



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

материалы Международной конференции

NT+ME `23

Крым, Ялта-Гурзуф, с 28 мая по 7 июня 2023 года

Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`23 (Гурзуф, с 28 мая по 7 июня 2023 г.). 2023. 217 с.

ISBN 978-5-6044060-3-8

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОРГКОМИТЕТ

Председатель – Е.Л. Глориозов

Сопредседатели:

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

Члены Оргкомитета

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

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

Фамилия И.О. Название статьи // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`23 (Гурзуф, с 28 мая по 7 июня 2023г.). 2023. С. XX–XX.– ISBN 978-5-6044060-3-8

СОДЕРЖАНИЕ

Секция 1. ПРОБЛЕМЫ, МЕТОДЫ И ПРОДУКТЫ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

- МЕТОДЫ БИОИНФОРМАТИКИ В ОЦЕНКЕ РИСКОВ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ** 10
О.В. Багрянцева, З.Г. Гурзу
- ИЗУЧЕНИЕ МУТАНТОВ ЦИАНОБАКТЕРИИ TRICHORMUS VARIABILIS ATCC29413, УСТОЙЧИВЫХ К ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ** 15
Е. В. Емец, Л. Е. Михеева
- ИСКУССТВЕННАЯ СИМБИОТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В ОЧИСТКЕ ВОДЫ ОТ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ** 21
Я.В. Саванина

Секция 2. БИОЛОГИЯ СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ

- ИЗМЕНЕНИЯ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ ПРИ ДВУСТОРОННИХ СДВИГАХ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ** 26
С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова
- ВЛИЯНИЕ УМЕНЬШЕНИЯ УРОВНЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ НА СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ** 30
Е.П. Тимохина, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин
- ДЕЙТЕРИЙ: РЕГУЛЯТОР ИЛИ ДИСРАПТОР ТИРЕОИДНОЙ ФУНКЦИИ** 35
Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов

Секция 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

- К ВОПРОСУ О ФОРМИРОВАНИИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ У БОЛЬНЫХ С COVID-19** 40
М. Л. Золотавина, Е.А. Гайдабура
- РАЗВИТИЕ ЛИМФОИДНЫХ ЛИНИЙ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ПРЕНАТАЛЬНОМУ И ПОСТНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ** 44
Б.Б. Гагулаева, Н.В. Яглова
- ОТЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТИМУСА ПОСЛЕ ДОСТИЖЕНИЯ ПОЛОВОЙ ЗРЕЛОСТИ У КРЫС, РАЗВИВАВШИХСЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ** 48
Э.С. Цомартова, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, Д.А. Цомартова, Е.В. Черешнева
- ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ КЛЕТОЧНУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ, В СЕТЧАТОЙ ЗОНЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ В ПУБЕРТАТНОМ ВОЗРАСТЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ** 53
В.В. Яглов, С.В. Назимова, М.Ю. Иванова, Т.А. Ломановская

СОДЕРЖАНИЕ

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАТА ИШЕМИЗИРОВАННОГО КОЖНОГО ДЕФЕКТА НА 23-И СУТКИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И СУРФАКТАНТА Е. Ю. Шаповалова, Л. М. Дышлевая, Т. А. Бойко, Ю. Г. Барановский, С. В. Харченко, И. А. Демьяненко, И. А. Лугин	58
ГЕМОСТАТИЧЕСКИЕ И РЕПАРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПОРОШКОВ ЯБЛОЧНОГО И ЦИТРУСОВОГО ПЕКТИНОВ Павленко С.Г., Евглевский А.А., Бердыш Д.С.	64
СПАСТИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ МЫШЦ ПОЗВОНОЧНИКА. ПРИЧИНЫ И ПРОФИЛАКТИКА А.Д. Черкасов, Е.Н. Петрова	71
<u>Секция 4. ОКСИД АЗОТА И ПРОДУКТЫ ЕГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ</u>	
ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ Е-СЕЛЕКТИНА И NO СИНТАЗ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ВЕНОЗНЫМ ТРОМБОЗОМ Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе	82
ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ NO₂ В ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГАНГЛИЕВ В.П. Реутов, Л.А. Давыдова, Е.Г. Сорокина	86
СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ, МОДИФИЦИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА И 3-НИТРОТИРОЗИНА У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА Е.Г. Сорокина, С.А. Афанасьева, Т.В. Радыгина, С.В. Петричук, А.С. Потапов, Е.Л. Семикина, В.П. Реутов	93
<u>Секция 5. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ</u>	
БЛОКАДА АСЕ2-РЕЦЕПТОРА В КУЛЬТУРЕ ГИППОКАМПА МЫШЕЙ 5XFAD КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ SARS-COV-2 НА МОЗГ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА Н.В. Бобкова, Д.Ю. Жданова, В.И. Ковалев, А.В. Чаплыгина	101
СИНАПТОСОМАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ДОСТАВКИ МИТОХОНДРИЙ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА А.С. Дашкова, В.И. Ковалев, А.В. Чаплыгина, Д.Ю. Жданова, Н.В. Бобкова	105
ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЛИПОФУСЦИНА В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА С ВОЗРАСТОМ Д.Ю. Жданова, В.И. Ковалев, А.В. Чаплыгина	111
<u>Секция 6. ГЕМОГЛОБИНЫ, КРОВЬ, ЖЕЛЕЗО И СТРЕСС</u>	
ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ БИОЛОГИИ И ФИЗИКИ В ИСТОРИИ НАУКИ А.Ф. Топунов, О.В. Космачевская	116
ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА И НИТРОКСИЛА НА РЕАКЦИЮ МЕТИЛГЛИОКСАЛЯ С ЛИЗИНОМ И ЛИЗИН-БОГАТЫМ БЕЛКОМ – ЛЕГОГЛОБИНОМ Э.И. Насыбуллина, О.В. Космачевская, К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов	121

СОДЕРЖАНИЕ

ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛУТАТИОНОВЫХ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В ГЕМОГЛОБИН-СОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМАХ О.В. Космачевская, Э.И. Насыбуллина, И.С. Пугаченко, К.Б. Шумаев, Н.Н. Новикова, А.Ф. Топунов	
ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ ХОНДРОЦИТОВ: СОПРЯЖЕННАЯ С ЦИТОГЛОБИНОМ СИГНАЛЬНАЯ СЕТЬ О.И. Баум, А.К. Дмитриев, О.А. Тифлова	132
ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА РЫБ АНТАРКТИЧЕСКОЙ СЕРЕБРЯНКИ <i>PLEURAGRAMMA ANT-ARCTICUM</i> С.Н. Хуртина, В.П. Воронин, А.М. Орлов, С.А. Мурзина	137
ГЛУБОКОВОДНЫЕ РЫБЫ СЕМЕЙСТВА СТОМИЕВЫЕ (STOMIIDAE) МОРЯ ИРМИНГЕРА: ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ С УЧАСТИЕМ ЛИПИДОВ К ОБИТАНИЮ В ГРАДИЕНТЕ ГЛУБИН В.П. Воронин, Д.В. Артеменков, А.М. Орлов, С.А. Мурзина	142
ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙРОГЛОБИНА И ЦИТОХРОМА С М.А. Семенова, Ж.В. Бочкова, О.М. Смирнова, Е.Ю. Паршина, Э.В. Бочаров, Н.А. Браже, Г.В. Максимов, Д.А. Долгих, Р.В. Черткова	147
<u>Секция 7. МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА</u>	
АДРОННАЯ ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ В НИЦ «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ Г. И. Кленов, В.С. Хорошков, А. Н. Черных	152
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОГРАММНОГО ПАКЕТА МК TOPAS ПРИ ПРОЕКТИРОВАНИИ СИСТЕМ ФОРМИРОВАНИЯ ДОЗОВЫХ РАСПРЕДЕЛЕНИЙ ДЛЯ КОМПЛЕКСОВ ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ Черных А.Н., Костюченко В.И., Жидков Д.А, Красильщиков К.С	155
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ТОМОГРАФИЯ НА ОСНОВЕ АСИМПТОТИЧЕСКОГО ПРИБЛИЖЕНИЯ ФУНКЦИИ ИСТОЧНИКА: ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ А.Б. Коновалов, В.В. Власов, С.И. Самарин, А.С. Углов, И.Д. Соловьев, А.П. Савицкий, В.В. Тучин	161
PROTORPLAN: СИСТЕМА ДОЗИМЕТРИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ Л.Г. Ваганян, В.Н. Вербенко, Н.А. Кузора, В.И. Максимов, Ф.А. Пак, А.И. Халиков	169
ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКОГО СПОСОБА ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Т.И. Мурашкина, В.А. Бадеев	174
ИЗМЕРЕНИЕ ДАВЛЕНИЯ ЯЗЫКА НА НЁБО С ПОМОЩЬЮ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО МИКРОСЕНСОРА Т.И. Мурашкина, Е.А. Бадеева, Ю.А. Васильев, Т.В. Паршикова, Е.Ю. Плотникова, Т.В. Истомина	180
ОСОБЕННОСТИ ТЕПЛОВОЙ ЛАЗЕРОИНДУЦИРОВАННОЙ КОАГУЛЯЦИИ БИОМОДЕЛЕЙ А.К. Дмитриев, А.Н. Коновалов, В.Н. Кортунов, В.А. Ульянов	186
НАКОПЛЕНИЕ ЛИПОФУСЦИНА В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ 5XFAD КАК ПЕРИФЕРИЧЕСКИЙ БИОМАРКЕР БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА А.В. Чаплыгина, В.И. Ковалев, Д.Ю. Жданова	191

СОДЕРЖАНИЕ

ГЕНЕТИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКИЙ ПОДХОД ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СУДЕБНЫХ БАЗ ДАННЫХ ДЛЯ НАСЕЛЕНИЯ МЕГАПОЛИСА Удина И.Г., Грачева А.С., Васильев Ю.А., Гуленко О.В., Курбатова О.Л.	195
РОЖДАЕМОСТЬ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬЮ ПОЛЛИНОЗОМ И ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИЕЙ НОВОРОЖДЕННЫХ В Г. КРАСНОДАРЕ ПО ДАННЫМ ГБУЗ РОДИЛЬНЫЙ ДОМ Г. КРАСНОДАРА МЗ КК В ДИНАМИКЕ 5 ЛЕТ Я.В. Клименко, Е.Ю. Плотникова, И.И. Павлюченко, Ю.А. Васильев, А.П. Столярова, Л.Г.Акобян	201
АСИММЕТРИИ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МЫШЕЧНОГО АППАРАТА ЧЕЛЮСТНО – ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ ПРИ ИНСУЛЬТАХ И.А. Куликова, Т.И. Мурашкина, Е.А. Бадеева, Е.Ю.Плотникова, И.И. Павлюченко, Ю.А. Васильев	206
ФОРМИРОВАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИХ И ПАРАМЕТРИЧЕСКИХ ВЕЛИЧИН ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ Плотникова Е.Ю., Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А., Оленская А.В., Сухинин А.А., Волобуев В.В., Аюпова Ф.С., Арутюнов А.В., Оноприев В.В	213

CONTENT

Section 1. PROBLEMS, METHODS AND PRODUCTS OF MODERN BIOTECHNOLOGY

BIOINFORMATICS METHODS IN RISK ASSESSMENT OF TECHNOLOGICAL MICROORGANISMS <i>Olga V. Bagryantsev., Zinaida G. Gureu</i>	10
---	----

MUTANTS OF CYANOBACTERIA TRICHORMUS VARIABILIS ATCC29413 TOLERANT TO ELEVATED TEMPERATURE OF CULTIVATION E. V. Emets, L. E. Mikheeva	15
--	----

ARTIFICIAL SYMBIOTIC SYSTEM IN WATER PURIFICATION FROM MAN-MADE POLLUTIONS <i>Y. V. Savanina</i>	21
--	----

Section 2. BIOLOGY OF STABLE ISOTOPES

CHANGES IN THERMOREGULATION AFTER BILATERAL SHIFTS IN DEUTERIUM BODY CONTENT S.S. Obernikhin, N.V. Yaglova, S.V. Nazimova	26
---	----

