным полем Земли указанных выше веществ/элементов [1]. События, которые происходили в Солнечной системе 5 млрд. лет тому назад, можно наблюдать с помощью современных астрофизических методов в галактике Андромеды [2]. Вторичная атмосфера Земли, возникшая после вулканических извержений, в основном содержала водород (H_2), метан (CH_4), аммиак (NH_3) и связанных между собой атомов водорода и кислорода (H_2O) [3–6]. Атомы, входившие в состав первичной и вторичной атмосферы Земли, стали основными компонентами клеток микроорганизмов, растений и животных [7]. Образно говоря, природа творила жизнь из того, что было. В настоящее время известно, что все живые организмы на 96% состоят из атомов водорода, углерода, азота и кислорода, которые входили в состав первичной и вторичной атмосферы Земли в свободном (H_2) или в связанном с другими атомами состоянии (CH_4 , NH_3 , H_2O) [8]. Остальные атомы, согласно современным представлениям, в том числе металлы и микроэлементы, которые можно обнаружить в составе живых организмов, составляют не более 4%. Появились они, как предполагают некоторые исследователи, из недр планеты в результате вулканических извержений [1–8]. Вопрос о том, каким образом неорганические соединения и органические вещества вошли в состав живых организмов, реализуя многочисленные регуляторные механизмы и системы на различных структурно-функциональных уровнях, является предметом исследования всей совокупности медико-биологических дисциплин. Почему это стало возможным, и, почему природа является единой на всех структурно-функциональных уровнях, остается одной из загадок, которую пытаются разгадать физики, химики и биологи на протяжении последних веков. Однако эти вопросы, сформулированные в другой форме, волновали практически всех естествоиспытателей мира, по крайней мере, на протяжении 2500 лет. В предлагаемой статье, анализируя

проблему газотрансмиттеров в организме млекопитающих, мы постараемся дать один из возможных ответов на поставленные вопросы.

Газовые трансмиттеры в системах внутри- и межклеточной сигнализации. С участием атомов *водорода, углерода, азота и кислорода* были образованы соединения, которые стали выполнять энергетическую функцию в условиях существования одноклеточных организмов [9–12]. Эти же атомы положили начало для оксида азота (NO), супероксидного анион-радикала ($\bullet\text{O}_2^-$), оксида углерода (CO), а также сероводорода (H_2S), диоксида серы (SO_2) и полисульфидов (H_2S_{2n}), которые стали выполнять функцию внутриклеточных посредников [13–36].

После появления многоклеточных организмов соединения $\bullet\text{O}_2^-/\text{O}_2$, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, $\text{SO}_4^-/\text{SO}_3^-$, CO_2/CO , которые ранее образовывались при дыхании и использовались в качестве акцепторов электронов, или в системах внутриклеточной сигнализации, были приспособлены для межклеточной сигнализации. Однако эти процессы и явления были неизвестны в науке еще во второй половине XX в. До открытия этих соединений в живых организмах, обнаружения их эндогенной продукции, эти молекулы были известны как токсические вещества. Поэтому с полным основанием можно сказать, что проблема газообразных посредников (газотрансмиттеров) стала новой проблемой XXI в. Именно в последние десятилетия ученые пришли к осознанию специфической роли газотрансмиттеров, выполняющих в клетках сигнальную функцию [15–20]. Эти вещества были отнесены к новому классу биологически активных веществ, с высокой специфичностью участвующих в межклеточной и внутриклеточной коммуникации [15–40].

Химическая природа газовых медиаторов/трансмиттеров. Газовые трансмиттеры являются малыми молекулами, легко преодолевают биологические мембраны и не действуют через специальные рецепторы [41–47]. Эти соединения синтезируются в организме при помощи специальных ферментов и являются лабильными (период их полужизни – секунды). Они не накапливаются в клетках и субклеточных структурах, поскольку не могут быть заключены в везикулы, как нейромедиаторы [48–51]. Иногда их могут связывать металлы белков и ферментов, а также SH-группы, входящие в состав аминокислот, биофенолы, например, тирозин и его производные, свободный или входящий в состав белков и т.д. Газотрансмиттеры обладают эндокринными, паракринными, аутокринными и интракринными эффектами [52–54].

Циклическая организация газотрансмиттеров. На протяжении последних десятилетий мы высказывали предположение, что циклическая организация $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$ в клетках и в целом организме может быть следствием существования *такого принципа*, всеобщность (или глобальность) которого сопоставима с *принципом атомарного строения вещества* [7, 8, 55]. Этот принцип распространяет свое влияние практически на все структурно-функциональные уровни в живой и неживой природе, подчиняет поведение живых субъектов и неживых объектов, и, задает правила функционирования всем регуляторным системам, которые содержат элементы отрицательной и положительной обратной связи. Более того, этот принцип объясняет природу положительных и отрицательных обратных связей в живых организмах и неживых системах. Он также дает ответ на вопрос, почему развитие осуществляется по спирали, и, почему спирали являются одним из основных структурных элементов в ДНК, белках, в нервных волокнах (миелиновые оболочки), глиальных клетках (глиальные обкрутки в ЦНС) и т.д. Этот принцип также объясняет природу циклической/периодической закономерности в функционировании регуляторных систем практически на всех структурно-функциональных уровнях в живых организмах [7, 8, 55–69]. Кроме того, этот принцип и, вытекающие из него следствия, хорошо согласуются с другими концепциями и теориями российских и зарубежных ученых. Достаточно вспомнить Л.А. Орбели, который, анализируя физиологические процессы, отметил: мы мало считаемся с тем, что все процессы осуществляются циклически, и каждый процесс имеет свою цикличность. Хорошо известно положение Р. Вирхова: «Не жизнь в ненормальных условиях, не нарушение как таковое вызывает болезнь, напротив, болезнь начинается с недостаточности регуляторного аппарата». Поскольку любая регуляция

основана на положительной и отрицательной обратной связи, где сигнал поступает с выхода на вход системы, становится ясно, что в любых регуляторных и регулируемых системах мы имеем дело с замкнутыми циклами. В наших исследованиях мы, изучая вполне конкретные вещества (нитраты/нитриты и оксиды азота) [13], вышли на циклическую организацию их функционирования [56–70], затем обнаружили такую же циклическую организацию в системах других газовых трансмиттеров, проанализировали функционирование этих соединений в норме и при развитии патологических процессов [72]. Эти представления, развиваемые как для газотрансмиттеров, так и для других процессов и явлений живой и неживой природы, являются принципиально новыми потому, что они достигают той степени всеобщности/обобщенности и глобальности, которые выводят циклические процессы на уровень принципа. Такого принципа, каким является атомарный принцип строения вещества. Эти идеи и основанные на них исследования не повторяют другие разработки зарубежных и российских ученых. Вместе с тем они хорошо согласуются практически со всеми другими известными экспериментальными данными и теоретическими построениями. Приведем еще один пример. Французский математик, физик и философ Анри Пуанкаре (1854–1912) создал новый раздел математики – качественную теорию дифференциальных уравнений (1881–1882). Он показал существование огромного класса явлений, которые подчиняются периодическим закономерностям. Он также ответил на вопрос, каким образом, не решая уравнения, можно получить важную информацию о поведении семейства решений. «Всякое обобщение, – по мнению Пуанкаре, – до известной степени предполагает веру в единство и простоту природы». Что касается единства, то ученые, как правило, не встречают каких-либо затруднений. «Вопрос заключается, *каким образом, природа является единой?*»

С нашей точки зрения, *атомарный принцип строения вещества*, а также предложенные и обоснованные в наших работах как глобальные *принцип цикличности* и *голографический принцип* отвечают на вопрос А. Пуанкаре: *каким образом, природа является единой?* Напомним, что голографический принцип получил свое название от греческого слова *holos* – весь, полный и *grapho* – пишу, рисую. В итоге получается: *оптический эквивалент предмета*, когда исследователь реально видит объект, который на самом деле является объемной картинкой. Эта та технология, которой не может достичь никакая другая технология 3D-изображения. Если пластину с голографическим изображением разбить на маленькие кусочки, то каждый кусочек будет выдавать такое же изображение, только меньших размеров и меньшей четкости изображения. Идеи голографии сформулировал венгерский Нобелевский лауреат по физике (1971) (Денеш) Габор (1900–1979) в 1948 г., работая над усовершенствованием электронного микроскопа. А. Пуанкаре осознавал, что за многочисленными периодическими процессами, которые он описывал и анализировал с помощью системы дифференциальных уравнений, стоят глобальные закономерности. Однако он не мог еще знать о существовании *принципов цикличности* и *принципа голографии*. Так же, как не знали об этом Р. Вирхов и Л.А. Орбели, которые могли лишь констатировать, что мы мало считаемся с периодическими и циклическими процессами. Не знал еще и не писал о принципах цикличности и голографии А. Пуанкаре. Поэтому, поставив вопрос и сформулировав проблему, А. Пуанкаре оставил ее решение будущим поколениям исследователей. *Принцип цикличности* в совокупности с *голографическим принципом* означают, что *циклические свойства* (или *свойства спирали в пространстве, и периодичности во времени*) должны повторяться на всех структурно-функциональных уровнях. Точно так же, как и *атомарный принцип строения вещества*, тоже должен проявляться на всех структурно-функциональных уровнях, потому что эти принципы всеобщие или глобальные. Таким образом, указанные выше три принципа: атомарный принцип строения вещества, принцип цикличности и голографический принцип, структурируют и объединяют между собой явления живой и неживой природы. Именно эти три принципа, с нашей точки зрения, делают природу единой, включая неорганические соединения и органические вещества в единую систему. Циклическая организация газотрансмиттеров в организме млекопитающих является одним из проявлений такого единства, которое обнаруживается в бесконечных вариациях одного и того же принципа [56–69] или одних и тех же принципов, если иметь в виду атомарный принцип строения вещества и голографи-

ческий принцип. Говорить о том, что это философия, а не биохимия, биофизика или физиология, с нашей точки зрения, неправомерно. Потому что хорошая, глубокая конкретная наука всегда имеет непосредственную связь с философией естествознания. Точно так же, как и философия естествознания, находит свое воплощение и проявление в конкретных науках. Именно к достижению единства философии естествознания и конкретных наук ученые разных стран стремились всегда. Именно поэтому, такие разные ученые как Р. Вирхов, А. Пуанкаре и Л.А. Орбели, каждый по-своему, обращали внимание всех ученых на существование некоторой всеобщности, которая делает мир с его неорганическими и органическими веществами единым.

Циклы оксида азота (NO), супероксидного анион-радикала (O_2^-) и сероводорода/диоксида серы (H_2S/SO_2). Концепция цикла оксида азота (рис.1) была обоснована более 25 лет тому назад [57, 58, 60]. Ее обоснование стало возможным благодаря обнаружению нитритредуктазной активности гемсодержащих белков в организме млекопитающих [70]. Через 20 лет нитритредуктазная активность гемоглобина в дезокси-форме была подтверждена в работах исследователей из США [71]. В дальнейшем эта концепция неоднократно находила свое развитие и применение для различных нормальных и патологических процессов [29, 50–52, 72]. Суть этой концепции сводится к тому, что ионы NO_2^- , образующиеся из L-аргинина могут вновь при участии нитритредуктазных систем, включающих в себя *Hb*, *Mb*, *cyt a+a₃* и *cyt P-450*, замыкать цепочку L-аргинин \rightarrow NO \rightarrow NO_2^-/NO_3^- в цикл. Кислород, связываясь с гемом, ингибирует нитритредуктазную активность этих белков [70]. Таким образом, при различных функциональных состояниях, связанных с недостаточным обеспечением организма кислородом, будет активироваться нитритредуктазная компонента цикла оксида азота (рис. 1а) [56–61]. Однако такая активация может наблюдаться до тех пор, пока не происходит истощение содержания L-аргинина [66], который включается в цикл Кребса на уровне α -кетоглутаратного комплекса и служит одним из источников образования сукцината (или янтарной кислоты). При относительно длительной гипоксии/ишемии, как известно, сукцинат активно используется в качестве субстрата окисления для образования АТФ и мембранного потенциала в митохондриях. Поэтому исследователи при длительной экспериментальной гипоксии/ишемии могут наблюдать снижение образования NO. Однако это не означает, что такие данные противоречат циклу оксида азота.