EFFECT OF DEUTERIUM REDUCTION IN BODY CONTENT ON CONCENTRATION OF HEMOGLOBIN IN ERYTHROCYTES E.P. Timokhina, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin	30
--	----

DEUTERIUM: REGULATOR OR DISRUPTOR OF THYROID FUNCTION? N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov	35
---	----

Секция 3. EXPERIMENTAL BIOLOGY AND CLINICAL MEDICINE IN THE THIRD MILLENNIUM

ON THE ISSUE OF THE FORMATION OF IRON DEFICIENCY ANEMIA IN PATIENTS WHO HAVE UNDERGONE COVID-19 M. L. Zolotavina, E.A. Gaidabura	40
--	----

DEVELOPMENT OF SPLENIC LYMPHOID LINEAGES IN RATS PRENATALLY AND POSTNATALLY EXPOSED TO THE ENDOCRINE DISRUPTOR DDT B.B. Gagulaeva, N.V. Yaglova	44
---	----

DIFFERENCES IN THYMUS MORPHOLOGY AND FUNCTION IN POSTPUBERTAL RATS DEVELOPMENTALLY EXPOSED TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT E.S. Tsomartova, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, D.A. Tsomartova, E.V. Cheresheva	48
--	----

ALTERATIONS IN EXPRESSION OF FACTORS REGULATING CELL DIFFERENTIATION, IN ADRENAL ZONA RETICULARIS DURING PUBERTY INDUCED BY POSTNATAL EXPOSURE OF ENDOCRINE DISRUPTOR V.V. Yaglov, S.V. Nazimova, M.Y. Ivanova, T.A. Lomanovskaya	53
---	----

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE REGENERATE OF ISCHEMIC SKIN DEFECT ON DAY 23 AFTER TRANSPLANTATION OF DERMAL FIBROBLASTS AND SURFACTANT E.Y. Shapovalova, L.M. Dyishlevaya, T.A. Boyko, Yu.G. Baranjvskiy, S.V. Harchenko, I.A. Demyanenko, I.A. Lugin	58
--	----

HEMOSTATIC AND REPARATIVE PROPERTIES OF APPLE AND CITRUS PECTIN POWDERS Pavlenko S.G., Evglevsky A.A., Berdysh D.S	64
--	----

SPASTIC CONDITIONS OF THE SPINE MUSCLES. CAUSES AND PREVENTION A.D. Cherkasov, E.N. Petrova	71
---	----

CONTENT

Section 4. NITRIC OXIDE AND ITS METABOLIC PRODUCTS IN BIOLOGICAL SYSTEMS

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE LEVEL OF E-SELECTIN AND NO SYNTHASES IN PATIENTS WITH IN PATIENTS WITH ACUTE VENOUS THROMBOSIS 82

N.V. Korotkova, R.E. Kalinin, I.A. Suchkov, N.D. Mzhavanadze

POSSIBLE ROLE OF NO₂ IN DEATH OF NEURONS DURING GANGLIA TRANSPLANTATION 86

V.P. Reutov, L.A. Davydova, E.G. Sorokina

THE CONTENT OF SERUM PROTEINS, MODIFIED ALBUMIN AND 3-NITROTHYROSINE IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES 93

E.G. Sorokina, S.A. Afanasieva, T.V. Radygina, S.V. Petrichuk, A.S. Potapov, E.L. Semikina, V.P. Reutov

Section 5. CLINICAL NEUROSCIENCES

BLOCKADE OF THE ACE2-RECEPTOR IN THE HIPPOCAMPAL CULTURE OF 5XFAD MICE AS A POTENTIAL MODEL OF THE EFFECTS OF SARS-COV-2 ON THE BRAINS OF ALZHEIMER'S DISEASE PATIENTS 101

N.V. Bobkova, D.Y. Zhdanova, V.I. Kovalev, A.V. Chaplygina

SYNAPTOSOMAL PREPARATION FOR MITOCHONDRIAL DELIVERY AS A POTENTIAL AGENT FOR ALZHEIMER'S DISEASE THERAPY 105

A.S. Dashkova, V.I. Kovalev, A.V. Chaplygina, D.Y. Zhdanova, N.V. Bobkova

CHANGE IN LIPOFUSCIN LEVELS IN AN ALZHEIMER'S DISEASE MODEL WITH AGE 111

D.Yu. Zhdanova, V.I. Kovalev, A.V. Chaplygina

Section 6. HEMOGLOBINS, BLOOD, IRON AND STRESS

PARALLEL DEVELOPMENT OF BIOLOGY AND PHYSICS IN SCIENCE HISTORY 116

A.F. Topunov, O.V. Kosmachevskaya

INFLUENCE OF NITROGEN OXIDE AND NITROXIL DONORS ON THE REACTION OF METHYLGLYOXAL WITH LYSINE AND LYSINE-RICH PROTEIN – LEGHEMOGLOBIN 121

E.I. Nasybullina, O.V. Kosmachevskaya, K.B. Shumaev, A.F. Topunov

PROTECTIVE ACTION OF GLUTATHIONE DINITROSYL IRON COMPLEXES IN HEMOGLOBIN-CONTAINING SYSTEMS 126

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

PHOTOBIMODULATION OF CHONDROCYTES: GLOBINCOUPLED SIGNAL NETWORK 132

O.I. Baum, A.K. Dmitriev, O.A. Tiflova

TISSUE SPECIFICITY OF THE LIPID CONTENT OF THE ENDEMIC FISH SPECIES ANTARCTIC SILVERFISH *PLEURAGRAMMA ANTARCTICUM* 137

S.N. Khurtina, V.P. Voronin, A.M. Orlov, S.A. Murzina

DEEP-SEA FISH OF THE STOMIIDAE FAMILY OF THE IRMINGER SEA: ECOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ADAPTATION WITH THE PARTICIPATION OF LIPID TO DEPTH 142

V.P. Voronin, D.V. Artemenkov, A.M. Orlov, S.A. Murzina

CONTENT

THE INTERACTION NATURE OF NEUROGLOBIN AND CYTOCHROME C M.A. Semenova, Z.V. Bochkova, O.M. Smirnova, E.Yu. Parshina, E.V. Bocharov, N.A. Brazhe, G.V. Maksimov, D.A. Dolgikh, R.V. Chertkova	147
Section 7. MEDICAL PHYSICS	
HADRON BEAM THERAPY AT NRC "KURCHATOV INSTITUTE" G.I. Klenov, V.S. Khoroshkov, A.N. Chernykh	152
USING MC TOPAS FOR DESIGNING SYSTEMS FOR THE FORMATION OF DOSE DISTRIBUTIONS FOR PROTON RADIATION THERAPY COMPLEXES A.N. Chernykh, V. I. Kostjuchenko, D.A. Zhidkov, K.S. Krasilshchikov	155
ASYMPTOTIC SOURCE FUNCTION APPROXIMATION BASED FLUORESCENCE MOLECULAR TOMOGRAPHY: CURRENT STATUS AND PROSPECTS A.B. Konovalov, V.V. Vlasov, S.I. Samarin, A.S. Uglov, I.D. Solovyev, A.P. Savitsky, V.V. Tuchin	161
PROTOPLAN: A DOSIMETRIC PLANNING SYSTEM L.G. Vaganyan, V.N. Verbenko, N.A. Kuzora, V.I. Maksimov, F.A. Pak, A.I. Khalikov	169
JUSTIFICATION OF THE USE OF FIBER-OPTIC REFRACTOMETRIC METHOD OF RAPID DIAGNOSIS OF VIRAL DISEASES T.I. Murashkina, V.A. Badeev	174
MEASURING THE PRESSURE OF THE TONGUE ON THE PALATE USING A FIBER-OPTIC MICROSENSOR T.I. Murashkina, E.A. Badeeva, Yu.A. Vasiliev, T.V. Parshikova, E.Y. Plotnikova, A.N.Kukushkin	180
PECULIARITIES OF THERMAL LASER-INDUCED COAGULATION OF BIO- MODELS A.K. Dmitriev, A.N. Konovalov, V.N. Kortunov, V.A. Ulyanov	186
LIPOFUSCIN ACCUMULATION IN THE LIVER OF 5XFAD MICE AS A PE- RIPHYRIC BIOMARKER OF ALZHEIMER'S DISEASE <i>A.V. Chaplygina, V.I. Kovalev, D.Y. Zhdanova</i>	191
GENETIC DEMOGRAPHIC APPROACH FOR CREATING FORENSIC DATA BASES FOR POPULATION OF MEGALOPOLIS Udina I.G., Gacheva A.S. ¹ , Vasiliev Yu.A., Gulenko O. V., Kurbatova O.L.	195
BIRTH RATE AND PREVALENCE OF ALLERGY AND JAUNDICE SYNDROME IN THE KRASNODAR ACCORDING TO THE DATA OF THE STATE MEDICAL INSTITUTION MATERNITY HOSPITAL OF KRASNODAR IN THE DYNAMICS OF 5 YEARS Ya.V. Klimenko, E.Yu. Plotnikova, I.I. Pavlyuchenko, Yu. A. Vasiliev, A.P. Stolyarova, L.G. Hakobyan	201
ASYMMETRIES IN THE FUNCTIONING OF THE MUSCULOSKELETAL SYS- TEM OF THE MAXILLOFACIAL REGION IN STROKES I.A. Kulikova, T.I. Murashkina, E.A. Badeeva, E.Yu. Plotnikova, I.I. Pavlyuchenko, Yu.A. Vasiliev	206
FORMATION OF A DATABASE OF ANTHROPOMETRIC AND PARAMETRIC VALUES OF THE MAXILLOFACIAL REGION E.Yu. Plotnikova, T.I. Murashkina, E.A. Badeeva, A.V.Olenskaya, A.A.Sukhinin, V.V.Volobuev, F.S.Ayupova, A.V.Arutyunov, V.V.Onopriev	213

УДК:613.29; 615-07; 577-2
ГРНТИ 65.09
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.10-15

О.В. Багрянцева^{1,2}, З.Г. Гурэу¹
¹ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»,
² ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова
Минздрава России

МЕТОДЫ БИОИНФОРМАТИКИ В ОЦЕНКЕ РИСКОВ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Филогенетический анализ с использованием методов биоинформатики ДНК технологических микроорганизмов позволяет с максимальной вероятностью выявить у них детерминанты антибиотикоустойчивости, векторные последовательности и/или внехромосомные элементы, которые обуславливают степень их неблагоприятного действия на организм человека.

Ключевые слова: анализ риска здоровью, пищевая продукция, технологические микроорганизмы, вероятность, филогенетический анализ

Olga V. Bagryantsev.,^{1,2} Zinaida G. Gureu¹

¹Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology;
² First Moscow State Medical University. I.M. Sechenov of Health Ministry

BIOINFORMATICS METHODS IN RISK ASSESSMENT OF TECHNOLOGICAL MICROORGANISMS

Phylogenetic analysis using bioinformatics methods of technological microorganisms DNA allows, with the maximum probability, to identify antibiotic resistance determinants, vector sequences and/or extrachromosomal elements in them, which determine the degree of their adverse effect on the human organism.

Key words: health risk analysis, food, technological microorganisms, probability, phylogenetic analysis

Введение.

В настоящее время в пищевой промышленности для производства пищевых компонентов широко используются биотехнологические методы, позволяющиекратно повысить эффективность производства и снизить себестоимость получаемой продукции за счет использования мутантных и генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов (ГММ).

Изменение последовательности ДНК в результате мутагенеза и генетической модификации может привести: к продукции различных изоформ белков и, следовательно, к изменению свойств биологически активных веществ, продуцируемых микробной клеткой, увеличению или уменьшению экспрессии белка, повышению или снижению активности фермента и условий ее проявления; увеличению вирулентности и патогенности микроорганизмов, используемых в пищевой промышленности, а также способности к продукции ими токсичных метаболитов или детерминант антибиотикоустойчивости, что, несомненно, может отразиться на качестве и безопасности пищевой продукции, получаемой с использованием микробного синтеза в случае ее недостаточной очистки [1]. Кроме того, изменения в генах, обуславливаемые мутациями, а также в результате использования биотехнологических методов, может привести к образованию новых видов микроорганизмов с выраженными патогенными свойствами. Такие изменения объясняются теорией Бидла и Тейтума (1945 г), которая была основана на исследовании механизмов синтеза веществ микроорганизмами и выражена формулой «один ген - один фермент». Впоследствии данная формула была подтверждена результатами молекулярных исследований и определена в форме «один ген, одна молекула матричной РНК (мРНК), один белок». При этом, впервые была установлена связь между структурой одного гена и конкретной химической реакцией, происходящей в клетке [2]. В этой связи, оценка

рисков здоровью человека пищевой продукции микробного синтеза должна быть основана, в первую очередь, на результатах проведения исследований филогенетических свойств штамма-произдента, а также наличия в его генотипе детерминант патогенности, токсигенности, антибиотикоустойчивости, векторных последовательностей и/или внехромосомных элементов (плазмид, транспозонов, бактериофагов и др.), которые обуславливают степень его патогенности и вирулентности [3].

В этой связи является важным развитие скрининговых методов анализа свойств микроорганизмов на основе данных секвенирования их ДНК и филогенетического анализа с использованием методов биологической статистики.

Цель: Анализ алгоритма оценки риска здоровью населению технологических штаммов микроорганизмов, используемых в производстве пищевой продукции, на основе методов определения их филогенетического родства и биоинформатики.

Материалы и методы.

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

Основные результаты и обсуждение.

С целью оценки безопасности штамма-произдента, в первую очередь, должна быть предоставлена информация об его таксономической принадлежности: бинарное название на латинском языке и индивидуальный код-номер штамма. Оцениваемый производственный штамм должен быть депонирован в официальных коллекциях микробных культур национального или международного уровня. Таксономическая принадлежность штаммов оценивается в соответствии с установленными принципами систематики для прокариотических микроорганизмов, применяемых в отношении бактериальных культур, или для эукариотических микроорганизмов (дрожжеподобных и плесневых грибов) [4,5].

Таксономическая идентификация бактерий производится с помощью методов биоинформатики на основе данных о последовательностях всего генома путем ее сравнения со структурой ДНК штаммов, приведенных в официальных базах данных, обычно используемых в процессе таксономической идентификации. При этом, особое внимание уделяется наличию определенных последовательностей нуклеотидов, например гена 16S рРНК или конститутивных генов, которые обеспечивают осуществление функций, свойственных всем типам клеток определенного вида микроорганизма. Данные гены, как правило, характеризуются высоким содержанием пары гуанин-цитозин и локализованы в сегментах хромосом, положительно окрашиваемых при R-бэндинге.

Полногеномное секвенирование (включая анализ последовательности ДНК хромосом и внехромосомных генетических элементов, например, плазмид) является предпочтительным и при идентификации дрожжеподобных грибов. Филогеномный анализ дрожжеподобных грибов проводится с помощью конкатенации (анализа цепи) нескольких консервативных генов, что позволяет установить филогенетическую связь между известными родственными геномами.

В отношении плесневых грибов (при наличии результатов полногеномного секвенирования) идентификация должна производиться с помощью филогеномного анализа путем сравнения генома с доступными данными о строении ДНК родственных геномов. Например, идентификация может быть проведена путем сравнения гена 18S рРНК и/или внутреннего транскрибируемого спейсера - участка кластера рибосомной ДНК, разделяющего гены двух высокомолекулярных рРНК. Транскрибируемый спейсер «вырезается» в процессе созревания рРНК. Кроме того, проводится анализ последовательностей ДНК, отвечающих за синтез антибиотиков, бактериальных токсинов и микотоксинов, а также других характерных последовательности нуклеотидов. При установлении видовой принадлежности штамма-произдента используются как фенотипические признаки, так и результаты молекулярных исследований, получаемые при помощи полимеразно-цепной

реакции (ПЦР метода) и секвенирования ДНК [4,6]. Каждый вид мутантного или ГМ микроорганизма необходимо проследить до его общего предка в корне филогенетического дерева (Рис 1) [7].

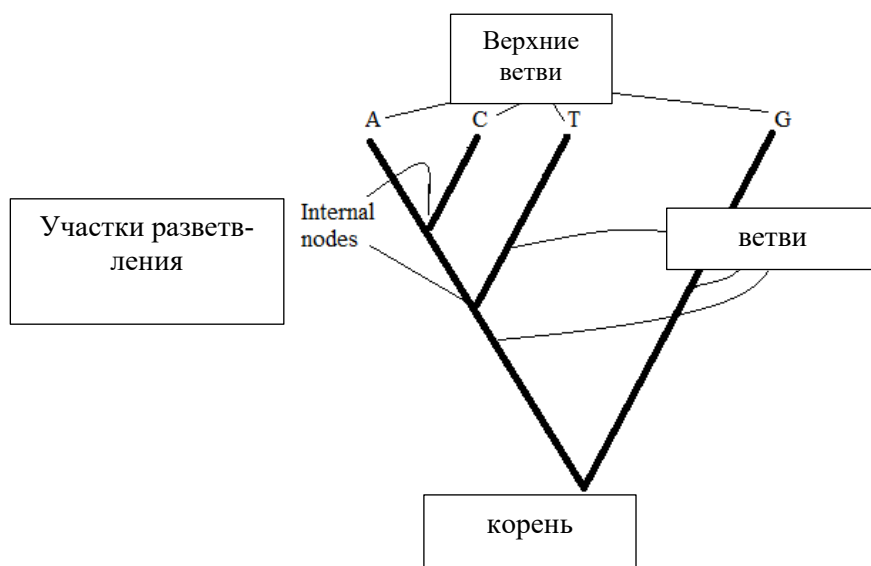


Рисунок 1- Принципы построения филогенетического дерева [6]

В процессе построения филогенетического дерева вычисляется вероятность $(P_{ij}(t))$ замены основания ДНК, то есть вероятность того, что ДНК_i подверглось мутации и было заменено основанием j в момент времени t . Такие замены отражают процесс, называемом «цепи Маркова», который прогнозирует будущие состояния ДНК в зависимости от настоящего в соответствии с формулой [7]:

$$P_{ij} = P(X(t + s) = j / X(s) = i);$$

В качестве регуляторных элементов, способствующих селекции штамма-продуцента, при ГМ модификации, как правило, служат гены антибиотикорезистентности или гены условно-патогенных микроорганизмов (например, *E.coli*, *St aureus* и др.), определяющие токсигенный потенциал этих микроорганизмов, которые в последствии могут не «вырезаться». Кроме того, в качестве штамма-реципиента может быть использовано ДНК штаммов особо опасных инфекций. Таким образом, генетические технологии несут высокие риски биобезопасности для населения [5].

Быстрое накопление данных о результатах полногеномного синтеза микроорганизмов явилось стимулом к изучению эволюции геномной архитектуры, при таких событиях, как геномные перестройки при трансгенезе, мутации. Вместе с тем, современные подходы в области филогенетического анализа несколько ограничены небольшим количеством результатов анализа близкородственных геномов и кодируемых ими продуктов. Более того, эти подходы, как правило, не включают анализ результатов мутаций и изменений состава генотипа ГММ. В этой связи, в настоящее время разрабатываются подходы, способствующие исследованию геномов эукариотических организмов, которые могут позволить в одном и том же случае проводить анализ геномов с очень разным количеством маркеров (40 000 или более), так как они предусматривают использование методов биологической статистики (RAxML) [8].

Необходимость разработки перечня микроорганизмов, квалифицированных как безопасные обусловили развитие исследований по выявлению возможного наличия факторов антибиотикоустойчивости, патогенности и вирулентности в составе технологических микроорганизмов [9]. В 2019 году Европейская комиссия (ЕК) направила в Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA) и Европейский центр профилактики и контроля заболеваний (ECDC) разрешение на внедрение и управление

двумя совместимыми системами для сбора и анализа данных о полногеномном секвенировании *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* и *Escherichia coli*, включая энтеропатогенные *E. coli*. Цель данной работы в предоставлении надежного и эффективного инструмента для быстрого выявления вспышек инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи. В соответствии с этой системой, геном технологических микроорганизмов должен быть проверен на наличие генов антибиотикоустойчивости к противомикробным препаратам, используемым в клинической и ветеринарной практике. Для этой цели проводятся сравнение последовательности ДНК исследуемого штамма с последовательностями, определяющими устойчивость к антибиотикам, приведенным в современных базах данных¹. Анализ должен основываться на результатах кодирования генов устойчивости к противомикробным препаратам с указанием процента идентичности с эталонной последовательностью [4].

Анализ полученных результатов секвенирования ДНК также должен быть направлен на выявление последовательностей ДНК характерных для патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Гены вирулентности и токсигенности в ДНК выявляются на основе анализа секвенированных геномов, в сравнении с последовательностями приведенными в базах данных, например в VFDM (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) [10]. Так, например, большинство факторов вирулентности *Escherichia coli* представляют адгезины, токсины, факторы, определяющие скорость метаболизма железа, гены, отвечающие за биосинтез липополисахаридов и полисахаридов входящих в состав капсул. В секвенированных изолятах *Klebsiella pneumoniae* многие факторы вирулентности связаны с плазмидами. Крупные плазмиды этих штаммов гомологичны плазмиде вирулентности pLVPK из клебсиеллы (AY378100.1). Эти плазмиды содержат несколько генов вирулентности, в том числе *gmpA*, *ibeB*, *iha*, *iroB*, *iroN*, *irp*, *iucA* и *iutA*. Самое большое количество генов вирулентности (377) выявлено у штамма *Pseudomonas aeruginosa* 9/195. Основные факторы вирулентности *P. aeruginosa* включают эластазу, фосфолипазу С, протеазу А, экзотоксины и цитотоксины, белки жгутиков и пилей, продукция пигмента. Два секвенированных штамма *P. aeruginosa* 7/157 и 16/222 имели гены, кодирующие токсин типа III, *exoU*, *exoT* и *exoY*. *ExoT* входит в состав всех изолятов *P. aeruginosa* выделенных в клинике и объектов окружающей среды, тогда как *exoS* обнаруживается примерно в 70% клинических изолятов. Токсин *exoU* является наиболее вирулентным фактором среди эффекторов *P. aeruginosa* типа III. Большое количество генов вирулентности, идентифицированных в секвенированном геноме (более 70), были связаны с синтезом жгутиков и белками пилей IV типа. Кроме того, у этих штаммов были обнаружены гены двух систем QS, *las* и *rhl*. Более 20 генов были ассоциированы с биосинтезом альгината, полисахарида, способствующего адгезии бактерий в легких. Другим важным фактором вирулентности *P. aeruginosa* является *algU*, кодирующий экстрацитоплазматический сигма-фактор, который играет ключевую роль в патогенезе муковисцидоза. Все исследованные штаммы *P. aeruginosa* имели ген *plcH*, кодирующий гемолитическую фосфолипазу С, что является важным фактором вирулентности этих патогенов. У *P. aeruginosa* обнаружены все гены, участвующие в синтезе пиовердина, пиоцианин и пиохелин, которые обуславливают развитие хронической инфекции [10].

В настоящее время EFSA разработало систему «EFSA One Health WGS», которая предусматривает сбор и хранение в специальной базе данных о полногеномном анализе последовательностей ДНК изолятов микроорганизмов. Данная система позволяет обнаруживать кластеры микроорганизмов посредством автоматического обмена данными типирования на основе общегеномного секвенирования [3]. Перечень аналогичных систем в настоящее время достаточно велик [3, 6]. Считаю целесообразным организацию аналогичной базы данных и в ЕАЭС.