Цикл супероксидного анион-радикала. Анализ данных литературы и результатов собственных исследований позволил выдвинуть гипотезу о том, что кроме цикла оксида азота должен существовать и цикл супероксидного анион-радикала (рис. 1 б) [59]. В пользу того, что такой цикл должен существовать свидетельствовали осцилляции в концентрациях активных форм кислорода в биологических системах, получаемые рядом авторов. Поскольку за всеми циклическими процессами всегда стоят периодические колебания, можно было ожидать, что ранее рассматривавшиеся продукты реакций, связанные с нейтральной молекулой O_2 и ее активными формами – супероксидом, пероксидом, а также ферментами активации молекулярного кислорода (Fe^{2+} и Cu^{2+} -содержащими белками), супероксиддисмутазой и каталазой могут быть замкнуты в цикл. Проведенный анализ многочисленных данных литературы позволил нам предложить схему циклической организации активных форм кислорода, которую мы назвали циклом супероксидного анион-радикала (рис. 1б). [59].

Цикл сероводорода/диоксида серы (H_2S/SO_2). Исходным субстратом для синтеза всех трех медиаторов являются серосодержащие аминокислоты, прежде всего L-цистеин. Полисульфиды образуются из сероводорода (H_2S), а диоксид серы (SO_2) является ангидридом сульфита (сернистой кислоты), который образуется при окислении H_2S . Конечным продуктом окисления (деградации) H_2S , как и окисления диоксида серы является сульфат, который выделяется вместе с мочой. Известно, что кишечная микрофлора синтезирует сероводород из сульфата, восстанавливая его. Характерно, что фермент, окисляющий H_2S в митохондриях у животных, сульфидхиноноксидоредуктаза – SQR, обнаружен также у растений и бактерий [73]. Восстановление сульфата (SO_4) до H_2S возможно в организме млекопитающих при уча-

стии микрофлоры кишечника. Таким образом, цикл сероводорода в целом организме млекопитающих существует (рис. 2). Гипотетическим является наше предположение о восстановлении SO_4 до H_2S в клетках млекопитающих. Если такая реакция происходит, тогда можно говорить о том, что цикл сероводорода существует не только в целом организме млекопитающих, но и в их клетках. Представленные выше циклы являются, с нашей точки зрения, проявлением глобального принципа цикличности. Вместе с тем, геохимические циклы азота, углерода, серы и воды, известны как круговорот веществ в природе. В совокупности с анализируемыми нами циклами они являются проявлением принципа голографии, когда циклические свойства общего проявляются в циклических свойствах и закономерностях частного на других структурно-функциональных уровнях живой и неживой природы. Таким образом, через эти три принципа философия естествознания проявляется в конкретных науках, а конкретные науки находят свое воплощение в философии естествознания.

Существует ли цикл оксида углерода (CO)? Этот вопрос остается открытым. Однако, исходя из того, что наряду с другими циклами в природе – азота, серы и т.д. (круговорот веществ в природе), и наличия кроме принципа цикличности также принципа голографии [56, 60], можно ожидать, что в дальнейшем цикл оксида углерода (CO) займет свое достойное место в ряду других основополагающих принципов.

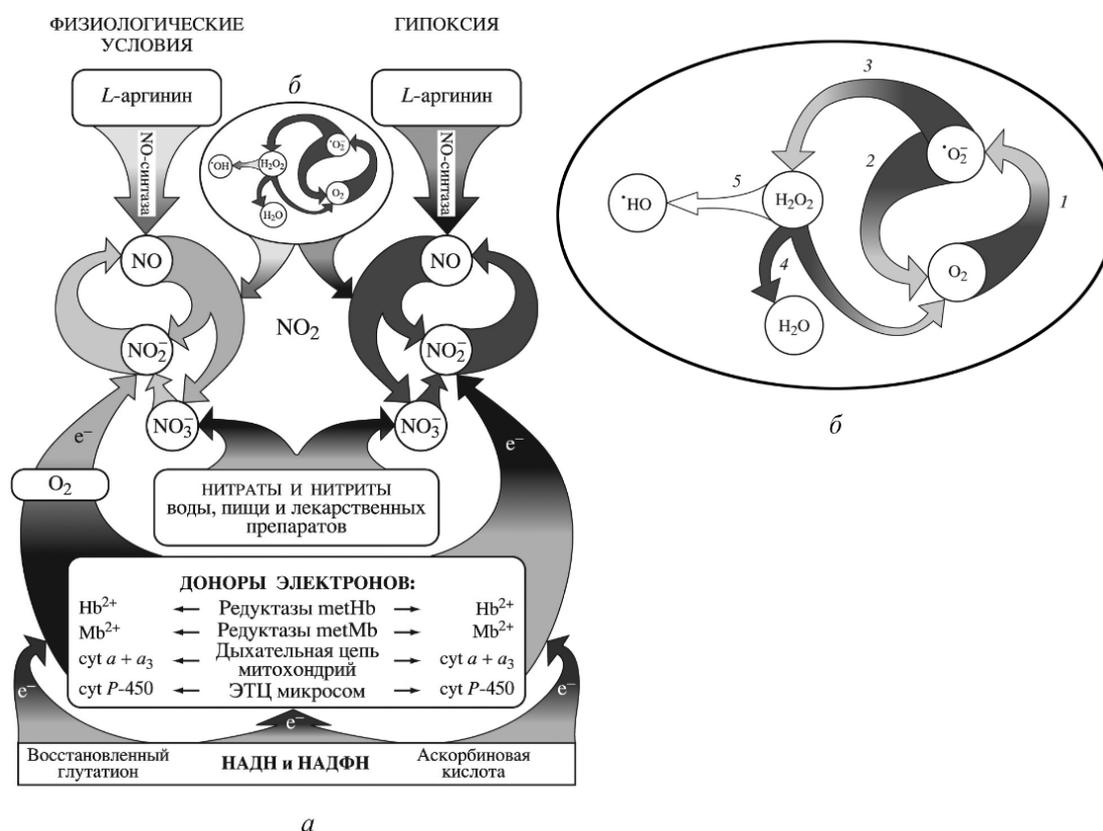


Рис. 1. Цикл оксида азота (а) и супероксидного анион-радикала (б).

В цикле оксида азота можно выделить NO-синтазную компоненту («L-аргинин – NO»), осуществляющую синтез NO в присутствии кислорода, и нитритредуктазную компоненту, активность которой резко возрастает в условиях дефицита кислорода (гипоксии/ишемии). Образование NO при участии NO-синтазной компоненты осуществляется в результате окисления гуанидинового азота L-аргинина. Ионы NO_2^- , образующиеся из L-аргинина, могут вновь при участии нитритредуктазных систем, включающих в себя *Hb*, *Mb*, *cyt a+a₃* и *cyt P-450*, замыкать цепочку L-аргинин → NO → NO_2^-/NO_3^- в цикл. 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. Важную роль в восстановлении ионов NO_2^- в NO играют также электронно-донорные системы, восстанавливающие *Hb*, *Mb*, *cyt a+a₃* и *cyt P-450*. Кроме этих электронно-транспортных систем (цепей) важную роль в восстановлении ионов NO_2^- могут играть аскорбиновая кислота и восстановленный глутатион. В цикле супероксидного анион-радикала происходят: 1 – восстановление кислорода (O_2) и образование супероксидного анион-радикала ($\cdot O_2$); 2 и 3 – реакции дисмутации супероксида, катализируемые супероксид-

дисмутазой; 4 – разложение пероксида водорода (H_2O_2) на воду (H_2O) и молекулярный кислород (O_2), осуществляемое ферментом каталазой; 5 – пероксид водорода (H_2O_2) – пероксид водорода – H_2O_2 – так же разлагается с образованием двух молекул $\cdot OH$ -радикала. Циклическая организация 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 OH -радикалы, которые повреждают основные компоненты живых организмов.

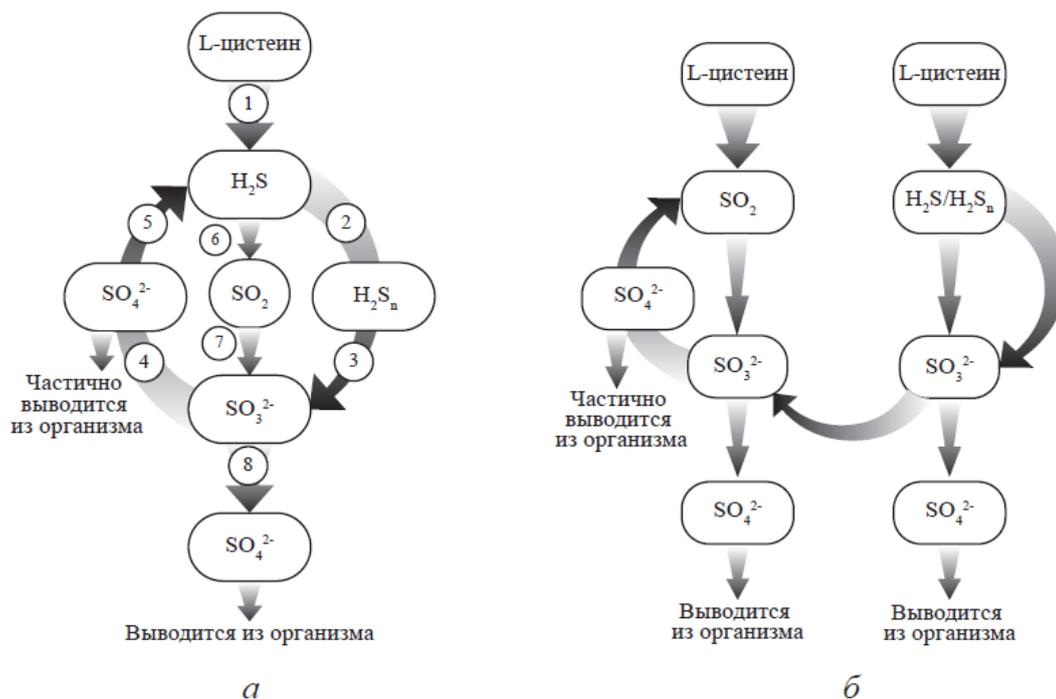


Рис. 2. Цикл сероводорода (а) и его SO_2 – и H_2S/H_2S_n – компоненты (б), которые могут активироваться при различных функциональных состояниях

Исходным субстратом для синтеза всех S-медиаторов являются серосодержащие аминокислоты, прежде всего L-цистеин. Сероводород (H_2S) синтезируется из L-цистеина (стадия 1). В настоящее время известно 3 фермента, которые участвуют на этой стадии в синтезе H_2S : в различных клетках млекопитающих: *цистатионин-β-синтаза* (CBS), *цистатионин-γ-лиаза* (CSE) и *3-меркаптопируватсульфуртрансфераза* (3-MST). CBS осуществляет синтез H_2S преимущественно в нервных клетках. CSE синтезирует H_2S в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов, а 3-MST осуществляет синтез H_2S в эндотелиальных клетках. Полисульфиды (H_2S_n) образуются из сероводорода (H_2S) (стадия 2), а диоксид серы (SO_2) образуется при окислении H_2S или L-цистеина (стадия 6). Синтез SO_2 из L-цистеина происходит под влиянием ферментов *цистеиндиоксигеназы* и *аспаратаминотрансферазы* (стадия 7). Далее, как H_2S , так и SO_2 превращаются в сульфат (SO_4^{2-}). Промежуточным этапом этого превращения и для H_2S , и SO_2 является сульфит (SO_3^{2-}). Однако H_2S вначале под влиянием *сульфидхиноноксидоредуктазы* (SQR) окисляется в персульфид (RSSH) или полисульфид (H_2S_n) (стадия 2), который окисляется *персульфидоксигеназой* (ETEH1) в сульфит (стадия 3). Диоксид серы (SO_2) может прямо гидрироваться в сернистую кислоту (H_2SO_3), образующую ионы сульфита (SO_3^{2-}) (стадия 8). Последний окисляется *сульфитоксидазой* в сульфат (SO_4^{2-}) (стадия 4) который, поступая в кишечник, восстанавливается в H_2S (стадия 5) и выделяется с мочой. Конечным продуктом окисления H_2S , как и окисления диоксида серы (SO_2), является сульфат (SO_4^{2-}), который либо поступает в кишечник и частично выводится из организма, либо выделяется вместе с мочой. Известно, что кишечная микрофлора восстанавливает SO_4^{2-} с образованием H_2S . Характерно, что фермент SQR, окисляющий H_2S в митохондриях животных, обнаружен также в растениях и бактериях [73]. Восстановление сульфата (SO_4) до H_2S возможно в организме млекопитающих при участии микрофлоры кишечника. Таким образом, цикл сероводорода в целом организме млекопитающих существует. Гипотетическим является наше предположение о восстановлении SO_4^{2-} до H_2S в клетках млекопитающих. Если такая реакция происходит, тогда можно говорить о том, что цикл H_2S существует не только в целом организме млекопитающих, но и в их клетках.