Выводы.

¹ <http://busco.ezlab.org>

⁴ <https://card.mcmaster.ca/>

⁵ <http://en.mediterranee-infection.com/article.php?laref=283%26titre=arg-annot>

⁶ <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>

Анализ возможного безопасного использования для здоровья человека технологических штаммов-продуцентов пищевых ингредиентов, преднамеренно вводимых в пищевую цепь, в числе других данных, получаемых в условиях *in vitro* и *in vivo*, должен включать результаты полногеномного секвенирования ДНК, анализ таксономической принадлежности микроорганизмов и наличия у них способности к продукции антибиотиков, хромосомных и внехромосомных элементов, отвечающих за синтез антибиотиков, бактериальных и микотоксинов и других факторов патогенности и вирулентности. Анализ наличия последовательностей ДНК у таких микроорганизмов, обуславливающих их возможное негативное действие на здоровье человека, должен проводиться с использованием методов биологической статистики с использованием данных о филогенетической связи анализируемого микроорганизма с известными родственными геномами.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются положения о порядке проведения анализа рисков технологических штаммов микроорганизмов в Российской Федерации с использованием методов биоинформатики и филогенетики.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература.

1. Багрянцева О.В., Гмошинский И.В., Шупелин В.А., с соавт. Оценка влияния ферментного препарата -комплекса глюкоамилазы и ксиланазы из *Aspergillus awamori* xyl t-15 на микробиом кишечника и иммунологические показатели крыс//Вопросы питания. 2022. Т. 91. № 3 (541). С. 42-52, doi.org/10.33029/0042-8833-2022-91-3-00-00
2. История биологии (с начала XX века до наших дней). -М.1975.-600 с./под ред. Л.Я.Бляхера
3. Costa G., Di Piazza G., Koevoets P. et al. Guidelines for reporting Whole Genome Sequencing-based typing data through the EFSA One Health WGS System// EFSA Supporting publication 2022:EN-7413, 29 p., doi:10.2903/sp.efsa.2022.EN-7413
4. Silano V., Baviera J., M.B., Bolognesi C. et al. Characterisation of microorganisms used for the production of food enzymes//EFSA Journal 2019;17(6):5741, 13 p., doi: 10.2903/j.efsa.2019.5741
5. Aggett P., Aguilar F., Crebelli R. et al. Guidance on safety evaluation of sources of nutrients and bioavailability of nutrient from the sources // EFSA J. 2018. Vol. 16,N 6. Article ID 5294. 35 p.; doi: 10.2903/j.efsa.2018.5294.
6. Lücking R., Aime M.C., Robbertse B. et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?// IMA Fungus (2020) 11:14, 32 p., https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z
8. Cho A. Constructing Phylogenetic Trees Using Maximum Likelihood. 2012. Scripps Senior Theses. Paper 46., 58 p. http://scholarship.claremont.edu/scripps_theses/46
9. Lin Y. Maximum Likelihood Phylogenetic Reconstruction from High-Resolution Whole-Genome Data and a Tree of 68 Eukaryotes// Pac Symp Biocomput. 2013: 285–296
10. Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordóñez A. et al. Scientific Opinion on the update of the list of QPS recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017–2019)// EFSA Journal 2020;18(2):5966, 56 p.; doi: 10.2903/j.efsa.2020.5966
11. Korotetskiy I.S., Shilov S.V., Kuznetsova T. et al. Analysis of Whole-Genome Sequences of Pathogenic Gram-Positive and Gram-Negative Isolates from the Same Hospital Environment to Investigate Common Evolutionary Trends Associated with Horizontal Gene Exchange, Mutations and DNA Methylation Patterning// Microorganisms 2023, 11, 323, 25 p., https://doi.org/10.3390/microorganisms11020323

Сведения об авторах

Багрянцева Ольга Викторовна

¹доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» 109240, Москва, Устьинский пр-д, д.2/14, Россия,

² профессор кафедры гигиены питания и токсикологии

ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

e-mail: bagryantseva@ion.ru

Гурзу Зинаида Геннадиевна

аспирант

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Устьинский пр-д, д.2/14, Россия,

e-mail: gurzinaida1395@gmail.com

Information about author

Bagryantseva Olga V.,

¹Dr of Biological Sciences, Leading Researcher of

Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation;

² First Moscow State Medical University. I.M. Sechenov of Health Ministry, ,

Moscow, Russian Federation

e-mail: bagryantseva@ion.ru

Gureu Zinaida G.,

postgraduate,

Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

e-mail: gurzinaida1395@gmail.com

УДК: 575.852

ГРНТИ 34.27.17

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.15-20

Е. В. Емец, Л. Е. Михеева

Московский государственный университет имени

М. В. Ломоносова

ИЗУЧЕНИЕ МУТАНТОВ ЦИАНОБАКТЕРИИ TRICHORMUS VARIABILIS ATCC29413, УСТОЙЧИВЫХ К ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

*Статья посвящена получению и сравнительному изучению нового типа мутантов азотфиксирующей цианобактерии *Trichormus variabilis* с повышенным уровнем терморезистентности в гетеротрофных условиях культивирования.*

Ключевые слова: цианобактерии, *Trichormus variabilis*, термотолерантность, стрессовые воздействия, адаптивная эволюция

E. V. Emets, L. E. Mikheeva

Lomonosov Moscow State University

MUTANTS OF CYANOBACTERIA TRICHORMUS VARIABILIS ATCC29413 TOLERANT TO ELEVATED TEMPERATURE OF CULTIVATION

*The article discusses the comparative characterization of the new mutant strains of nitrogen-fixing cyanobacterium *Trihormus variabilis* selected at elevated temperature under heterotrophic cultivation conditions.*

Keywords: cyanobacteria, *Trichormus variabilis*, thermotolerance, stress, adaptive evolution

Введение

Цианобактерии представляют собой одну из наиболее древних, широко распространенных и разнообразных групп микроорганизмов на Земле [1]. Они обладают уникальными адаптивными возможностями, позволяющими им обитать во всех экологических нишах, в том числе в экстремальных условиях геотермальных источников, водных и почвенных экотопов Арктики и Антарктики. Поэтому большой интерес представляют собой исследования механизмов устойчивости цианобактерий к различным

неблагоприятным факторам, таким как высокие и низкие температуры, солевой, гиперосмотический и окислительный стрессы [2]. У цианобактерий под влиянием сублетальных воздействий неблагоприятных условий происходят изменения, имеющие адаптивное значение, в процессах клеточного метаболизма, морфологические изменения, нарушаются процессы фотосинтеза и дыхания, синтезируются дополнительные вещества. Стрессовые воздействия вызывают индукцию определенного набора генов, необходимых для акклиматизации клеток.

Одним из важнейших аспектов в изучении стрессовых воздействий на цианобактерии является клеточный ответ на повышенные температуры, что особенно актуально как для расшифровки молекулярных механизмов адаптации цианобактерий, так и для коммерческого выращивания цианобактерий, например, для производства биотоплива. Известно, что ответ цианобактерий на краткосрочное и долгосрочное воздействие повышенной температуры различается. Различные гены связаны с реакцией на тепловой шок, однако не до конца изученным остается вопрос о генетических последствиях длительного воздействия высокой температуры на клетки цианобактерий [3].

Целью настоящей работы являлось получение и анализ нового типа мутантов азотфиксирующей цианобактерии *Trichormus variabilis* с повышенным уровнем терморезистентности в гетеротрофных условиях культивирования. Полученные результаты позволят в дальнейшем расшифровать молекулярные механизмы, обеспечивающие адаптацию гетероцистных цианобактерий к неблагоприятным воздействиям внешней среды.

Материалы и методы

Основным объектом данного исследования является штамм азотфиксирующей нитчатой цианобактерии *Trichormus variabilis* ATCC 29413 из коллекции кафедры генетики МГУ. Отбор мутантных штаммов проводили на агаризованной среде в гетеротрофных условиях культивирования. Для этого чашки с плотными средами BG-110 и BG-11 с добавлением 5мМ фруктозы засеивали клетками штамма *T. variabilis* ATCC 29413 (*w.t.*) методом серийных разведений и инкубировали в темноте в термостате при 42оС. После инкубации чашек в течение одного месяца отбирали отдельные колонии терморезистентных клонов. Для проверки свойства терморезистентности мутанты субклонировали в фотоавтотрофных условиях культивирования при 32°С с периодической проверкой способности к росту в селективных гетеротрофных условиях при 42°С.

Для изучения морфологических и ростовых характеристик (цвет, форма и размер колоний и штрихов) культуры исследуемых штаммов выращивали в жидкой среде и на чашках Петри с плотной средой в стандартных условиях культивирования (BG-110, на свету) и анализировали при помощи метода световой микроскопии на увеличении x200 и x400. Спектры поглощения нативных культур цианобактерий определяли при комнатной температуре в среде роста на спектрофотометре *AnalytikJena Specord 50*. Перед измерением уравнивали плотность культур клеток всех штаммов до значения ОП750=0,6. Для построения кривых роста по оптической плотности культуры выращивали стационарно в жидких средах. Измерение оптической плотности культур клеток цианобактерий проводили на спектрофотометре «КФК-2-УХЛ4.2» при длине волны 670 нм.

Для определения количественного содержания липидов и индекса ненасыщенности жирных кислот использовали четырехсуточные культуры дикого типа и мутантных штаммов, выращенные в жидкой среде при температурах 32оС и 42оС. Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) суммарных липидов из разрушенных жидким азотом клеток *T. variabilis* очищали методом препаративной тонкослойной хроматографии и определяли их состав с помощью ГЖХ-МС на приборе *Agilent 7890A GC* с 60 м капиллярной колонкой с внутренним диаметром 0.25 мм на базе лаборатории в Институте физиологии растений РАН.

Для определения уровня резистентности культур к ингибиторам роста штаммы

выращивали в стандартных условиях культивирования до поздней логарифмической фазы, уравнивали оптическую плотность, и аликвоты культур инкубировали в микротитровальном планшете в течение 72 часов в присутствии ингибиторов возрастающей концентрации.

Полученные результаты

T. variabilis является мезофильным организмом с температурным оптимумом роста от 32 до 38°C. Наши эксперименты показали, что при температуре 42°C ингибируется рост клеток дикого типа на агаризованной среде в гетеротрофных условиях культивирования. Однако после инкубации в течение одного месяца можно отобрать отдельные колонии устойчивых мутантов. Таким образом нами было выделено около 50 мутантных штаммов с повышенной терморезистентностью. Мутанты стабильно сохраняли это свойство при последовательных пересевах в фотоавтотрофных условиях культивирования при 32°C с периодической проверкой способности к росту в селективных гетеротрофных условиях при 42°C (рис. 1).

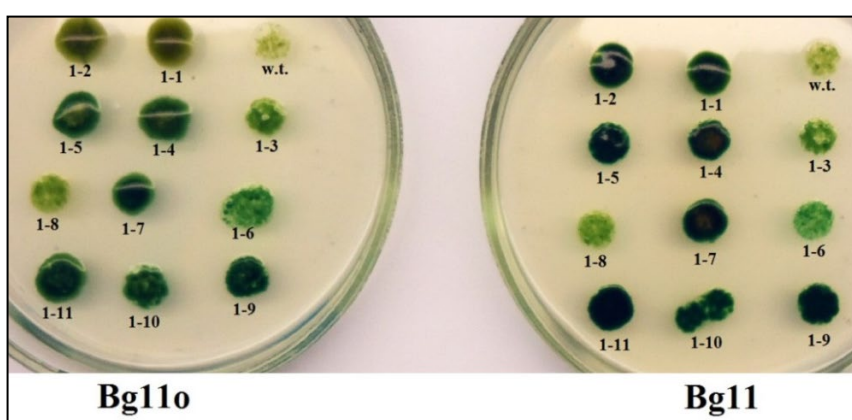


Рисунок 1. Рост культур дикого типа *T. variabilis* (w.t.) и некоторых терморезистентных мутантных штаммов в течение 10 дней при 42°C в темноте на безазотистой среде (BG-11₀) и на среде с азотом (BG-11) с добавлением фруктозы.