Заключение. На протяжении, по крайней мере, полувека практически все ученые, в том числе физики, химики и биологи, работающие в области свободно-радикальных процессов в биологии и медицине, пытаются разгадать загадку: как живые системы обеспечивают регуляцию и стабилизацию активных форм кислорода, азота, а также свободных радикалов.

Предлагаемая нами концепция циклической организации газотрансмиттеров (в том числе и свободно-радикальных соединений) может быть одним из ответов на вопрос, поставленный более полувека тому назад. Кроме того, *принципы цикличности, голографический принцип* вместе с *принципом атомарного строения вещества*, с нашей точки зрения, могут дать ответ на вопрос А. Пуанкаре: «*каким образом природа является единой?*»

Работа выполнена при поддержке РАН

Литература

1. *Ceccarelli C., Favre C., López-Sepulcre A., Fontani F.* Hydrogen molecular ions and the violent birth of the Solar System // *Philos. Trans A Math. Phys. Eng. Sci.* 2019. 377 (2154): 20180403. DOI: 10.1098/rsta.2018.0403. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31378185.
2. *Darnley M.J., Hounsell R., O'Brien T.J., Henze M., Rodriguez-Gil P., Shafter A.W., Shara M.M., Vaytet N.M.H., Bode M.F., Ciardullo R., Davis B.D., Galera-Rosillo R., Harman D.J., Harvey E.J., Healy M.W. Ness J.-U., Ribeiro V.A., Williams S.C.* A Recurrent Nova Super-Remnant in the Andromeda Galaxy // *Nature.* 2019. 565 (7740): 460–463. DOI: 10.1038/s41586-018-0825-4. Epub 2019 Jan 9.
3. *Francl M.* A brief history of water // *Nat. Chem.* 2016. 8 (10): 897-8. DOI: 10.1038/nchem.2620. PMID: 27657859.
4. *Taverne Y.J., Merkus D., Bogers A.J., Halliwell B., Duncker D.J., Lyons T.W.* Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life: A molecular timescale from Earth's earliest history to the rise of complex life // *Bioessays.* 2018. 40 (3). DOI: 10.1002/bies.201700158. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29411901. Review.
5. *Lyons T.W., Reinhard C.T., Planavsky N.J.* The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere // *Nature.* 2014. 506 (7488):307-15. DOI: 10.1038/nature13068. PMID: 24553238. Review.
6. *Stanley S.M.* Estimates of the magnitudes of major marine mass extinctions in earth history // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016. 113 (42): E6325-E6334. DOI: 10.1073/pnas.1613094113. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27698119.
7. *Реутов В.П.* Биохимическое предопределение NO-синтазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота // *Биохимия.* 1999. Т. 64. № 5. С. 634–651.
8. *Реутов В.П., Шехтер А.Н.* Как в XX в. физики, химики и биологи отвечали на вопрос: что есть жизнь? // *Успехи физических наук.* 2010. Т. 180. № 4. С. 393–414.
9. *Брода Э.* Эволюция биоэнергетических процессов. –М.:Мир, 303 с.
10. *Маргелис Л.* Роль симбиоза в эволюции клеток. –М.: Мир, 1983. 351 с.
11. *Фокс Р.* Энергия и эволюция жизни на Земле. М.: Мир, 1992. 216 с.
12. *Thomazo C., Couradeau E., Garcia-Pichel F.* Possible nitrogen fertilization of the early Earth Ocean by microbial continental ecosystems // *Nat. Commun.* 2018. 9 (1): 2530. DOI: 10.1038/s41467-018-04995-y. PMID: 29955055.
13. *Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Пинелис В.Г. и др.* Участвуют ли нитритные ионы в регуляции систем внутри- и межклеточной сигнализации? // *Вопр. мед. химии.* 1994. Т.40. № 6. С. 27–30.
14. *Lundberg J.O., Gladwin M.T., Ahluwalia A. et al.* Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics // *Nat Chem Biol.* 2009. V. 5. № 12. P. 865–869.
15. *Verma A., Hirsch D.J., Glatt C.E. et al.* Carbon monoxide: a putative neural messenger // *Science.* 1993. V. 259. No. 5093. P. 381–384.
16. *Kimura H.* Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators // *Molecules.* 2014. V. 19. N. 10. P. 16146–16157.
17. *Kimura H.* Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2015. V. 91. No. 4. P. 131–159.
18. *Kimura Y., Mikami Y., Osumi K. et al.* Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain // *FASEB J.* 2013. V. 27. No. 6. P. 2451–2457.

19. Струтинская Н.А., Дорофеева Н.О., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф. Сероводород угнетает кальцийиндуцированное открывание митохондриальной поры в сердце крыс со спонтанной гипертензией // Физиол. журн. – Киев:, 2013. Т. 59. № 1. С. 3–10.
20. Сукманский О.И., Сукманский И.О. Газотрансмиттеры – новый вид биорегуляторов // Журн. НАМН Украины. 2014. Т. 20. № 2. С. 153–159.
21. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // J. Neurosci. 1996. V. 16. No. 3. P. 1066–1071.
22. Azhipa Ya.I., Reutov V.P., Kayushin L.P. Ecological and medico-biological aspects of environmental pollution by nitrates and nitrites // Human Fiziology. 1993. V. 16. No.3. P. 220.
23. Deng J., Lei C., Chen Y. et al. Neuroprotective gases--fantasy or reality for clinical use? // Prog. Neurobiol. 2014. V. 115. P. 210–245.
24. Du S.X., Jin H.F., Bu D.F. et al. Endogenously generated sulfur dioxide and its vasorelaxant effect in rats // Acta Pharmacol.Sin. 2008. V. 29. No. 8. P. 923–930.
25. Гайнуллина Д.К., Кирюхина О.О., Тарасова О.С. Оксид азота в эндотелии сосудов: регуляция продукции и механизмы действия // Успехи физиологических наук. 2013. Т. 44. № 4. С. 88–102.
26. Герасимова Е.В., Ситдикова Г.Ф., Зефиоров А.Л. Сероводород как эндогенный модулятор высвобождения медиатора в нервно-мышечном синапсе лягушки // Нейрохимия. 2008. Т. 25. № 1. С. 138–145.
27. Гурин А.В. Функциональная роль оксида азота в центральной нервной системе // Успехи физиологических наук. 1997. Т. 28. № 1. С. 53–60.
28. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Смаглий Л.В. и др. Газовая сигнализация в клетках млекопитающих // Успехи физиологических наук. 2015. Т. 46. № 4. С. 53–73.
29. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Реутов В.П. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза // Вестник РАМН. 2000. № 4. С. 30–34.
30. Зинчук В.В., Глуткина Н.В. Кислородсвязывающие свойства гемоглобина и оксида азота // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2013. Т. 99. № 5. С. 537–554.
31. Колесников С.И., Власов Б.Я., Колесникова Л.И. Сероводород как третья эссенциальная газовая молекула живых тканей // Вестн. РАМН. 2015. № 2. С. 237–241.
32. Кондакова И.В., Загребельная Г.В., Реутов В.П. Влияние пероксидных радикалов и оксида азота на пролиферирующую активность опухолевых клеток // Известия национальной академии наук Беларуси. Серия медико-биологических наук. 2003. № 1. С. 78–82.
33. Косицын Н.С., Реутов В.П., Свинов М.М. и др. Механизм морфо-функциональных изменений клеток тканей млекопитающих при гипоксии // Мол. биол. 1998. Т. 32. № 2. С. 369–370.
34. Кошелев В.Б., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Реутов В.П. Снижение под влиянием ингибитора NO-синтазы защитного эффекта от барокамерной адаптации к гипоксии у крыс линии К–М // Новости медико-биол. наук. 2004. № 1. С. 41–43.
35. Ситдикова Г.Ф., Зефиоров А.Л. Сероводород: от канализаций Парижа к сигнальной молекуле // Природа. 2010. № 9. С. 29–37.
36. Сукманский О.И., Реутов В.П. Газотрансмиттеры: физиологическая роль и участие в патогенезе заболеваний // Успехи физиологических наук. 2016. Т. 47. № 3. С. 30–58.
37. Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г. и др. Молекулярные механизмы действия газотрансмиттеров NO, CO и H₂S в гладкомышечных клетках и влияние NO-генерирующих соединений (нитратов и нитритов) на среднюю продолжительность жизни // Успехи физиологических наук. 2017. Т. 48. № 1. С. 24 – 52.
38. Фадюкова О.Е., Кузенков В.С., Реутов В.П. и др. Антистрессорное и ангиопротекторное влияние оксида азота на крыс линии Крушинского-Молодкиной, генетически предрасположенных к аудиогенной эпилепсии // Российский Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2005. Т. 90. № 1. С. 89–96.
39. D'yakonova T., Reutov V. Sodium nitrite causes hyperactivation of identified snail neurons // Nitric Oxide. 2009. V. 20. Supplement. P. S32–S33.
40. D'yakonova T.L., Reutov V.P. Effect of nitrite on the excitability of brain neurons in helix // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 1998. Т. 84. № 11. С. 1264–1272.

41. Дьяконова Т.Л., Реутов В.П. Нитриты блокируют Ca^{2+} -зависимое привыкание нейронов на уровне электровозбудимой мембраны: возможная роль окиси азота // Вопросы медицинской химии. 1994. Т. 40. № 6. С. 20–25.
42. D'yakonova T., Reutov V. The effects of nitrite on the excitability of brain neurons in the common snail // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2000. V. 30. N. 2. С. 179–186.
43. Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.В., Чайлахян Л.М. Сравнительный анализ пластичности нейро-нейронных и нейро-глиальных инкапсулирующих взаимодействий молекулярного слоя изолированного мозжечка лягушки в условиях избытка L-глутамата и NO-генерирующего соединения // Доклады Академии наук. 2003. Т. 393. № 5. С. 698–702.
44. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Роль гликогена отростков глиальных клеток мозжечка в условиях его повреждения нитритом натрия // Бюлл. эсперим. биол. и медицины. 2010. Т. 150. № 8. С. 212–215.
45. Ларионова Н.П., Реутов В.П., Самосудова Н.В., Чайлахян Л.М. Нейроглиальный химический синапс в мозжечке взрослой лягушки // Доклады Академии наук. 2010. Т. 432. № 2. С. 276–280.
46. Larionova N.P., Reutov V.P., Samosudova N.V., Chailakhyan L.M. Comparative analysis of plasticity of neuron-neuronal and neuron-glia encapsulating interactions of molecular layer of isolated frog cerebellum exposed to excess L-glutamate and NO-generating compound // Doklady Biological Sciences. 2003. V. 393. N. 1–6. P. 515–519.
47. Larionova N.P., Reutov V.P., Samosudova N.V., Chailakhyan L.M. Neuroglial chemical synapses in the cerebellum of adult frog // Doklady Biological Sciences. 2010. V. 432. N. 1. P. 171–175.
48. Зефирова А.Л., Петров А.М. Синаптическая везикула и механизм освобождения медиатора. – Казань: Арт-кафе, 2010. 323 с.
49. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Изменение ультраструктуры синаптических пузырьков глутаматергических синапсов под воздействием NO-генерирующего соединения NaNO_2 // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2008. Т. 146. № 7. С. 13–17.
50. Samosudova N.V., Reutov V.P. Plastic Rearrangements of Synapse Ultrastructure in the Cerebellum in Toxicity due to glutamate and NO-Generating Compounds // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2016. V. 46. N. 7. P. 843–848.
51. Самосудова Н.В., Реутов В.П. Ультраструктурные изменения мозга лягушки в присутствии высоких концентраций глутамата и NO-генерирующего соединения // Биофизика. 2018. Т. 63. № 3. С. 528–543.
52. Streeter E., Ng H.H., Hart J.L. Hydrogen sulfide as a vasculoprotective factor // Med. Gas Res. 2013. V. 3. N. 1. P. 9.
53. Охотин В.Е., Калиниченко С.Г., Дудина Ю.В. NO-ергическая трансмиссия и NO как объемный нейротрансмиттер. Влияние NO на механизмы синаптической пластичности и эпиплептогенез // Успехи физиологических наук. 2002. Т. 33. № 2. С. 41–55.
54. Пинелис В.Г., Сорокина Е.Г., Реутов В.П. и др. Влияние токсического воздействия глутамата и нитрита на содержание циклического ГМФ в нейронах и их выживаемость // Докл. РАН. 1997. Т. 352. № 2. С. 259–261.
55. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. 2000. Т. 65. № 4. С. 485–503.
56. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С., Охотин В.Е. Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности. – М.: УРСС, 2003. 94 с.
57. Реутов В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих // Успехи биол. химии. 1995. Т. 35. С. 189–228.
58. Реутов В.П. Биохимическое предопределение NO-синтазной и нитритредуктазной компонент цикла оксида азота // Биохимия. 1999. Т. 64. № 5. С. 634–651.
59. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала // Вестн. РАМН. 2000. № 4. С. 35–41.
60. Реутов В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности // Биохимия. 2002. Т. 67. № 3. С. 353–376.

61. Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г. Физиологическая роль цикла окиси азота в организме человека и животных // Физиология человека. 1994. Т. 20. № 3. С. 165–174.
62. Реутов В.П., Каюшин Л.П., Сорокина Е.Г. Цикл окиси азота как адаптационный механизм при гипоксии организма // Успехи физиологических наук. 1994. Т. 25. № 4. С. 36.
63. Реутов В.П., Косицын Н.С., Свинов М.М. и др. Активация цикла окиси азота при гипоксии индуцирует перераспределение белков в клетках тканей млекопитающих из растворимого в мембранносвязанное состояние // Мол. биол. 1998. Т. 32. № 2. С. 378–379.
64. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия. 1998. Т. 63. № 7. С. 1029–1040.
65. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. Цикл окиси азота – новый метаболический цикл, участвующий в регуляции внутриклеточной сигнализации // Мол. биол. 1998. Т. 32. № 2. С. 377–378.
66. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1978. 156 с.
67. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Гоженко А.И. и др. Цикл оксида азота как механизм стабилизации содержания NO и продуктов его превращения в организме млекопитающих // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2008. Т. 11. № 1. С. 22–28.
68. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Каюшин Л.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и нитритредуктазная активность гемсодержащих белков // Вопр. мед. химии. 1994. Т. 40. № 6. С. 31–35.
69. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С. Проблемы оксида азота и цикличности в биологии и медицине // Успехи соврем. биол. 2005. Т. 125. № 1. С. 41–65.
70. Реутов В.П., Ажипа Я.И., Каюшин Л.П. Кислород как ингибитор нитритредуктазной активности гемоглобина // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1983. № 3. С. 408–418.
71. Cosby K., Partovi K.S., Crawford J.H. et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation // Nat. Med. 2003. V. 9. N. 12. P. 1498–1505.
72. Реутов В.П., Самосудова Н.В., Сорокина Е.Г. Модель глутаматной нейротоксичности и механизмы развития типового патологического процесса // Биофизика. 2019. Т. 64. № 2. С. 316–336.
73. Kabil O., Banerjee R. Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling // Antioxid. Redox Signal. 2014. V. 20. N. 5. P. 770–782.

Сведения об авторах

Валентин Палладиевич Реутов

д-р биол. наук, вед. науч. сотр.
Эл. почта: valentinreutov@mail.ru
ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии РАН
Москва, РФ

Елена Геннадьевна Сорокина

канд. биол. наук, вед. науч. сотр.
Эл. почта: sorokelena@mail.ru
ФГАУ Национальный научно-практический центр
здоровья детей Министерства здравоохранения РФ
Москва, РФ

Олег Иванович Сукманский

д-р мед. наук, главн. науч. сотр.
Эл. почта: sukm007@gmail.com
Одесский государственный аграрный университет,
Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирур-
гии Национальной АМН Украины
Одесса, Украина

Information about authors

Valentin Palladievich Reutov

PhD, Doct. Biol Sci., Leading Researcher
E-mail: valentinreutov@mail.ru
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology
RAS;
Moscow, Russia

Elena Gennad'evna Sorokina

PhD, Leading Researcher
E-mail: sorokelena@mail.ru
National scientific-practical center of children's health of
the Ministry of health of the RF
Moscow, Russia

Oleg Ivanovich Sukmanskyy

MD, professor
E-mail: sukm007@gmail.com
Odessa State Agrarian University
Institute of Stomatology and Maxillo-Facial Surgery of the
National Academy of Medical Sciences of Ukraine;
Odessa, Ukraine

УДК 616.062
ГРНТИ 34.19.19
DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.23

Сорокина Е.Г.¹, Семенова Ж.Б.², Глоба О.В.¹, Карасева О.В.²,
Реутов В.П.³, Игнатьева Г.А.⁴, Афанасьева С.А.¹, Овчаренко Д. С.⁵,
Хунтеев Г.А.⁵, Рошаль Л.М.², Пинелис В.Г.¹

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр
здоровья детей» Минздрава России

²НИИ неотложной детской хирургии и травматологии
Департамента здравоохранения города Москвы

³ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

⁴ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ;

⁵ООО ДРД, ИЦ Сколково, Российская Федерация

АУТОИММУННЫЙ ОТВЕТ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ОКСИД АЗОТА ПРИ ЭПИЛЕПСИИ И ЧЕРЕПНОМОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

У детей с эпилепсиями и черепно-мозговой травмой (ЧМТ) исследовали содержание аутоантител (аАТ) к рецепторам глутамата (NMDA- и AMPA- подтипов) и уровень продуктов оксида азота – нитротирозина (NT) и нитратов/нитритов (NOx) в крови. Полученные данные позволяют в аутоиммунном ответе организма выявить специфику повреждения AMPA- и NMDA-подтипов глутаматных рецепторов при судорожных и посттравматических повреждениях мозга. Выявлено участие NO и его продуктов в развитии аутоиммунного ответа.

Ключевые слова: эпилепсия, черепно-мозговая травма, аутоантитела к рецепторам глутамата, оксид азота, нитротирозин

Sorokina E.G.¹, Semenova Zh.B.², Globa O.V.¹, Karaseva O.V.², Reutov V.P.³,
Ignatieva G.A.⁴, Afanasieva S.A.¹, Ovcharenko D.S.⁵,
Hunteev G.A.⁵, Roshal L.M.², Pinelis V.G.¹

¹Scientific Medical Research Center for Children's Health" Ministry of Health of Russia

²Research Institute of emergency pediatric surgery and trauma

³Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology Russian Academy of Science

⁴Pirogov Medical University of Russian Ministry of Health of the Russian Federation

⁵IC Skolkovo

AUTOIMMUNE RESPONSE OF GLUTAMATE RECEPTORS AND NITRIC OXIDE IN EPILEPSY AND TRAUMATIC BRAIN INJURY

In children with epilepsy and traumatic brain injury (TBI), the content of autoantibodies (aAb) to glutamate receptors (NMDA and AMPA subtypes) and the level of nitric oxide products - nitrotyrosine (NT) and nitrates/nitrites (NOx) in the blood were studied. The obtained data make it possible to reveal the specificity of damage to AMPA and NMDA subtypes of glutamate receptors in convulsive states and posttraumatic brain injuries. The participation of NO and its products in the development of autoimmune response was revealed.

Keywords: epilepsy, traumatic brain injury, autoantibodies to glutamate receptors, nitric oxide, nitrotyrosine

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) и эпилепсия относятся к гетерогенным повреждениям головного мозга, в патогенезе которых центральную роль играют глутаматные рецепторы. Известно, что эпилепсия у детей сопровождается значительным падением напряжения кислорода в нервной ткани и гиперстимуляцией глутаматных рецепторов [1, с. 16]. ЧМТ, как и эпилепсия, является гетерогенным заболеванием, включающим различные комбинации контузии и сотрясения мозга, гематом, повреждения аксонов, гипоксии и ишемии [2, с. 571]. Полагают, что именно церебральная ишемия и кислородная недостаточность являются наиболее важными факторами, сопровождающими неблагоприятные исходы травматического повреждения мозга [3, с. 309]. На экспериментальных моделях эпилепсии и ЧМТ, а также в клинических исследованиях показано, что эти заболевания запускают «каскад» биохимических изменений. Эти изменения включают: накопление в синапсах возбуждающих аминокислот и нейротрансмиттеров, нарушение ионного гомеостаза, генерацию свободных радикалов, повышение концентрации оксида азота (NO) и его токсических продуктов, падение содержания АТФ в нейронах и запуск воспаления [4, с. 707].

Воспалительная реакция и гипоксия мозга способствуют образованию NO, диоксида азота (NO₂) и пероксинитрита. Именно эти соединения вызывают локальные повреждения мембран клеток и субклеточных структур, способствуя выходу фосфолипаз, расщепляющих фосфолипиды мембран, и протеаз, повреждающих пептиды и белки. Это, в свою очередь, приводит к повреждению клеток различных тканей и способствуют появлению молекулярных маркеров по-

вреждения («сигналов опасности»), которые могут инициировать развитие аутоиммунных процессов.

Аутоиммунные реакции трудны для изучения и, как правило, остаются вне «поля зрения» врачей и исследователей, работающих с пациентами или моделями эпилепсии и травматического повреждения мозга. Однако еще в 70-х годах прошлого века И.В. Ганнушкина писала, что поиски путей, снижающих патологические процессы при травме мозга, должны быть направлены на изучение иммунного ответа организма [5, с. 145]. В наших предыдущих работах [6, с. 44; 7, с. 6; 8, с. 389] и работах Дамбиновой С.А. и соавторов [9, с. 349; 10, с. 1752] показано, что при судорожных синдромах в крови больных повышается уровень преимущественно аАТ к АМРА рецепторам, а при травмах мозга – аАТ к NMDA рецепторам глутамата. Так как даже легкая ЧМТ может спровоцировать судорожный синдром, а эпилептический приступ сопровождается гипоксией/ишемией головного мозга, нам представлялось интересным оценить соотношение этих 2х типов аАТ в динамике различной тяжести ЧМТ и при различных заболеваниях мозга, сопровождающихся эпилептической активностью. Поскольку NO играет существенную роль при гипоксии, цель работы состояла в сравнении уровня 2х типов аАТ к GluRc с содержанием продуктов NO в крови детей с различными типами эпилепсии и ЧМТ.

Материал и методы. У 24 детей с нейродегенеративными повреждениями мозга (НД, 9), туберозным склерозом (ТС, 3) и энцефалопатической эпилепсией (ЭЭ, 12) в сыворотке/плазме крови определены: аАТ к NR2 субъединице NMDA и к GluR1 субъединице АМРА рецепторов глутамата (GluRc), нейронспецифическая энолаза (NSE), глиальный белок S100b и продукт нитрозативного стресса 3-нитротирозин (NT). У детей, перенесших легкую ЧМТ (ЛЧМТ, 62) и среднетяжелую ЧМТ (СТЧМТ, 40) в динамике после ЧМТ определены 2 вида аАТ, NT и NO (нитраты+нитриты). Все показатели определялись иммуноферментными и колориметрическими методами соответствующих тест-систем: аАТ - ООО ДРД (Сколково, Россия) и CIS Biotech (USA), NSE и S100b – CanAg (Швеция), NT - Hycult biotech (USA) и NO (NOx = нитраты+нитриты) - Calbiochem (USA). Нормальными значениями в сыворотке принято считать: 0,7 – 1,2 нг/мл для NMDA аАТ и 1,0 – 1,5 нг/мл – для АМРА аАТ. Тяжесть ЧМТ определялась по шкале комы Глазго (ШКГ) при этом в группу с ЛЧМТ вошли дети с сотрясениями мозга и ШКГ 15, а в группу детей с более тяжелой ЧМТ - с ШКГ = 9 - 13 баллов. Исход ЧМТ оценивался по шкале исходов Глазго (ШИГ): полное восстановление – ШИГ 5, инвалидизация легкой и тяжелой степени – ШИГ 4 и ШИГ 3 соответственно. Для изучения роли NO в инициации аутоиммунного процесса крысам Вистар интраперитонеально вводили NO-генерирующее соединение NaNO₂ в разных дозах. Данные обработаны методом групповой статистики с пакетом программ Prizm и представлены в M±m. Статистически достоверными различиями величин считали результаты при p<0,05.

Результаты. Мы полагали, что соотношение в уровне аАТ NMDA/АМРА поможет косвенно соотнести вклад гипоксии (по увеличению содержания NMDA аАТ) и судорожной активности, связанной с повреждением АМРА GluRc. В таблице 1 представлены данные определения 2х типов аАТ и нейромаркеров повреждения у детей с нейродистрофическими заболеваниями без эпилептической активности, у детей с эпилептической энцефалопатией и туберозным склерозом (группа наследственных заболеваний, относящихся к эктодермомезодермальным дисплазиям и проявляющихся поражением кожи, нервной системы, глаз и внутренних органов).