Выделенные мутантные штаммы характеризовались различными морфологическими и физиологическими изменениями: в частности, было выделено несколько мутантов, не способных расти на безазотистой среде (Nif-) или растущих на безазотистой среде на свету только в присутствии фруктозы. Наиболее многочисленными были мутанты, хорошо растущие на различных средах фотоавтотрофно, но отличающиеся от исходного штамма по окраске клеток - желто-зелёной или голубой. Из этой группы терморезистентных мутантов для дальнейшего изучения были выбраны три мутантных штамма, фенотипически отличающихся от культуры дикого типа *T. variabilis* по одному или нескольким признакам. При определении выживаемости клеток на плотной среде при температуре 42°C мутанты оказываются более устойчивыми по сравнению с диким типом на длительных сроках инкубации.

Анализ культур дикого типа и мутантов методом световой микроскопии показал, что штаммы различаются по размерам и окраске клеток (рис. 2). Так, мутанты 1-4 и 2-37 характеризуются сине-зеленой окраской и более крупными размерами клеток; штамм 2-35 имеет желто-зеленый цвет и достоверно не отличаются по размеру клеток по сравнению со штаммом дикого типа.

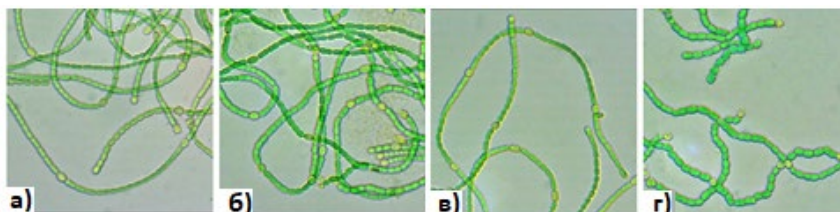


Рисунок 2. Микрофотографии культур исследуемых штаммов дикого типа *T. variabilis* (w.t.) и мутантов на среде BG-110 (x400): а) – w.t.; б), в), г) – мутантные штаммы 1-4, 2-35 и 2-37 соответственно.

Спектрофотометрический анализ суспензий культур продемонстрировал, что ряд мутантов характеризуется изменениями в количестве фикобилиновых пигментов (рис. 3). У мутантов 1-4 и 2-37 относительное содержание фикоцианина повышено по сравнению с диким типом, данный пигмент придает культурам голубой оттенок, у мутанта 2-35 содержание фикоцианинов несколько занижено, но при этом у них повышено содержание каротиноидов, что в комплексе обуславливает его желто-зеленый цвет.

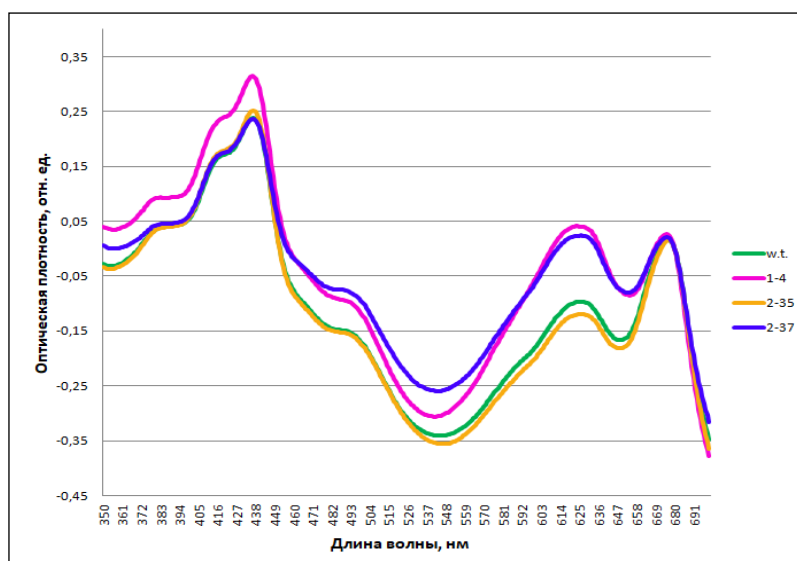


Рисунок 3. Спектры поглощения культур дикого типа (w.t.) и мутантных штаммов *T. variabilis* при культивировании в жидкой среде Bg110. Спектры нормированы по максимуму поглощения при 680 нм, соответствующему поглощению хлорофилла. На графике пик при 680 нм соответствует хлорофиллу, при 625 нм – фикоцианину

Мутантные штаммы по скорости роста существенно не отличаются от штамма дикого типа в стандартных условиях культивирования на свету, однако можно отметить некоторое снижение скорости роста у сине-зеленых мутантов по сравнению с диким типом в условиях азотфиксации и более интенсивный рост желто-зеленого мутанта при продолжительном культивировании в тех же условиях.

Анализ биохимических характеристик показал, что мутанты отличаются от исходного штамма по количественному содержанию липидов и содержанию ненасыщенных жирных кислот (табл. 1). Установлено, что индекс ненасыщенности выше у мутантов в основном за счет повышенного содержания триненасыщенных жирных кислот 8.12.15-18:3. Изучение количественного состава жирных кислот показало, что воздействие температуры 42°C на мутантные штаммы не оказывает значительного влияния на повышение уровня ненасыщенных жирных кислот. Полученные данные свидетельствуют об определенных изменениях в мембранах у мутантных штаммов. Прежде всего, изменения в свойствах мембран затрагивают мембрансвязанные ферментные комплексы, которые отвечают за различные процессы, в том числе за перенос электронов в процессах фотосинтеза, дыхания, азотфиксации.

Таблица 1. Некоторые физиолого-биохимические характеристики культур дикого типа *T. variabilis* (w.t.) и термотолерантных мутантов

Штамм	Фенотип	Содержание липидов, мкг/мкг белка	Индекс ненасыщенности жирных кислот, у.е.	Количество молекулярного водорода, мл/мг белка
w.t.	Зеленый	0,046	0,626	0,15
1-4	Сине-зеленый	<u>0,084</u>	<u>0,831</u>	<u>0,63</u>
2-35	Желто-зеленый	<u>0,163</u>	<u>0,951</u>	0,10
2-37	Сине-зеленый	<u>0,085</u>	<u>1,014</u>	<u>0,71</u>

Поглощающая гидрогеназа представляет собой встроенный в мембрану ферментный комплекс и является донором электронов в дыхательную цепь на уровне пластохинона от окисленного молекулярного водорода. Эксперименты по тестированию мутантных штаммов на способность к выделению молекулярного водорода в микроаэрофильных условиях показали, что некоторые сине-зеленые штаммы способны выделять значительное количество молекулярного водорода в микроаэрофильных условиях, превышающее уровень продукции дикого типа (табл. 1).

Повышение уровня выделения водорода у мутантов может объясняться изменениями в структуре мембран или изменениями на определенных этапах электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), так как и нитрогеназа, и поглощающая гидрогеназа – мембрансвязанные ферменты, связанные с процессом фотосинтеза.

Мутанты характеризуются различными изменениями свойств мембран, которые, как показывают многочисленные исследования, определяют эффективность различных этапов цепи переноса электронов на тилакоидных мембранах [4]. Поэтому в наших экспериментах была изучена сравнительная чувствительность культур к различным ингибиторам процесса переноса электронов, таким как дурухинон, дибромотимохинон (DBMIB), дихлорфенилдиметилмочевина (DCMU) или агентам, действующим непосредственно на мембраны, таким как цетилтриметиламмония бромид (СТАВ). Выявлено, что изученные мутанты характеризуются измененной чувствительностью к воздействию некоторых ингибиторов электронного транспорта, индуцирующих окислительный стресс у цианобактерий (табл. 2).

Таблица 2. Пороговые концентрации ингибиторов роста при культивировании штаммов на свету в жидкой среде BG-11₀; Dur – дурухинон, DBMIB – дибромотимохинон, DCMU – дихлорфенилдиметилмочевина, РСМВ – парахлормеркурийбензоат, MV – метилвиологен, MEN – менадион, СТАВ – цетилтриметиламмония бромид

Штамм	Dur, мкг/мл	DBMIB, мкг/мл	DCMU, мкМ	MV, мкг/мл	MEN, мкг/мл	СТАВ, мкг/мл
w.t.	20	50	80	0,05	5	15
1-4	10	35	80	0,01	3	7
2-35	20	45	80	0,05	7	12
2-37	10	35	80	0,01	3	10

Обработка культур ингибитором СТАВ, действующим на мембраны клеток, показала, что все мутантные штаммы по сравнению с диким типом оказываются чувствительны, что свидетельствует об определенных изменениях в их мембранах. Чувствительность мутантных штаммов к DCMU не изменена, следовательно, можно предположить, что перенос электронов от фотосистемы II к пулу пластохинонов у мутантов не изменен по сравнению с диким типом. Все мутанты в разной степени чувствительны к DBMIB,

что может свидетельствовать об определенных изменениях в пуле пластохинонов.

Мы определили, что мутанты могут иметь нарушения на определенных этапах в процессе переноса электронов. Не исключено, что изменения в ЭТЦ связаны с изменениями в структуре мембран, которые в свою очередь влияют на активность мембрано-связанных ферментных комплексов (поглощающая гидрогеназа, оксидоредуктаза, пластохинон).

Выводы

Получены и охарактеризованы мутанты азотфиксирующей цианобактерии *Trichorismus variabilis*, устойчивые к повышенной температуре 42°C в гетеротрофных условиях культивирования и отличающиеся от исходного штамма дикого типа по содержанию фикобилиновых пигментов, чувствительности к ингибиторам ЭТЦ и изменениям мембран клеток. Сравнительный анализ уровня устойчивости мутантных штаммов к ингибиторам ЭТЦ показал, что в клетках сине-зеленых мутантов 1-4 и 2-37 нарушен процесс переноса электронов от пула пластохинонов к низкопотенциальным акцепторам в фотосинтетической и дыхательной ЭТЦ.

Заключение

Авторы считают, что в этой статье новыми являются следующие положения и результаты: нами предложена методика выделения терморезистентных мутантов азотфиксирующей цианобактерии *T. variabilis* ATCC 29413. Полученные в данной работе терморезистентные мутанты представляют собой фенотипически разнородную группу штаммов, что может свидетельствовать о сложной генетической природе признака терморезистентности у гетероцистной цианобактерии *T. variabilis*. Выделенные мутанты могут применяться в биотехнологии, а также являются перспективным модельным объектом для идентификации генов, участвующих в восприятии и передаче стрессовых сигналов в клетках цианобактерий, и, следовательно, для расшифровки молекулярных механизмов адаптации гетероцистных цианобактерий как к повышенной температуре, так и другим стрессовым воздействиям.

Литература

1. Shih P. M., Wu D. Y., Latifi A. et al. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. 110, 1053–1058. 10.1073/pnas.1217107110.
2. Yadav, Priya; Singh, Rahul; Rana, Shashank et al. Mechanisms of Stress Tolerance in Cyanobacteria under Extreme Conditions. 2022. 2. 531–549. 10.3390/stresses2040036.
3. Zorina et al. Regulation systems for stress responses in cyanobacteria. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2011. 58:643-663.
4. Conrad W. Mullineaux. Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* 2014. V.1837, I.4, P. 503-511, ISSN 0005-2728, 10.1016/j.bbabi.2013.11.017.

Сведения об авторах

Елизавета Владимировна Емец

аспирант

Московский государственный университет

имени М.В. Ломоносова

Москва, Россия

Эл. почта: lizayemets@mail.ru

Лидия Евгеньевна Михеева

к.б.н., в.н.с.