Таблица 1
Уровень аутоантител к глутаматным рецепторам и нейромаркеров в крови детей с заболеваниями мозга

Группы	NMDA аАВ Норма нг/мл <1,5	АМРА аАВ Норма нг/мл <1,4	К NMDA/АМРА	S100b норма <90 нг/мл	NSE норма <9,0 мкг/мл	3-NT норма нМ 0
НД	(9/19) 4,85±1,06*	1,79±0,46	4,21±0,76#	101±14	9,6±1,44	1 – 205 80±19*
ЭЭ	(12/22) 3,47±0,44*	4,05±0,81*#	1,22±0,18	138±20*	7,95±0,23	35 – 1225* 299±189*#
ТС	(3/8) 2,97±1,11	1,17±0,30	2,30±0,26	175±36*	12,00±2,13	0 – 26 16±5

НД- нейродистрофические заболевания без эпилепсии, ЭЭ- эпилептическая энцефалопатия, ТС- туберозный склероз, * $p < 0,05$ с верхней границей контрольных величин, # $p < 0,05$ с группами ЭЭ и ТС, НД и ТС; жирным цветом отмечено максимальное значение показателей среди 3х групп.

Наиболее высокий уровень аАТ к NMDA GluRc выявили у детей с нейродегенерацией, в то время как у детей с эпилептической энцефалопатией наблюдался наиболее высокий уровень аАТ к AMPA GluRc. В группе детей с ЭЭ определялся наиболее высокий уровень нитротирозина и повышенный уровень S100b. Для детей с туберозным склерозом при небольшом увеличении содержания аАТ к NMDA GluRc найдено увеличение маркеров повреждения глии (S100b) и в небольшой степени нейронов (NSE). Во всех группах содержание аАТ к NMDA GluRc было выше нормальных величин. Поскольку показано, что экспрессия NMDA GluRc отмечается после ишемии в переднем мозге и мозжечке [9, с. 349], можно предположить, что повышение содержания аАТ к этим рецепторам характеризуют ишемические/гипоксические процессы в этих структурах. Увеличение аАТ к AMPA характерно для группы детей с эпилептической энцефалопатией, и именно в этой группе наблюдалось существенное повышение нитротирозина - продукта окисления тирозина NO. Увеличение концентрации NO у детей с ЭЭ подтверждалось также повышенным содержанием циклического ГМФ [8, с. 400], на что прямое влияние оказывает NO. Участие NO в повышении концентрации аАТ к GluR1 AMPA рецепторам было показано нами в экспериментах на крысах (рис. 1 А, Б). При интраперитонеальном введении NaNO_2 , превращающегося в организме в NO, наблюдался дозозависимый и временной эффект повышения концентрации аАТ к AMPA GluRc (рис. 1).

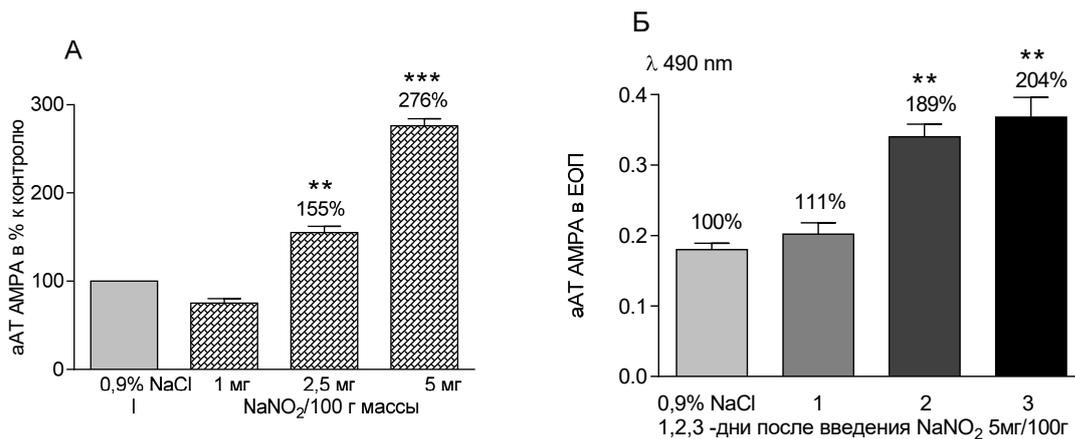


Рис. 1. Содержание аАТ к AMPA(GluR1) рецепторам глутамата в сыворотке крови крыс после введения NO-генерирующего соединения NaNO_2 : А – в зависимости от дозы NaNO_2 на 3й день, Б – по дням при введении NaNO_2 в дозе 5 мг/100г веса, ЕОП – единицы оптической плотности, **, *** - $p < 0,01$, $p < 0,001$ с 0,9% NaCl (контроль), $n = 6$ для каждого столбца; ЕОП – единицы оптической плотности.

На рис. 2 (А, Б, В, Г). показано, что посттравматическая динамика содержания NMDA и AMPA аАТ в крови детей с наиболее легкой ЧМТ (сотрясение мозга, ЛЧМТ с ШКГ 15) и среднетяжелой ЧМТ (СТЧМТ с ШКГ 9-13) имеет существенные отличия. В 1й день после травмы наиболее высокий уровень NMDA аАТ обнаружен у детей с ЛЧМТ (в 5 раз – превышает верхнюю границу контрольных величин и в 2,5 раза - их содержание у детей с СТЧМТ). Содержание AMPA аАТ при ЛЧМТ не превышало верхней границы контрольных величин в течение всего периода определения. Наибольший первоначальный уровень AMPA АТ отмечен у детей с ТЧМТ. Отмечено, что посттравматические изменения уровня аАТ имеют 2 периода: 1 – подъем содержания в 1й день и снижение к 3му дню; 2 - постепенное увеличение содержания к 7му дню.

В связи с тем, что дети с легкой и тяжелой ЧМТ имеют разную длительность пребывания в стационаре, исследования детей с ЛЧМТ ограничиваются 5м днем, в то время как в группе с ТЧМТ прослеживание динамики достигало 13-20 дней. На примере пациентов с ТЧМТ видно, что начальное снижение уровня аАТ к обоим типам GluRc к 3му дню сменяется подъемом к 7му дню, в то время как у детей с ЛЧМТ мы могли наблюдать только снижение

NMDA aAT к 5му дню. Ранее для детей группы ЛЧМТ, имеющих более низкий ШКГ (13-14) нами был выявлен подъем 2х типов aAT к 7- 14 дню [7, с. 67]. Подъем aAT к NMDA GluRc может означать прогрессивное развитие аутоиммунного антительного ответа во времени, что может быть связано с продолжающейся гипоксией мозга и гиперстимуляцией NMDA GluRc.

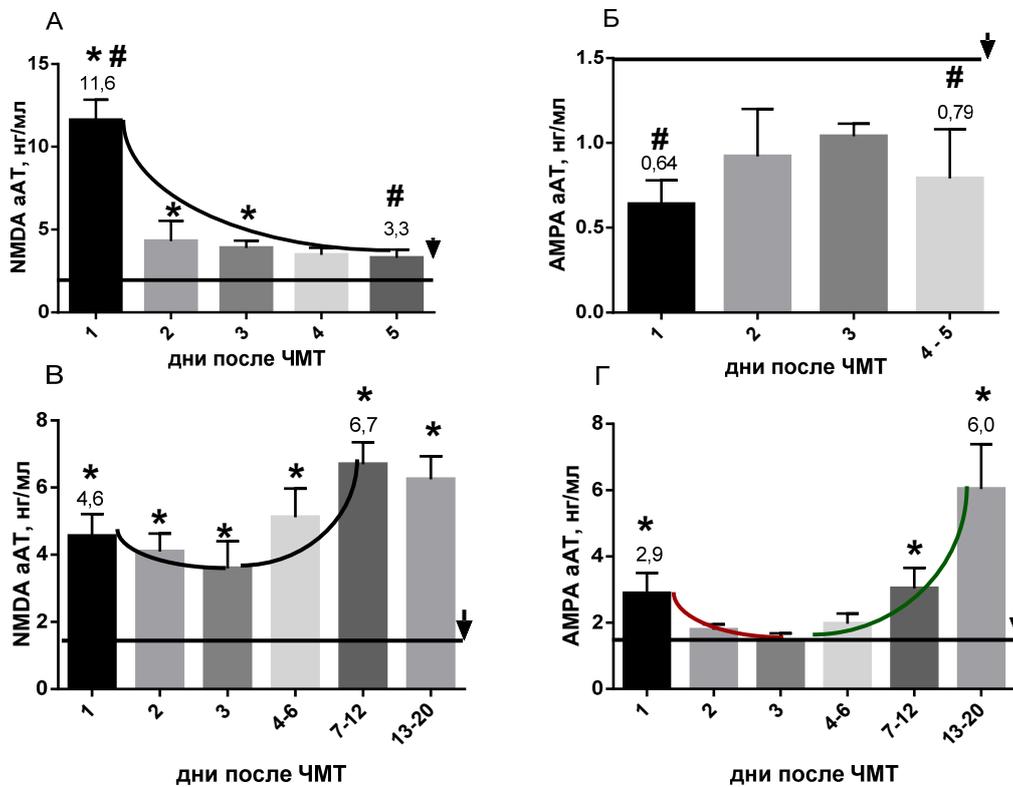


Рис. 2. Динамика содержания aAT к NMDA и AMPA GluRc при легкой (А, Б) и среднетяжелой (В, Г) ЧМТ у детей: стрелка на прямой линии на графиках означает верхнюю границу нормальных величин, * - $p < 0,05$ с контролем, # - $p < 0,05$ между ЛЧМТ и СТЧМТ.

Данные, представленные в таблице 2, показывают что, чем тяжелее исход травмы мозга, тем выше уровень NOx и NT в крови.

Таблица 2. Продукты NO в крови детей с легкой и среднетяжелой ЧМТ в 1й день после травмы (ШИГ – шкала исходов Глазго: ШИГ 5 – благоприятный исход, ШИГ 3,4 – инвалидность различной степени), * - $p < 0,05$ с контролем, # - $p < 0,05$ с ШИГ 5

Продукты NO в плазме крови	ЛЧМТ (сотрясение мозга), ШКГ 15	СТЧМТ ШКГ 9 - 13
NOx (nitrates+nitrates), (контроль 10±5 мкмоль/л)	19 ± 2 (ШИГ 5)	23 ± 6* (ШИГ 5) 40 ± 7*# (ШИГ 3,4)
3-Nitrotyrosine, (контроль – 0 нмоль/л)	0 – 70 (ШИГ 5)	0 - 27 (ШИГ 5) 23 – 759*# (ШИГ 3,4)

Анализ результатов исследований заставляет задуматься над тем, почему происходит столь раннее увеличение содержания aAT к NMDA рецепторам глутамата сразу после ЧМТ у детей с наиболее легкими повреждениями мозга и, каково значение этого факта.

Основываясь на нашем опыте и данных литературы о двойственной роли NO при гипоксии мозга [12, с. 311; 13, с. 65], мы полагаем, что сразу после травмы мозга умеренное повышение содержания NO в очаге повреждения способствует активации «innate-like» существующих аутоантител к NMDA GluRc, тем самым блокируя эти рецепторы и снижая

их гиперстимуляцию. Это может быть неким защитным компенсаторным механизмом при травме мозга, в котором NO играет важную роль.

Авторы считают, что в данной работе получены новые данные, позволяющие в аутоиммунном ответе глутаматных рецепторов выявить специфику повреждения AMPA- и NMDA- подтипов GluRc при судорожных и посттравматических повреждениях мозга. Показано участие NO в аутоиммунном ответе глутаматных рецепторов.