Московский государственный университет

имени М.В. Ломоносова

Москва, Россия

Эл. почта: lidamikheeva@yandex.ru

Information about authors

Elizaveta Vladimirovna Emets

postgraduate

Lomonosov Moscow State University

Moscow, Russia

E-mail: lizayemets@mail.ru

Lidia Evgenievna Mikheeva

Ph.D., Leading Researcher

Lomonosov Moscow State University

Moscow, Russia

E-mail: lidamikheeva@yandex.ru

УДК 574.64-0.36 + 628.355
ГРНТИ 34.27.49
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.21-25

Я.В. Саванина,
МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет.

ИСКУССТВЕННАЯ СИМБИОТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА В ОЧИСТКЕ ВОДЫ ОТ ТЕХНОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

В статье обсуждаются возможность получения искусственных симбиозов цианобактерий с гетеротрофными бактериями, выделенными из загрязненных сред, и их использования при очистке воды от микропластика и сопутствующих загрязнений.

Ключевые слова: цианобактерии, бактерии, иммобилизованные культуры, водная токсикология, биологическая очистка, микропластик.

Y. V. Savanina

School of Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University

ARTIFICIAL SYMBIOTIC SYSTEM IN WATER PURIFICATION FROM MAN-MADE POLLUTIONS

The article discusses the possibility of obtaining artificial symbioses of cyanobacteria with heterotrophic bacteria isolated from polluted media and their use in water purification from microplastics and associated pollution.

Keywords: cyanobacteria, bacteria, immobilized cultures, water toxicology, biological treatment, microplastic.

Введение

По объему поступления и по потенциальной биологической и экологической опасности к основным загрязнителям природных вод относятся тяжелые металлы, углеводороды, в последние десятилетия к ним вплотную приближаются эвтрофикационное и пластиковое загрязнение [1, 2]. Пластиковое загрязнение представлено множеством форм, одной из которых является «микропластик». В настоящее время этот термин означает частицы синтетических полимеров или сополимеров (пластика), размером от нм до 5 мм. Эти частицы состоят из твердых материалов, нерастворимы в воде и трудно-разлагаемы [2, 3]. Эти материалы являются стойкими загрязнителями синтетического происхождения, они обнаруживаются в растениях, животных, биологических жидкостях людей, питьевой воде [3]. От 3 до 12 миллиардов частиц размером от 100 нм до 6 мкм переходит в жидкость из одного чайного пакетика при заваривании. При этом не существует ни четких методик по определению таких частиц, ни способов очистки от них. Меры борьбы с пластиковым загрязнением, известные на настоящий момент – раздельный сбор и переработка мусора, а также ограничение производства одноразовых пластиковых предметов (все, что будет использовано и выброшено в течение одного года – пластиковая посуда, бутылки и пр.) и максимальная замена их биodeградируемыми полимерами, получаемыми из окружающей среды [2]. Считается, что такие полимеры разлагаются на территории свалок или в океанской воде в течение 1-2 лет. Фактически же они распадаются на мелкодисперсные частицы, обладающие повышенной миграционной способностью в природной среде. Наиболее распространенными загрязнителями этого типа являются частицы бисфенола А и полистирола [2, 4]. Установки по очищению сточных вод проходят до 10-30% неразлагаемых частиц, которые при этом смешиваются с различными химическими загрязнителями и микроорганизмами. Далее они попадают в неочищенные сточные воды, в осадок сточных вод, используемый в качестве удобрения, превращаются в захороненные твердые отходы и пр. [4].

Цель работы. Проанализировать особенности диффузионной культуры цианобактерий с точки зрения получения искусственных симбиотических систем с гетеротрофными бактериями, выделенными из загрязненных сред, и их использования при очистке природных вод от микропластика и сопутствующих загрязнений.

Материалы и методы. Использовали культуры нитчатых цианобактерий *Nostoc sp.* и *Anabaena sp.* из коллекции кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и бактериальные ассоциации, выделенные из загрязненных местообитаний [5].

Выращивали культуры и проводили эксперименты на минеральной среде «С» в периодическом суспензионном и периодическом диффузионном (далее в тексте «периодическом» и «диализном» соответственно) режимах культивирования цианобактерий. В ассоциативной (смешанно-раздельной) культуре автотрофный компонент помещали внутрь диализного мешка, а гетеротрофные бактерии - во внешний объем. Использовали мешки фирмы Serva (Германия), диаметром 25 мм и с размерами пор, пропускающих соединения с молекулярной массой до 15 кДа, а также пищевую целлофановую прозрачную оболочку диаметром 25 мм.

Для выделения бактерий из загрязненных сред использовали 5-7 дневную диализную культуру, во внешнюю среду вносили аквариумный грунт, грунт из промышленного водоема, почву с бензоколонки.

В качестве модельных загрязнителей использовали эвтрофицированную воду, растворы тяжёлых металлов и частицы микропластика двух видов – аптечный препарат на гелевой основе и размолотые частицы твёрдого пластика (до 1 мм), а также их смеси [5, 6]. Уровень детоксикации среды оценивали по остаточному содержанию действующего вещества в среде, а также с использованием диализной тест-культуры *Synechococcus* 6301 [5, 7]. Количество частиц микропластика в среде определяли при микроскопировании.

Полученные результаты.

Для интенсификации очистки сточных вод наиболее перспективны методы, основанные на применении иммобилизованных бактериальных клеток. Данный подход совмещает в себе сорбцию и концентрирование загрязняющего вещества на твердофазной подложке вблизи иммобилизованных бактериальных клеток, что делает его более доступным для последующего окисления. Видовое разнообразие микробных ассоциативных систем обеспечивает их ферментное разнообразие и способствует детоксикации стоков от загрязнений сложного состава [1, 5].

Диффузионная (диализная) культура представляет собой одну из разновидностей культуры иммобилизованных клеток. Иммобилизованная культура (в гранулах геля, на синтетическом волокне) характеризуется сниженной скоростью роста и фотосинтеза при сохранении высокой скорости метаболизма [5, 8]. При данном типе культивирования клетки микроорганизмов находятся в мешке из диализной мембраны, погруженном в 10 (и более)-кратный объем «внешней среды». Благодаря этому обеспечивается непрерывное поступление питательных веществ и отток метаболитов, ингибирующих клеточное деление. Внутри малого объема концентрируется плотная суспензия физиологически «молодых» клеток. В пересчете на общий объем к достижению стационарной фазы биомасса диализной культуры в 2,5-3 раза выше, чем в периодической (в объеме мешка концентрация суспензии цианобактерий выше в десятки раз); а содержание хлорофилла превышает таковое в периодической культуре в 6 раз. Свободному прохождению молекул токсикантов (как и других веществ с молекулярной массой до 8-10 kDa) диализная мембрана не препятствует. В диализном мешке накапливаются преимущественно высокомолекулярные полисахариды, а низкомолекулярные диффундируют во внешний объем. В результате диффузионная культура представляет собой вязкую суспензию: концентрация углеводов в диализном мешке 6 раз выше, чем снаружи (и в 3 раза - чем в периодической культуре). Как и полисахариды клеточной оболочки, диффузионный слой

экзополисахаридов выполняет барьерную функцию между организмом и окружающей средой, в частности, связывая химически активные или труднорастворяемые вещества. В присутствии токсиантов выделение экзополисахаридов возрастает, а их качественный состав изменяется. [5].

Природные и культивируемые популяции цианобактерий по природе гетерогенны и часто включают в себя гетеротрофный компонент (бактерии, грибы, актиномицеты). Отсутствие строгой приуроченности бактерий к цианобактериальному партнеру дает возможность создавать в экспериментальных условиях сообщества микроорганизмов, не встречающиеся в природе, например лабораторные штаммы цианобактерий и аборигенные бактерии из промышленных водоемов. Использование диализных систем облегчает как выделение устойчивых штаммов из природных субстратов, так и подбор компонентов для смешанных культур. При смешанно-раздельном культивировании цианобактерии выделяют органические субстраты, которые поддерживают рост бактерий и способствуют накоплению ионов и взвесей металлов в ближайшем окружении клеток; бактерии в свою очередь обеспечивают окисление, восстановление и осаждение связанных ионов металлов. При разделении двух групп микроорганизмов полупроницаемой мембраной их взаимодействие осуществляется на уровне продуктов метаболизма, а ингибирующий эффект, связанный с межклеточными контактами отсутствует. В природных ассоциациях суммарный гетеротрофный компонент, обеспечивающий ферментное разнообразие, составляет 0,1–1%, при диализном культивировании доля бактерий – до 10–20% [5].

Для повышения эффективности очистки от взвешенных в водной среде мелких частиц пластика необходимы 1) максимальная связывающая поверхность, 2) возможность связывать достаточно крупные частицы, которые не пропускают поры диализной плёнки и 3) связывание клеток и частиц биополимерами с образованием рыхлых хлопьевидных скоплений - флокул. Показано, что в водной среде частицы микропластика легко колонизируются бактериями и захватывают различные виды загрязнителей. Эти частицы накапливаются главным образом в поверхностном слое воды, частично обнаруживаются и в донном осадке [2].

Применяемый для иммобилизации клеток материал не должен быть легко разлагаемым, чтобы клетки микроорганизмов не загрязняли водоём, но должен разлагаться при утилизации отработанного материала. Диализный мешок с цианобактериями в экспериментах разрывался под собственным весом при попытке извлечь его (более 3-7 дней очистки) или на границе водной и воздушной среды (2 недели, при фиксации мешка на стеклянной трубке для отбора проб). Первоначально для сохранения условий смешанно-раздельного культивирования, т.е. взаимодействия между культурами только на уровне метаболитов, мешок с цианобактериями укладывали на подложке, полностью погруженным в воду. В качестве подложки использовали коррозионностойкий (полистирол) материал, как в обычных дисковых фильтрах. Для создания максимальной поверхности диализный мешок укладывался петлями. В экспериментах исследуемый раствор, содержащий частицы геля (~0,5 мм) очищался за 15-60 мин на ~90%, фиксировались только отдельные частицы, основная масса их оседала на поверхности диализного мешка. При использовании фрагментов повреждённого мешка наблюдается аналогичный эффект – частицы микропластика и цианобактерии связываются высокомолекулярными полисахаридами и оседают на дно.

В экспериментах диализную культуру нитчатых цианобактерий выращивали до 2-3 недель (появление вязкой суспензии), полученную суспензию смешивали с 2% агаром [5] и после застывания протирали через ячейки 1 мм. Бактериальные ассоциации, выделенные из природных источников [5] смешивали с растворами, содержащими частицы косметического геля либо аморфные частицы пластика (< 1 мм). На 1-2 сутки наблюдалась поверхностная колонизация частиц пластика, как «округлых», сферических или аморфных частиц геля, так и «абразивных» фрагментов размолотого пластика, после чего их добавляли к цианобактериальным гранулам. Таким образом, разделение клеток цианобактерий и бактерий сохранялось, а общая связывающая поверхность возрастала

множественно.

В существующей искусственно созданной экосистеме – активном иле, – до 100 м²/г сухой массы, Гранулы, размером < 1 мм состоят из множества клеток микроорганизмов, объединенных биополимерным гелем в хорошо защищенное и организованное структурно-функциональное целое – хлопья. Как и выделенных нами ассоциациях из загрязненных местообитаний, наиболее многочисленны бактерии р. *Pseudomonas* – до 80%. В геле содержатся главным образом полисахариды (молекулярный вес 20000-1000000 и выше), основная роль в их образовании принадлежит капсульной палочковидной бактерии *Zoogloea ramigera*, близкой по свойствам к псевдомонадам [8]

Далее полученная ассоциация проверялась на средах, содержащих загрязнители смешанного состава, включая ионы металлов, эвтрофикационные загрязнители и частицы пластика. Чвстицы микропластика либо связывались на поверхности и внутри гранул, либо колонизировались бактериями на поверхности слоя гранул.

Цианобактерии – автотрофы, устойчивые к эвтрофикационным загрязнениям. Источниками энергии для очистки служат фотосинтез, а также окисление органических веществ, как вырабатываемых «на месте», так и привнесённых, для очистки достаточно естественного освещения (с учётом повышенного содержания хлорофилла в клетках диатомовой культуры), возможна и досветка.

Выводы. Проанализировано взаимодействие нитчатых цианобактерий, иммобилизованных в полупроницаемой плёнке и гранулах агара с наиболее распространёнными в городской среде токсикантами – тяжёлыми металлами, эвтрофикационными загрязнителями и частицами микропластика. Показано, что как в чистой, так и в смешанно-раздельной культуре очистка водной среды осуществляется достаточно эффективно. Наибольший эффект при очистке стоков сложного состава наблюдался при использовании смешанно-раздельной культуры цианобактерий, иммобилизованных в гранулах агара, и бактериальных ассоциаций, связанных с частицами микропластика. При данном типе культивирования соблюдаются основные условия – максимальная связывающая поверхность, повышенное количество экзополисахаридов, участвующих в связывании и обезвреживании токсикантов, сохранение смешанно-раздельного состояния культуры, обеспечивающего наиболее эффективное взаимодействие автотрофного и гетеротрофного компонента и использование способности бактерий к колонизации частиц микропластика. Данных о том, что частицы микропластика оказывают отрицательное влияние на высшие растения нет; а при очистке стоков сложного состава большая часть токсикантов обезвреживается [2]. Таким образом, осадок, содержащий флокулы и/или избыточную биомассу может использоваться для производства для городского озеленения или рекультивации свалок и карьеров.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Цианобактериальные ассоциации с гетеротрофными бактериями могут применяться при очистке воды от загрязнителей сложного состава. Наиболее эффективны смешанно-раздельные культуры, взаимодействие в которых осуществляется на уровне продуктов метаболизма, а среди них – опробованный новый тип смешанно-раздельной культуры с максимальной связывающей поверхностью.

Литература.

1. Янин Е.П. Ремедиация территорий, загрязненных химическими элементами: общие подходы, правовые аспекты, основные способы (зарубежный опыт). Проблемы окружающей среды и природные ресурсы: обзорная информация/ ВИНТИ РАН. 2014. № 3. С.3-105.
2. Eriksen, M., Lebreton, L., Carson, H., Thiel, M., Moore, C., Borro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. and Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250 000 tons afloat at sea. *PLoS ONE* 9, e111913. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0111913>

3. Hermsen E, et al. (2018). *Quality criteria for the analysis of microplastic in biota samples: a critical review*. *Environmental Science & Technology*, 52,10230–40. doi: 10.1021/acs.est.8b01611.
4. Jessica, A. Knoblauch. *Environmental Health News*. 2 July 2009 (29 January 2013) "[Biodegradable Plastics are Adding to Landfill Methane Emissions](#)" // [ecogeek.org](#), 10 June 2011 (29 January 2013)
5. Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. Диализное культивирование цианобактерий. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология*. 2008. № 2. С. 16-25.
6. Саванина Я.В., Барский Е.Л., Фомина И.А., Лобакова Е.С. 2019. Загрязнение водной среды микропластиком: воздействие на биологические объекты, очистка//ИТНОУ. № 2. С. 54-58.
7. Саванина Я.В., Барский Е.Л., Фомина И.А., Лобакова Е.С. Диализная культура цианобактерий в биомониторинге качества водной среды. *Материалы XXV Международн. конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии»*. М.: ООО «Новые информационные технологии». 2016. С. 249-261.
8. Тимакова Д.Н., Ксенофонтов Б.С. Использование активного ила в качестве биофлокулянта // *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн*. 2016. № 10(28). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/3683> (дата обращения: 16.04.2019)
9. Васильева С.Г., Лобакова Е.С., Лукьянов А.А. 2016. Применение иммобилизованных водорослей в биотехнологии // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. М.: Изд-во Моск. ун-та. № 3. С. 65-72.

Сведения об авторах

Янина Вячеславовна Саванина,
кандидат биол. наук., инж.
Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова,
биологический факультет
Москва, Россия
Эл. почта: v.savanin@gmail.com

Information about author

Yanina Viatcheslavovna Savanina
PhD, School of Biology,
M.V.Lomonosov
Moscow State University
Moscow, Russia
E-mail: v.savanin@gmail.com

ИЗМЕНЕНИЯ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ ПРИ ДВУСТОРОННИХ СДВИГАХ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ

Исследовали изменения терморегуляции при двусторонних сдвигах содержания дейтерия в организме. Установлено, что изменения содержания дейтерия в организме влияют на ежеминутные колебания температуры тела в высокочастотной области, что указывает на дисбаланс больших и малых осцилляторов термогенеза.

Ключевые слова: стабильные изотопы, дейтерий, терморегуляция, термогенез

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

CHANGES IN THERMOREGULATION AFTER BILATERAL SHIFTS IN DEUTERIUM BODY CONTENT

Changes in thermoregulation during bilateral shifts in the deuterium content in the body were investigated. It has been found that deuterium body content influences minute fluctuations in body temperature in high-frequency range indicated a misbalance of major and minor oscillators of thermogenesis.

Keywords: stable isotopes, deuterium, thermoregulation, thermogenesis

Введение.

Одним из факторов определяющим постоянство внутренней среды является стабильность температуры тела организма теплокровных животных. Эта стабильность обеспечивается достаточно сложной системой терморегуляции. [1, 2]. Терморегуляция – это система поддержания относительно постоянной внутренней температуры тела, имеющая решающее значение для выживания гомойотермных животных. В настоящее время достаточно хорошо изучена роль различных гуморальных факторов и ЦНС в поддержании температуры тела. Однако следует отметить, что существуют и другие малоизвестные факторы, контролирующие постоянство температуры тела как в течение суток, так и более коротких временных интервалах, оптимизируя тем самым стабильность течения процессов анаболизма и катаболизма и обеспечивая устойчивость организма к внешним воздействиям. Открытым остаётся вопрос о роли стабильных изотопов основных биогенных атомов, в частности дейтерия, в процессах терморегуляции. Известно, что изменение содержания дейтерия в организме влияет на параметры метаболизма, нейрохимические процессы, функциональную активность эндокринной системы, что возможно может изменять регуляцию и интенсивность термогенеза [3, 4, 5, 6, 7].

Цель работы.

Исследовать изменения терморегуляции при двусторонних сдвигах содержания дейтерия в организме.

Материалы и методы.

Эксперимент выполнен на 18 самцах мышей линии C57Bl/6 массой тела 25-28 г. Было сформировано три равных по численности группы: контрольная – получающая дистиллированную воду содержанием дейтерия 146 ppm и две опытных: первая - получающая питьевую воду с пониженным содержанием дейтерия 10 ppm (ИП Селиваненко, Россия) и вторая – с повышенным содержанием дейтерия 500000 ppm (НИЦ «Курчатовских институт» ПИЯФ). При работе с экспериментальными животными

руководствовались Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей (Страсбург, 1986 г.). Мыши находились в индивидуальных клетках при естественном освещении и комнатной температуре. Доступ к воде и пищи был не ограничен. Ежедневно учитывался объем потребляемой жидкости, который не отличался у животных контрольной и опытных групп.

Двигательную активность и температуру тела у животных измеряли с интервалом один раз в минуту с помощью датчиков ДТН4-28 («ЭМБИ Ресерч», Россия). Датчики имплантировали в брюшную полость за 2 недели до проведения эксперимента, используя в качестве анестетика золетил («Virbac Sante Animale», Франция), который вводили внутримышечно в дозе 5-7 мг/кг. Анализировали динамику температуры тела в течение 7-9 суток потребления воды с разной концентрацией дейтерия. Суммарная суточная двигательная активность определялась как сумма ежеминутных показателей датчика.

Определение интенсивности метаболизма животных определяли по объему потребляемого животным кислорода при температуре комфорта +25 °С с помощью анализатора потребления кислорода ("ЭМБИ Ресерч", Россия), представляющего собой закрытую систему [8]. Исследование проводили в вечернее время, когда животные были активны. Каждое животное тестировали в течение 30 мин. Полученные данные нормировали на массу тела мыши.

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

Полученные результаты.

Через неделю потребления тяжелой и легкой воды суточная динамика температуры ядра тела не отличалась от значений контрольной группы. Однако величина ежеминутных изменений температуры тела и средняя величина ежеминутного изменения значительно рознилась. Так она имела максимальные значения в группе, потреблявшей тяжелую воду, и минимальные – в группе, потреблявшей легкую воду (рис. 1).

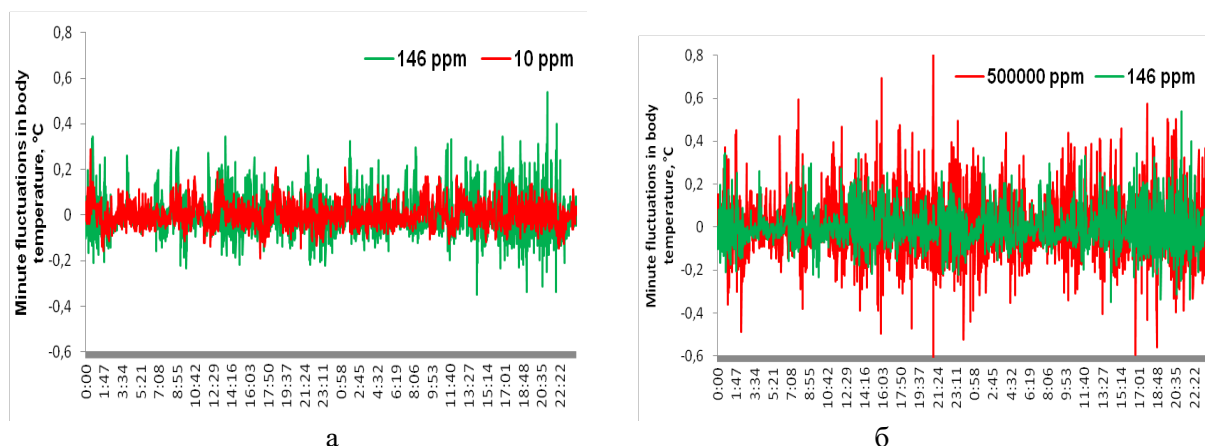


Рис. 1. Динамика ежеминутных изменений температуры ядра тела мышей потреблявших воду с пониженным (а) и с повышенным (б) содержанием дейтерия.

У мышей, потребляющих тяжелую воду, выявлено равномерное увеличение спектральной плотности по всему диапазону периодов, но в большей степени в

высокочастотной области 2-6 мин. У мышей, потребляющих воду с низким содержанием дейтерия, напротив, наибольшее снижение спектральной плотности выявлено в диапазоне 2-6 мин (рис. 2).

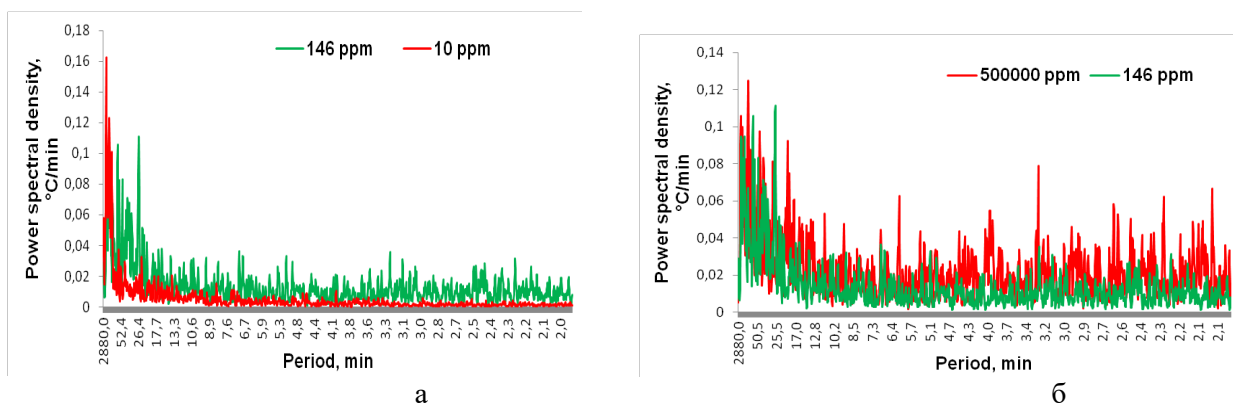


Рис.2. Спектральная плотность динамики ежеминутных изменений температуры тела мышей, потребляющих воду с пониженным (а) и повышенным (б) содержанием дейтерия по сравнению с контрольной группой.