Работа поддержана Министерством Здравоохранения России ААА-А19-119012590190-6 травма и АААА-А19-1190125901191-3 эпилепсия

Литература

1. Barker-Haliski M., White H.S. Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015. V. 5 № 8. a022863. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022863>.
2. Pearn M.L., Niesman I.R., Egawa J., Sawada A., Almenar A., Shah S.B., Duckworth J., Head B.P. Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics // Cell Mol Neurobiol 37. 571–585.
3. Algattas H, Jason H. Traumatic Brain Injury Pathophysiology and Treatments: early, intermediate, and late phases post-injury // Int J Mol Sci. 2014. 15. 309–341.
4. Faden A.I. Neuroprotection and traumatic brain injury: theoretical option or realistic proposition // Current option in Neurology. 2002. V. 15. P. 707–712.
5. Ганнушкина И.В. Иммунологические аспекты травмы и сосудистых поражений головного мозга. – М.: Медицина, 1974. 200 с.
6. Пинелис В.Г., Сорокина Е.Г. Аутоиммунные механизмы модуляции активности глутаматных рецепторов при эпилепсии и черепно-мозговой травме у детей // Вестник Российской АМН. 2008. № 12. 44–51.
7. Сорокина Е.Г., Семенова Ж.Б., Базарная Н.В., Мещеряков С.В., Реутов В.П., Горюнова А.В., Пинелис В.Г., Рошаль Л.М. Аутоантитела к рецепторам глутамата и продукты метаболизма оксида азота в сыворотке крови детей в остром периоде черепно-мозговой травмы // Журнал неврологии и психиатрии. 2008. Т. 208. № 3. 67–72.
8. Глоба О.В., Сорокина Е.Г., Семенова Н.Ю., Маслова О.И., Пинелис В.Г. Тест ароксизмальной активности в детской неврологии // в кн. Успехи функциональной нейробиологии, ред. Дамбинова С.А., Арутюнян А.В. – СПб: С-Петербургский Университет, 2003. С. 389–404.
9. Дамбинова С.А., Гаппоева М.У. Экспрессия генов AMPA- и NMDA-рецепторов в условиях нейротоксичности // Успехи функциональной нейробиологии / Дамбинова С.А., Арутюнян А.В. – СПб: С-Петербургский Университет, 2003. С. 349–363.
10. Dambinova S.A., Khounteev G.A., Izykenova G.A., Zavolokov I.G., Ilyukhina A.Y., Skoromets A.A. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke // Clin Chem. 2003. 49: 1752–1762.
11. Reutov V. P., Samosudova N.V., Sorokina E.G. A model of glutamate neurotoxicity and mechanisms of the development of the typical pathological process // Biophysics. 2019. V. 64. No. 2. P. 316–336. DOI: 10.1134/S0006350919020143/
12. Terpolilli N.A., Kim S-W., Thal S.C., Kuebler W.M., Plesnila N. Inhaled nitric oxide reduces secondary brain damage after traumatic brain injury in mice // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2013. V. 33. P. 311–318.
13. Tisdall M.M., Konrad R., Kitchen N.D., Smith M., Petzold A. The prognostic value of brain extracellular fluid nitric oxide. Metabolites after traumatic brain injury // Neurocrit Care. 2013. V. 19. P. 65–68.

Сведения об авторах

Елена Геннадьевна Сорокина

канд. биол. наук, вед. науч. сотр.
Эл. почта: sorokelena@mail.ru
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России
Москва, Россия

Жанна Борисовна Семенова

д-р мед.наук, профессор, рук. отд. Нейротравмы
Эл. почта: j.seman@mail.ru
НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения города Москвы
Москва, Россия

Оксана Валерьевна Глоба

канд. мед.наук, старший научный сотр.
Эл. почта: globa@nczd.ru
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России
Москва, Россия

Ольга Витальевна Карасева

д-р мед. наук, руководитель отдела сочетанной травмы, анестезиологии-реанимации
Эл. почта: karaseva.o@list.ru
НИИ неотложной детской хирургии и травматологии
Москва, Россия

Валентин Палладиевич Реутов

д-р. биол. наук, вед. науч. сотр.
Эл. почта: valentinreutov@mail.ru
ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия

Галина Алексеевна Игнатьева

д-р мед. наук, профессор кафедры иммунологии
Эл. почта: gaiti2007@mail.ru
ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Москва, Россия

Софья Анатольевна Афанасьева

лаборант-исследователь
Эл. почта: afsonia11@yandex.ru
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России

Дмитрий Сергеевич Овчаренко

биотехнолог
Эл. почта: dovcharenko@drdbiotech.ru
ОАО ДРД, ИЦ Сколково
Москва, Россия

Герман Анатольевич Хунтеев

канд. мед. наук, директор лаборатории ООО ДРД
Эл. почта: gk@drdbiotech.ru
ИЦ Сколково
Москва, Россия

Леонид Михайлович Рошаль

д-р мед. наук, профессор, президент института
Эл. почта: lmroshal@mail.ru
НИИ неотложной детской хирургии и травмы
Москва, Россия

Всеволод Григорьевич Пинелис

д-р биол.наук, профессор, главн. науч. сотр.
Эл. почта: pinelis@mail.ru
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России
Москва, Россия

Information about authors

Elena G. Sorokina

Ph.D., leading researcher
E -mail: sorokelena@mail.ru
Scientific Medical Research Center for Children's Health"
Ministry of Health of Russia
Moscow, Russia

Zhanna B. Semenova

MD., professor, head of neurotrauma unit
E -mail: j.seman@mail.ru
Research Institute of emergency pediatric surgery and trauma
Moscow, Russia

Oksana V. Globa

Ph.D., senior researcher
E -mail: globa@nczd.ru
Scientific Medical Research Center for Children's Health"
Ministry of Health of Russia
Moscow, Russia

Olga V. Karaseva

MD., head of the intensive care department
E-mail: karaseva.o@list.ru
Research Institute of emergency pediatric surgery and trauma
Moscow, Russia

Valentin P. Reutov

Dr. biol. sciences, leading researcher
E -mail: valentinreutov@mail.ru
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology
Russian Academy of Science
Moscow, Russia

Galina A. Ignatieva

MD., professor of the Department of immunology
e-mail: gaiti2007@mail.ru
Pirogov Medical University of Russian Ministry
Moscow, Russia

Sofya A. Afanasieva

research assistant
E -mail: afsonia11@yandex.ru
Scientific Medical Research Center for Children's Health
Moscow, Russia

Dmitry S. Ovcharenko

MS, DRD Ltd., Biotechnologist,
E -mail: dovcharenko@drdbiotech.ru
IC Skolkovo
Moscow, Russia

German A. Khunteev

MD, Ph.D., DRD Ltd., Lab Director
E -mail: gk@drdbiotech.ru
IC Skolkovo
Moscow, Russia

Leonid M. Roshal

MD., professor, President
E -mail: lmroshal@mail.ru
Research Institute of emergency pediatric surgery and trauma
Moscow, Russia

Vsevolod G. Pinelis

MD, Ph.D, professor, Chief Researcher
E -mail: pinelis@mail.ru
Scientific Medical Research Center of Children's Health"
Ministry of Health of Russia
Moscow, Russia

ДЕЙСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ТРЁХМЕРНОСТЬ СТРУКТУР КАРДИОМИОЦИТОВ

При экспериментальном инфаркте миокарда происходит возникновение контрактур саркомеров, с одновременной гипердилатацией соседних участков клетки и перемещением митохондрий. Лекарственные препараты (коргликон, прокаинамид, калия оротат) по-разному влияют на эти процессы.

Ключевые слова: кардиомиоцит, инфаркт миокарда, коргликон, прокаин амид, калия оротат.

Reznikov K.M.¹, Kolesnichenko P.D.²

¹Voronezh state medical University

²Belgorod state Federal University

THE EFFECT OF DRUGS ON THE THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF CARDIOMYOCYTES

In experimental myocardial infarction the occurrence of contracture of the sarcomeres, while giperkeratoza adjacent sections of the cell and movement of mitochondria. Drugs (korglikon, procainamide, potassium orotate) have different impacts on these processes.

Keywords: cardiomyocyt, infarct miocardes, korglikon, procain, kalia opotatum

Цель исследования

Изучить трёхмерность структур кардиомиоцитов, и их изменения при моделировании инфаркта миокарда и действия кардиотропных средств

Результаты и обсуждение

Аксперименты проведены на 40 кроликах в соответствии с принятыми правилами [1]. Общепринятый алгоритм ишемических повреждений сердца включает в качестве главного компонента патологического повреждения миокарда нарушения энергетического обмена. Из этого следует, что гипоксия уменьшает образование АТФ в митохондриях, тем самым, в свою очередь, снижает сократительные свойства левого желудочка и одновременно ограничивает биосинтетические процессы, т.е. самообновление тканей.

Вместе с тем известно, что к каждому кардиомиоциту не подходит капилляр и нервное окончание, что мы также констатировали при ультраструктурном исследовании стенок сердца. Изучение тканей здорового сократительного миокарда на светооптическом уровне выявляет поперечную исчерченность, а в поляризованном свете иногда небольшие участки анизотропии А-дисков. При анализе (более 100) поперечных ультратонких срезов стенки левого желудочка кролика можно констатировать (увеличение 5000-30000), что кардиомиоцит имеет 6 сторон и, таким образом, каждый из них по длине контактирует с шестью соседними кардиомиоцитами, с которыми они синхронно сокращаются и расслабляются. На поперечном срезе хорошо видны актиновые и миозиновые нити, которые образуют также 6-ти сторонние геометрические образования. Такое расположение актиновых и миозиновых компонентов создаёт сетку из треугольников (самая устойчивая конструкция), которые расположены по кругу, а 6 треугольников составляют шестиугольник (самая подвижная фигура). Следовательно, сократительный аппарат кардиомиоцита является одновременно и очень устойчивой и достаточно прочной и подвижной структурой, что обеспечивает приспособительные реакции сократительного акта.

Отдельно анализировались продольные срезы, где хорошо выявлялось состояние саркомеров. У интактных животных (без воспроизведения патологии) между Z-дисками были параллельно расположенные миозиновые (толстые) и активные (тонкие) нити, причём актиновые в центре саркомера не соприкасались друг с другом. В саркомерах выявлялись митохондрии – одна на 1 саркомер. Продолговатые митохондрии были неодинаковы по длине. Срез проходил линейно, а разрезанные митохондрии постепенно от крупных переходили во всё более мелкие фрагменты, создавая впечатление, что они находятся не на одной линии, а уходят в толщу клетки. Анализ многочисленных срезов показал, что эти органеллы контак-

тируя друг с другом образуют винтообразную ленту, которая идёт от сарколеммы к зоне полюса ядра. В этом месте образуется околядерное скопление митохондрий. Такое явление наблюдается и у другого полюса ядра. Под сарколеммой также расположен ряд митохондрий, с которыми контактируют межфибрилярные митохондрии. Таким образом, в каждом кардиомиоците можно отметить наличие строго организованной сети митохондрий, где чётко выделить 3 группы: подсарколеммальные, межфибрилярные и околядерные. Они обеспечивают энергией различные структуры: сарколемма (перенос ионов), сократительные белки (сокращение) и ядро (пластическое обеспечение). Тесная связь локализации митохондрий с определёнными компонентами клетки свидетельствует о тесной взаимосвязи зоны выработки энергии с участками, где эта энергия используется, что чрезвычайно важно для непрерывно сокращающегося органа. Капилляры на срезах встречаются редко, они расположены в межклеточных пространствах, их просвет сужен, ядерный аппарат не нарушен, редко выявляются явления микроэкзоцитоза.

Сократительные клетки сердца шестигранные, продолговатые и контактируют с соседними кардиомиоцитами, а в торцевых контактах хорошо видны нексусы, т.е. слияние оболочек 2-х клеток.

При большом увеличении (30000 раз) хорошо выявляется двухконтурная мембрана ядер, которая имеет поры, а в местах, где к ней подходят Z – диски, являющиеся границами саркомеров, обнаруживаются впячивания.

Как изменяется пространственное расположение компонентов внутри клетки мы установили при моделировании мелкоочагового инфаркта у кроликов.

При моделировании мелкоочагового инфаркта миокарда [2] внутривенно вводимым питуитрином, вызывающим уменьшение притока крови в миокарде, за счёт повышения тонуса коронарных артерий, и последующим внутримышечным введением изопротеренола, что приводит к увеличению потребления кислорода в результате резкого усиления сокращений сердца. На светооптическом уровне на 3-и сутки в стенке левого желудочка отмечаются участки инфильтрации - более крупные в субэндокардиальной зоне, более мелкие в средней части. Эти участки мы относим к зонам некроза. В основном такие изменения характерны для левого желудочка и перегородки и в меньшей степени в области верхушки сердца. В поляризованном свете выявляются значительные участки сплошной анизотропии А-дисков, расположенные вблизи с участками инфильтрации. Размеры и количество описанных изменений контрактильного аппарата стенок желудочков сердца на 7-сутки наблюдения увеличиваются, а на 14-е уже выявляются признаки фиброзирования участков некроза.

Исходя из представленных данных можно предположить, что гипоксические явления вызывают изменения в клетках сердца тесно связанные с трёхмерными сдвигами прежде всего в сократительном аппарате кардиомиоцитов, что приводит к возникновению некротических очагов, причиной которых являются изменения саркомеров и уменьшение притока энергии. Наиболее важными изменениями, приводящими к началу некротизации сердечной мышцы являются контрактуры саркомеров, т.е. тесное сближение Z-дисков большого количества саркомеров. В этом случае актомиозиновые нити с противоположных сторон саркомеров контактируют друг с другом, между ними образуются связи, которые при расслаблении мышцы сердца не могут разойтись, т.е. выпадают из сократительного акта. Эти участки контрактур и являются участками некроза. Если наблюдаются только 2-3 контрактуры, что можно видеть и в контрольной группе здоровых животных, то это не приводит к серьёзным повреждениям кардиомиоцитов. Мы считаем, что такие небольшие изменения в сократительных элементах являются основой физиологической внутриклеточной регенерации, тем более, что перемещений неповреждённых митохондрий в данном случае не происходит. Мощная перестройка сократительного аппарата с включением в процесс образования контрактур 8-12 и более саркомеров приводит к перемещению большого количества митохондрий, в основном, в подсарколеммальные участки. Такие большие зоны контрактур уже являются зонами некроза и, лишённые митохондрий, они не обеспечиваются сократительными миофиламентами и энергией не только для сокращений, но для процессов регенерации. Ли-

шены миофиламентов и митохондрий и участки, где саркомеры наоборот перерастянуты (гипердилатация). Они всегда обнаруживаются в сопредельных участках кардиомиоцитов. Выявляется также разобщение клеток сердца в концевых контактах, включая нексусы, вызванное синхронным образованием контрактур соседних кардиомиоцитов. Как известно, нексусы являются компонентами передачи импульсов между клетками сердца. Не исключено, что такие изменения могут быть основой возникновения аритмий. Описанные ультраструктурные нарушения остаются и на 7-е сутки инфаркта миокарда хотя становятся более локальными, особенно к 14 суткам.

Введение коргликона на 3-и сутки эксперимента морфологически подтверждают описанную выше локализацию и форму некротических очагов. Очаги некроза типичной локализации с чётко очерченными краями - происходит заполнение их соединительнотканными клетками. На 7-е и особенно на 14-е сутки наблюдения субэндо- и субэпикардальные некрозы полностью заполнены фибробластами и гистиоцитами, т.е. проявляется ускорение фиброобразования некрозов. В поляризованном свете можно видеть в среднем слое всех отделов сердца зоны сплошной анизотропии, чаще всего вблизи некротических зон. Кроме того, во всех слоях и отделах выявляются участки волокон со сниженным свечением анизотропных дисков. К 14-м суткам эксперимента отмечается лишь более диффузное расположение гистиоцитарных инфильтратов. При электронномикроскопическом изучении ультратонких срезов миокарда кроликов, леченых коргликоном, отмечается более одинаковое расстояние между Z-дисками, чем у нелеченых животных. Митохондрии в цитоплазме располагаются неравномерно, чаще образуют скопления в межфибриллярных пространствах. При равномерном повышении контрактильности саркомеров не обнаруживаются выпячивания сарколеммы в межклеточные пространства. На 7-е сутки введения сердечного гликозида также отмечается более равномерное укорочение саркомеров, но оно сопровождается уже более выраженными выпячиваниями сарколеммы, заполненной гранулами гликогена и мелкими митохондриями с редуцированными кристами. Обращает на себя внимание большое количество равномерно расположенных в цитоплазме гранул гликогена. На 14-е сутки в клетках миокарда саркомеры укорочены равномерно, а митохондрии расположены между миофиламентами рядами, иногда в 2 слоя, их скопления можно обнаружить лишь в околядерных и подсарколеммальных зонах. В участках некроза появляются признаки фиброобразования.

Для установления эффективности противоаритмического препарата прокаинамида у экспериментальных животных после воспроизведения инфаркта им вводили внутривенно аконитин в дозе 25мкг/кг. В 100% случаев развивались аритмии в основном в виде предсердно-желудочковых экстрасистол продолжавшиеся более 1,5 часов. Гибель животных достигла 50% уже в первые 30 мин после введения аконитина. Прокаинамид выжившим кроликам вводили внутривенно в дозе 20мг/кг на 3-и сутки эксперимента. При введении препарата электрокардиографические характеристики нарушений ритма исчезали к концу 3-их суток эксперимента, а морфологические изменения на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях существенно не отличались от изменений у животных, которым препарат не вводился. Обращает на себя внимание уменьшение выраженности пространств во вставочных дисках смежных кардиомиоцитов. Эти позитивные изменения проявляются и на 7-е и на 14-е сутки наблюдения.

Стимулятор регенерации калия оротат вводился внутрь по 200мг/кг с 3-их суток эксперимента в течение 10 суток. В этой группе экспериментов показатели электрокардиограммы были более близки к исходной норме, чем в группе нелеченых кроликов. Уже на 7-е сутки введения калия оротата очаги некроза расположенные в типичных местах были выполнены гистиоцитами и фибробластами. В субэндокардиальных участках наблюдаются участки фиброобразования в виде нежной сети коллагеновых волокон. В крупных очагах некроза выявлялись отдельные сохранившиеся клетки. По краям некротических очагов можно обнаружить участки с усилением или ослаблением анизотропии А-дисков. На 14-е сутки процессы фиброобразования были выражены больше чем у животных остальных групп.

При ультраструктурном исследовании выявляется увеличение количества мелких митохондрий и митохондрий без диссоциации крист, размеры саркомеров более однотипные, митохондрии практически без повреждений и расположены они равномерно вдоль сократительных волокон, хотя в подсарколеммальных и околяядерных участках они выявляются в виде скоплений. В некоторых кардиомиоцитах обнаруживаются выпячивания сарколеммы, заполненные митохондриями. В ядерных мембранах обнаруживаются расширенные поры и выход ядерного материала. На 15-сутки процессы регенерации выражены сильнее.

Таким образом, в экспериментах на кроликах показано, что при формировании мелкоочагового инфаркта миокарда происходит существенная перестройка трёхмерности кардиомиоцитов. Если у здоровых животных в клетках сердца образуются одновременно 2-3 контрактуры саркомеров, что, по нашему мнению, является одним из механизмов внутриклеточного самовоспроизведения сократительных клеток сердца (физиологическая регенерация), то при внешних нежелательных воздействиях, например, питуитрина суживающего сосуда сердца, и изопротеренола усиливающего потребление кислорода, количество контрактур увеличивается до 9 и более. Такие контрактуры необратимы и актомиозиновые комплексы резорбируются. В рядом расположенных саркомерах, наоборот, происходит гипердilatация вплоть до полного расхождения противоположно расположенных актиновых нитей, поэтому эти саркомеры тоже нежизнеспособны. Эти данные в определённой степени объясняют хорошо описанные сокращения миокарда в рамках трёхмерных движений [3]. Возникновение значительных участков контрактур приводит к перемещению митохондрий в свободные пространства, т.е. происходит разобщение процессов образования и утилизации энергии, что вносит существенный вклад в развитие некрозов. Введение животным с мелкоочаговым инфарктом миокарда кардиотоника, противоаритмического средства или стимулятора регенерации смягчает трёхмерные нарушения кардиомиоцитов в различной степени, но существенных позитивных процессов в восстановлении саркомеров выявить не удалось. Есть предположение, что уменьшение количества и выраженности контрактур может вызвать введение ивабрадина. Наши ранние исследования показали, что процессы окислительного фосфорилирования при моделировании мелкоочагового инфаркта миокарда нарушаются не более чем на 60%, т.е. ещё сохраняется определённый уровень энергетического потенциала клетки. Следовательно, недостаточное образование энергии при инфаркте лишь частично объясняет причину некротизации. Большое значение для процесса некротизации сердечной мышцы имеют структурные нарушения сократительного аппарата клетки, сопровождающиеся разобщением между локализацией митохондрий и местом использования их мембранного потенциала.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: 1. У здоровых животных сократительные клетки сердца имеют шестигранную структуру с чёткой локализацией актина, миозина и митохондрий, которая меняется только в определённых пределах, обеспечивая меняющийся режим сокращения. 2. Ведущую роль в некротизации играет состояние контрактильного аппарата клеток миокарда и процесс некроза начинается с выключения из сократительного акта значительных зон саркомеров и перемещением из этих участков митохондрий. 3. Сердечные гликозиды, уменьшая повышенную при моделировании инфаркта миокарда пространственную неодинаковость активности натрий-калиевой АТФ-азы, ограничивают включение в патологических процесс новых саркомеров, одновременно снижают пространственное разобщение митохондрий с сократительными элементами. 4. Противоаритмический препарат приводит к более согласованным сокращениям кардиомиоцитов разных клеток. 5. Стимуляторы регенерации ускоряют начало репаративной регенерации актомиозиновых комплексов и митохондрий.

Указанные препараты не могут комплексно решить все проблемы некротизации при инфаркте миокарда, поэтому необходим поиск средств вызывающих эффекты не на уровне ферментов мембран и переносе ионов, а более тонком уровне субмолекулярных механизмов сокращений кардиомиоцитов.

Выводы

1. Возникновение инфаркта миокарда сопровождается структурными нарушениями в миофиламентах кардиомиоцитов и нарушением чётко организованной сети митохондрий.
2. Кардиотропные средства разных фармакологических групп существенно не влияют на величину саркомеров и пространственные нарушения локализации митохондрий при инфаркте миокарда.
3. При разработке средств для лечения инфаркта миокарда следует учитывать их возможность устранения контрактур и гипердилатации саркомеров.

Литература

1. Белозерова В.И., Драволлина О.А., Тур М.А. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей / под: ред. Э.Э. Звартау. изд.2-е. – СПб., 2014. 80 с.
2. Резников К.М., Китаева Р.И. Способ моделирования мелкоочагового инфаркта миокарда. Авторское свидетельство №940208. РФ, 1983., патентообладатель Воронежский государственный медицинский институт им. Н.Н. Бурденко
3. Обрезан А.Г., Баранов Д.З. Деформация миокарда у больных хронической сердечной недостаточностью / Кардиология. 2019. № 59 (8). 88–96.

Сведения об авторах

Константин Михайлович Резников

*д-р мед. наук
проф. каф. фармакологии
Эл. почта: vrkmf@yandex.ru
Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.Бурденко
Воронеж, Россия*

Павел Дмитриевич Колесниченко

*Доц. каф. Фармакологии
Эл. почта: farpavel@yandex.ru
Белгородский государственный Федеральный университет
Белгород, Россия*

Information about authors

Konstantin M. Reznikov

*Doctor of Medical Sciences
Professor Department of Pharmacology
E-mail: vrkmf@yandex.ru
Voronezh State Medical University named after
N.N. Burdenko
Voronezh, Russia*

Pavel D. Kolesnichenko

*Associate Professor of the Department of Pharmacology
E-mail: farpavel@yandex.ru
Belgorod state Federal University
Belgorod, Russia*

УДК 664.951:658.562.012.7
ГРНТИ 69.51.03
DOI 10.47501/978-5-6044060-0-7.25

Абрамова Л.С., Козин А.В., Сытова М.В.
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии»

ОБЪЕКТИВНАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА РЫБЫ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ МЕТОДОМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

В статье обсуждается проблема объективной оценки качества охлажденной и мороженой рыбы в процессе хранения. Метод ЯМР рекомендуется для комплексного анализа изменения метаболического профиля трески и тихоокеанской кеты в процессе хранения.

Ключевые слова: треска охлажденная, кета тихоокеанская, ЯМР-спектроскопия, метаболический профиль, показатель качества.

Abramova L.S., Kozin A.V., Sytova M.V.
Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography

OBJECTIVE ASSESSMENT OF FISH QUALITY IN THE STORAGE PROCESS USING NMR SPECTROSCOPY

The article discusses the problem of an objective assessment of the quality of chilled and frozen fish during storage. The NMR method is recommended for a comprehensive analysis of changes in the metabolic profile of cod and Pacific chum salmon during refrigerated storage.

Keywords: chilled cod, Pacific chum salmon, NMR spectroscopy, metabolic profile, quality indicator.

Введение

В настоящее время охлажденная рыба и полуфабрикаты, изготовленные из нее, пользуются большим спросом, по сравнению с мороженой продукцией. Однако сроки годности такой продукции обычно определяются температурой и временем хранения и оцениваются органолептическими показателями, такими как запах, цвет, иногда консистенция.

Согласно практике НАССР для некоторых видов рыбного сырья рекомендуется использовать гистамин в качестве индикатора для оценки качества охлажденной рыбы. Однако этот показатель не применим на начальной стадии хранения рыбы.

Для оценки изменений, происходящих в охлажденной рыбе, важно понимать и оценить биохимические и физико-химические процессы, происходящие после вылова в процессе посмертного окоченения, разрешения посмертного окоченения и при последующем хранении. Изменения в мясе рыбы могут быть кратко представлены на примере рисунка, хотя они имеют различное время, обусловленное видовым составом и условиями хранения рыбы от вылова до засыпания [1, с. 109157]. Эти изменения включают биологические изменения, которые приводят к распаду аденозин-5'-трифосфата (АТФ), аденозин-5'-дифосфата (АДФ), аденозин-5'-монофосфата (АМФ) и инозин-5'-монофосфата (ИМФ), которые количественно конвертируются в инозин (Ino) и гипоксантин (Hx). Микробиологическая порча приводит к превращению триметиламинооксида (N-TMAO) в триметиламин (N-TMA) - летучее соединение, придающее специфический неприятный запах рыбному сырью. Однако известно, что N-TMAO может также трансформироваться в диметиламин (N-DMA), а затем под действием фермента триметиламин-N-оксидиметилазы в формальдегид (ФА) [2, с. 6889-6895].

Для контроля соединений, характеризующих биологические, микробиологические и физико-химические процессы, протекающие в рыбном сырье при хранении, и определения индикаторов свежести рыбы, универсальным является метод ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Этот метод позволяет за одно измерение не только качественно, но и количественно определить широкий спектр веществ, установить структуру соединений и одновременно охарактеризовать комплекс происходящих процессов.

Цель работы

Установить показатели качества рыбы в процессе хранения для оценки объективных сроков годности и технологической пригодности методом ЯМР-спектроскопии.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали образцы трески (*Gadus morhua*) и кеты тихоокеанской (*Oncorhynchus keta*) в охлажденном и мороженом виде. Образцы трески были

заготовлены ООО «Вариант» в море, треска разделана на кусок, доставлена для анализов и хранилась в охлажденном виде. Мороженые образцы филе трески были заготовлены ООО «Вариант» в море сразу после вылова сырья. Образцы тихоокеанской кеты охлажденной доставлены из г. Владивосток и хранились в охлажденном виде.



Рисунок. Схема биохимических изменений в рыбе при хранении в охлажденном или мороженом виде

Водорастворимые полярные метаболиты экстрагировали 7,5% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ), как описано в работе [3, с. 542-553]. Для этой цели 25 г гомогенизированной мышечной ткани заливали 50 мл 7,5% раствор ТХУ, перемешивали в гомогенизаторе и фильтровали через бумажный фильтр. Фильтрат нейтрализовали 9 М раствором КОН до значения pH 7,8. Раствор фильтровали через бумажный фильтр (№ 1) и хранили при температуре минус 25°C до проведения измерений.

Для записи ЯМР-спектров образцы размораживали, добавляли D₂O и снимали на приборе Bruker AV-600 (Германия) при 303 К с TSP (3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-*d*₄ acid sodium salt) в качестве внутреннего стандарта. Все отмеченные на спектрах метаболиты были идентифицированы с использованием одномерной ¹H спектроскопии ЯМР, а также литературных данных [3, с. 542-553; 4, с. 12-22]. Обработку спектров проводили с использованием стандартного программного обеспечения фирмы Bruker (TopSpin 3.5 pl7). Исследования выполнены в ФГБУН ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН.

Полученные результаты

Проведен комплексный анализ метаболического профиля ¹H-ЯМР спектров экстрактов мышечной ткани образцов трески и тихоокеанской кеты, которые хранились в охлажденном и мороженом виде. Как видно из данных, представленных в таблице 1, содержание триметиламиноксида в образцах трески значительно выше, чем в кете. Хорошо известно, что N-ТМАО присутствует во многих морских организмах и его физиологическая роль заключается в поддержании азотного баланса, содержание его в рыбном сырье колеблется в широких пределах, наибольшее количество обнаружено в хрящевых рыбах. Среди костистых рыб наибольшее содержание N-ТМАО отмечается у рыб семейства тресковых, а в пресноводных видах присутствует в небольших концентрациях [5, с. 221; 6, с. 207-228].

В процессе хранения в охлажденном виде происходит накопление триметиламина, как в образцах трески, так и тихоокеанской кеты, который образуется, в основном, путем бактериального восстановления N-ТМАО, вызванного бактериальными ферментами. Значительное снижение содержания N-ТМАО в образцах трески при хранении в охлажденном виде в течение 17 суток сопровождалось накоплением большого количества триметиламина и появлением объективных признаков порчи, появлением неприятного запаха. Для тихоокеан-

ской кеты характерно накопление триметиламина при хранении в охлажденном виде с меньшей скоростью. Следует отметить, что особенностью тресковых рыб является накопление диметиламина при хранении, как в охлажденном, так и в мороженом виде, о чем свидетельствуют результаты исследований, приведенные в таблице 1. Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными [7, с. 3881-3890]

На основании данных интегральных интенсивностей инозина, инозин-5'-монофосфата, гипоксантина рассчитаны показатели, характеризующие свежесть рыбного сырья, по следующим формулам [8, с. 1787-1798]:

$$K_1 = \frac{Ino+Hx}{IMP+Ino+Hx} * 100, \% \quad H = \frac{Hx}{IMP+Ino+Hx} * 100, \% \quad G = \frac{Ino+Hx}{AMP+IMP+Ino}$$

где: AMP - аденозин-5'- монофосфат, Ino - инозин, IMP - инозин-5'-монофосфат, Hx – гипоксантин.

В таблице приведены значения индикаторов свежести - коэффициентов качества исследованных видов рыб при хранении в охлажденном или мороженом виде. В соответствии с литературными данными, значение K_1 80 % является предельным порогом качества, при больших значениях рекомендуется отказ от употребления данной продукции для пищевых целей. При значениях величины K_1 до 20 % сырье считается безупречно свежим и может использоваться в сыром виде, без глубокой тепловой обработки.

Из приведенных данных видно, что показатели K_1 не отражают изменения в образцах трески в процессе хранения в охлажденном виде при 5°C. Эти данные хорошо согласуются с литературными данными, согласно которым градация качества для трески определяется показателем G [9, с. 1-39]. Установлено, что треска с показателем G менее 2 классифицируется как высшего качества, от 2 до 5 хорошего качества, а выше 5 не рекомендуется для употребления и переработки. Согласно нашим данным при хранении трески в охлажденном виде до 8 суток сохраняется ее качество, так как показатель G составляет 4,7. Образцы мороженой продукции, которые заморожены сразу после вылова и хранились при температуре минус 18°C, имели низкие значения показателя G и могут классифицироваться как сырье превосходного качества не только через 4 месяца хранения, но и через 15 месяцев. Полученные закономерности свидетельствуют о том, что треска является очень чувствительным рыбным сырьем к условиям хранения в охлажденном виде и для сохранения ее качества при хранении необходимо создавать специальные условия по снижению температуры хранения, применению специальных упаковочных материалов.

Таблица

Содержание идентифицированных метаболитов и значения коэффициентов качества в исследованных видах рыб

№ образца по программному обеспечению	Наименование образца, срок хранения, условия хранения	Значения интегральной интенсивности сигнала соединения, у.е.							K_1 , %	H, %	G
		Триметиламиноксид (N-TMAO) s-3,28 ppm	Триметиламин (N-TMA) s-2,90 ppm	Диметиламин (N-DMA) s-2,73 ppm	Гипоксантин (Hx) * s-8,20 ppm и s-8,22 ppm	Инозин (Ino) s-8,33 ppm	Инозин-5'-монофосфат (IMP) s-8,58 ppm	Аденозин-5'-монофосфат (AMP) s-8,53 ppm			
1г	Треска (кусоч) 6 суток при 5°C	302,472	196,066	11,430	3,012	1,499	0,012	0,456	99,7	66,6	2,2
10г	Треска (кусоч) 8 суток при 5°C	182,197	799,848	27,856	10,268	0,628	0,065	1,096	99,4	93,7	4,7
7г	Треска (кусоч) 17 суток при 5°C	79,493	2326,150	55,092	21,705	0,086	0,270	2,494	98,8	98,4	5,7
2г	Филе трески 4 мес. минус 18°C	780,248	0,473	5,974	0,459	2,674	3,912	0,414	44,5	6,5	0,4
8г	Филе трески 15 мес. минус 18°C	527,548	1,169	13,370	0,361	1,394	3,899	0,492	31,0	6,4	0,3
12г	Кета тихоокеанская 2 суток при 5°C	42,991	0,234	0,028	0,555	1,576	1,715	0,216	55,4	14,4	0,6
11г	Кета тихоокеанская 4 суток при 5°C	45,240	1,082	0,012	0,805	1,730	1,224	0,232	67,4	21,4	0,8
13г	Кета тихоокеанская 8 суток при 5°C	7,988	25,195	0,097	2,158	0,919	0,305	0,245	91,0	63,8	2,0
15г	Кета тихоокеанская 11 суток при 5°C	3,196	70,923	1,012	5,179	0,151	0,013	0,274	99,8	96,9	8,3

Примечание

* - усредненное значение интегральных интенсивностей двух синглетных сигналов при s-8,20 ppm и s-8,22 ppm, где s - синглет

Для характеристики качества тихоокеанской кеты в процессе хранения, как было нами показано [10, с. 4-9], целесообразно использовать показатель Н, который хорошо согласуется с низкими значениям ОАЛО (общий азот летучих оснований) и высокими органолептическими показателями данного вида рыбы. Согласно полученным данным, кета при хранении в охлажденном виде при 5°C до 8 суток сохраняет приемлемые органолептические свойства и может быть рекомендована для пищевых целей.

Заключение

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

- метод ЯМР спектроскопии может быть рекомендован для качественной и количественной оценки метаболического профиля трески и тихоокеанской кеты в процессе хранения в охлажденном и мороженом виде и установлении объективных сроков годности;
- показано, что в треске в процессе хранения как в охлажденном, так и в мороженом виде образуется диметиламин, который приводит к ухудшению консистенции сырья, в то время как в тихоокеанской кете диметиламин в процессе хранения практически не образуется;
- градация качества для трески определяется показателем G, а для тихоокеанской кеты наиболее целесообразно использовать показатель Н.

Литература

1. Pramod K. Prabhakar, Siddhartha Vatsa, Prem P. Srivastav, Sant S. Pathak. A comprehensive review on freshness of fish and assessment: Analytical methods and recent innovations // Food Research International. 2020. 133. P. 109157.
2. Iciar Martinez I., Bathen T., Standal I. B., Halvorsen J., Aursand M., Gribbestad I.S., and Axelson D.E. Bioactive Compounds in Cod (*Gadus morhua*) Products and Suitability of ¹H NMR Metabolite Profiling for Classification of the Products Using Multivariate Data Analyses // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53 (17). P. 6889–6895.
3. Ciampa A., Picone G., Laghi L., Nikzad H., Capozzi F. Changes in the Amino Acid Composition of Bogue (*Boopsboops*) Fish during Storage at different Temperatures by 1H- NMR Spectroscopy // Nutrients. 2012. N. 4 (6). P. 542–553.
4. Shumilina E., Ciampa A., Capozzi F., Rustad T., Dikiy A. NMR approach for monitoring post-mortem changes in Atlantic salmon fillets stored at 0 and 4°C // Food Chemistry. 2015. V. 184. P. 12–22.
5. Быков В.П. Изменения мяса рыбы при холодильной обработке: Автолитические и бактериальные процессы. – М.: Агропромиздат, 1987. 221 с.
6. Van Waarde, A. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 1988. V. 91 (2). P. 207–228.
7. Steinsholm Silje, Oterhals Åge, Underhaug Jarl, Måge Ingrid, Malmendal Anders, Aspevik Tone. Sensory Assessment of Fish and Chicken Protein Hydrolysates. Evaluation of NMR Metabolomics Profiling as a New Prediction Tool // J Agric Food Chem. N. 68 (12). P. 3881–3890.
8. Hong H., Regenstein J.M., Luo Y. The importance of ATP-Related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: A Review // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2017. V. 57 (9). P. 1787–1798.
9. Burns B.G., Ke P.J., Irvine B.B. Objective procedure for fish freshness evaluation based on nucleotide changes using a HPLC system // Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences. 1985. No. 1373. P. 1–39.
10. Abramova L.S., Kozin A.V., Shashkov A.S. NMR - spectroscopy technique for Salmon fish species quality assessment // Food Systems. V. 2. N. 4. 2019. P. 4–9.

Сведения об авторах

Любовь Сергеевна Абрамова

Д-р тех. наук, проф., зам. рук. деп.

Эл. почта: abramova@vniro.ru

ФГБНУ «ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии»

Москва, Россия

Андрей Валерьевич Козин

канд. хим. наук, ст. науч. сотр.

Эл. почта: kozin82a@gmail.com

ФГБНУ «ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии»

Москва, Россия

Марина Владимировна Сытова

канд. тех. наук, уч. секр.

Эл. почта: nauka@vniro.ru

ФГБНУ «ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии»

Москва, Россия

Information about authors

Liubov Sergeevna Abramova

doctor of Technical Science, professor, Deputy Head

E-mail: abramova@vniro.ru

Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography

Moscow, Russia

Andrey Valerievich Kozin

PhD in Chemical sciences, Senior Researcher

E-mail: kozin82a@gmail.com

Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography

Moscow, Russia

Marina Vladimirovna Sytova

PhD in Technical sciences, Scientific Secretary

E-mail: nauka@vniro.ru

Federal Research Institute of Fisheries & Oceanography

Moscow, Russia