По сравнению с контрольной группой, у мышей, получающих воду с низким содержанием дейтерия, отношение спектральной мощности колебаний температур тела в диапазоне 10-20 мин (низкочастотная область) к 2-6 мин (высокочастотная область) увеличилось, а в группе мышей, потребляющих тяжелую воду, уменьшилось.

Проведенные нами измерения объема поглощаемого кислорода, характеризующего интенсивность метаболических процессов, не выявили различий между животными, потребляющими воду как с пониженным, так и с повышенным содержанием дейтерия, и контрольной группой. Показатели суммарной двигательной активности также не имели статистически значимых отличий от контроля.

Полученные результаты указывают на то, что изменение поступления в организм дейтерия влияет на процессы терморегуляции. Происходит уменьшение диапазонов колебания температур, у животных потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, что может свидетельствовать о большей стабильности термогенеза, в отличие от животных, потреблявших тяжелую воду. При этом следует отметить, что высокочастотный диапазон ежеминутных изменений температуры тела более чувствителен к концентрации дейтерия в питьевой воде. Существует два основных механизма поддержания терморегуляции: сократительный, где продукция тепла осуществляется за счет сокращения мышц, и несократительный за счёт усиления реакций катаболизма. Участие первого механизма характеризует показатель двигательной активности, а интенсивность потребления кислорода – второго. Так как эти параметра не отличались от контрольных значений, следовательно существует другой механизм, лежащего в основе терморегуляции. Известно, что ковалентные связи, образуемые атомами протия с углеродом, менее прочны, чем дейтерия [9, 10] и уменьшение поступления диоксида дейтерия могло способствовать увеличению скорости катаболических реакций за счет более легкого разрыва связей между углеродом и протием. В научной литературе имеются данные, что в митохондриях, которые являются основным поставщиком макроэргов и тепловой энергии, происходит понижение содержания оксида дейтерия в цикле трикарбоновых кислот и цепи переноса электронов и что изменение содержания дейтерия влияет на функционирование дыхательной цепи [11, 12]. Следовательно, изменяя поступление в организм оксида дейтерия мы можем влиять на параметры биологического окисления. Учитывая, что колебания температуры тела в диапазоне 2-20 мин отражают баланс активности симпатического и парасимпатического звеньев вегетативной нервной системы [13], то их изменения можно трактовать и как перестройку регуляторных механизмов в нервной системе. Возможно, что изменение содержания дейтерия в организме также изменяет синтез гуморальных факторов, влияющих на термогенез,

например, гормонов, что требует дальнейших исследований. В наших предыдущих исследованиях было показано, что кратковременное потребление воды с пониженным содержанием дейтерия изменяет гормоногенез в щитовидной железе мышей и крыс, постепенно снижая ее активность [6, 14], что может иметь значение для колебания температуры в небольших временных диапазонах.

Выводы.

Изменения температурных колебаний, вызванные потреблением воды с повышенным и пониженным содержанием дейтерия, были противоположными, что указывает на зависимость терморегуляции от содержания дейтерия в организме. Наличие зависимости размаха ежеминутных изменений температуры тела и ее спектральной мощности от концентрации дейтерия, получаемой животными с водой, позволяет предположить, что повышение содержания оксида дейтерия приводит к нестабильности в низших звеньях иерархии терморегуляции. Также вероятно, что различная скорость транспорта изотопов водорода через мембранные каналы может изменять функционирование термочувствительных нейронов. Это может приводить к сдвигу в функциональном балансе больших и малых осцилляторов в сторону последних и объяснять изменение амплитуды ежеминутных колебаний изменениями генерации тепла в клетках за счет дисбаланса синтеза и расщепления макроэргов, не зависящей от центральной нервной системы.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: содержание дейтерия в организме влияет на некоторые параметры терморегуляции за счет сдвигов в балансе осцилляторов термогенеза.

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

Литература

1. Romanovsky A.A. *Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system* // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007. V. 292. P. R37-46. doi: 10.1152/ajpregu.00668.2006
2. Tansey E.A., Johnson C.D. *Recent advances in thermoregulation* // *Adv. Physiol. Educ.* 2015. V. 39. P. 139-148. doi: 10.1152/advan.00126.2014
3. Landowne D. *Heavy water (D2O) alters the sodium channel gating current in squid giant axons* // *Biol. Bull.* 2000. V. 199. P. 164-165. DOI: 10.2307/1542877
4. Лисицын А.Б., Барышев М.Г., Басов А.А., Барышева Е.В., Быков И.М., Дыдыкин А.С., Текуцкая Е.Е., Тимаков А.А., Федулова Л.В., Чернуха И.М., Джимаков С.С. *Воздействие воды со сниженным содержанием дейтерия на организм лабораторных животных при различном функциональном состоянии неспецифических защитных систем* // *Биофизика.* 2014. Т.95. №4. С. 757-765.
5. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V. *Time-dependent effect of deuterium depletion on tumor growth and metastasis* // *Russian Open Medical Journal.* 2020. Vol. 9. e0210. doi: 10.15275/rusomj.2020.0210
6. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В. *Реакция гипофизарно-тиреоидной оси на кратковременное изменение содержания дейтерия в организме* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2021. Т. 171. №2. С. 232-234.
7. Zhang X., Wang J., Zubarev R.A. *Slight Deuterium Enrichment in Water Acts as an Antioxidant: Is Deuterium a Cell Growth Regulator?* // *Mol. Cell. Proteomics.* 2020. Vol. 19. N. 11. P. 1790-1804. doi: 10.1074/mcp.RA120.002231.

8. Поликарпов И.А., Кондратюк Е.Ю., Петровский Д.В., Новиков Е.А. Межпопуляционная изменчивость эндокринно-метаболической реакции на холодовой стресс у красной полевки (*Myodes rutilus*) // Журнал общей биологии. 2016. Т. 77. № 4. С. 284-292.
9. Zuev P.S. Carbon tunneling from a single quantum state. *Science*. 2003. V. 299. P. 867–870.
10. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Obernikhin S.S., Yaglov V.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, 24(4), 3107.
11. Basov A, Fedulova L, Vasilevskaya E, Dzhimak S. Possible Mechanisms of Biological Effects Observed in Living Systems during 2H/1H Isotope Fractionation and Deuterium Interactions with Other Biogenic Isotopes // *Molecules*. 2019. V.24. N. 22. 4101. doi: 10.3390/molecules24224101.
12. Лобышева Н.В., Несеров С.В., Скоробогатова Ю.А., Лобышев В.И. Функциональная активность митохондрий в водной среде с уменьшенным содержанием дейтерия // *Биофизика*. 2020. Т.65. №2. С.315-319.
13. Braulke L.J., Heldmaier G. Torpor and ultradian rhythms require an intact signaling of the sympathetic nervous system // *Cryobiology*. 2010. V. 60. N.2. P. 198-203. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.11.001
14. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Яглов В.В., Назимова С.В. Изменения секреторных процессов в щитовидной железе и гипофизе при постепенном уменьшении содержания дейтерия в организме // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022. Т. 174. № 12. С. 776-779.

Сведения об авторах

Information about author

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

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

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

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

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

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

УДК 612.111.11:577.033
 ГРНТИ 76.03.31
 DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.30-35

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

ВЛИЯНИЕ УМЕНЬШЕНИЯ УРОВНЯ ДЕЙТЕРИЯ В ОРГАНИЗМЕ НА СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ

В статье приведены данные о влиянии снижения дейтерия во внутренней среде организма на процесс синтеза гемоглобина в эритроцитах крыс. Установлено, что через 1,5 месяца у крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия,

происходит повышение концентрации гемоглобина, а также увеличение средней концентрации гемоглобина в эритроците.

Ключевые слова: дейтерий, эритроциты, гемоглобин

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

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

EFFECT OF DEUTERIUM REDUCTION IN BODY CONTENT ON CONCENTRATION OF HEMOGLOBIN IN ERYTHROCYTES

The article represents novel data on effects of deuterium reduction in body content on synthesis of hemoglobin in erythrocytes. Consumption of deuterated water during 1.5 months resulted in increased concentration of hemoglobin and mean concentration of hemoglobin in erythrocytes.

Key words: deuterium, erythrocyte, hemoglobin

Введение.

Анемия является наиболее распространенным заболеванием крови, затрагивающим около трети населения планеты [1]. По распространенности среди анемий одно из ведущих мест занимают гипохромные анемии – железодефицитная анемия и анемия хронических заболеваний [2]. Большое разнообразие факторов, лежащих в основе развития анемий, делает важной проблему поиска оптимального лечения исходя из причин возникновения заболевания. Железодефицитная анемия обычно компенсируется приемом препаратов железа и витаминов, однако восстановление оптимального уровня эритроцитов при анемии хронических заболеваний, особенно вызванных обширной лучевой терапией, химиотерапией и другими противоопухолевыми препаратами, является на данный момент сложным процессом, имеющим значительное число побочных эффектов [3]. Таким образом, поиск и применение альтернативных, нефармакологических регуляторов эритропоэза является весьма актуальным направлением в научных исследованиях.

Имеются данные, что с изменением содержания дейтерия в организме соответственно изменяется скорость биологических реакций: скорость процессов транскрипции и трансляции, репарационные процессы ДНК, каскадные реакции дыхательной цепи митохондрий, биосинтез [4, 5]. Адаптация клеток к пониженным концентрациям дейтерия в среде может способствовать увеличению функциональной активности различных систем клетки, связанных с изменением траффика ионов дейтерия и, протия, и последующей активацией системы ДНК-репарации. Вода с пониженным содержанием дейтерия активирует репаративные системы здоровых клеток, тем самым предотвращая их апоптоз [6, 7, 8, 9]. Многочисленные исследования основаны, в первую очередь на способности воды с пониженной концентрацией дейтерия избирательно воздействовать на опухолевые клетки, в том числе благодаря своей способности регулировать активность ключевых генов в клеточном цикле [10]. Однако, роль изотопов дейтерия в регуляции численности здоровых клеточных популяций в организме изучена в меньшей степени, отсутствуют работы по изучению влияния снижения уровня дейтерия во внутренней среде организма на процесс эритропоэза и концентрацию гемоглобина.

Цель работы.

Изучение влияния снижения дейтерия во внутренней среде организма на процесс синтеза гемоглобина в эритроцитах крыс при длительном потреблении воды с пониженным содержанием дейтерия.

Материалы и методы.

Эксперимент выполнен на половозрелых самцах крыс Вистар (n=6) массой тела 340-370 г. Животных контрольной группы потребляли питьевую воду с содержанием дейтерия [D]=146 ppm ad libitum, что соответствует его содержанию в водопроводной воде. Опытная группа потребляла воду с пониженным содержанием дейтерия [D]=10 ppm. Учитывали количество потреблённой крысами жидкости, рассчитывали объёмы потреблённой жидкости на 100 г массы тела.

Животных выводили из эксперимента через 1,5 месяца передозировкой золетила. В крови с помощью гематологического анализатора Mindray BC-2800 Vet (Китай) определяли количество эритроцитов, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците и концентрацию гемоглобина.

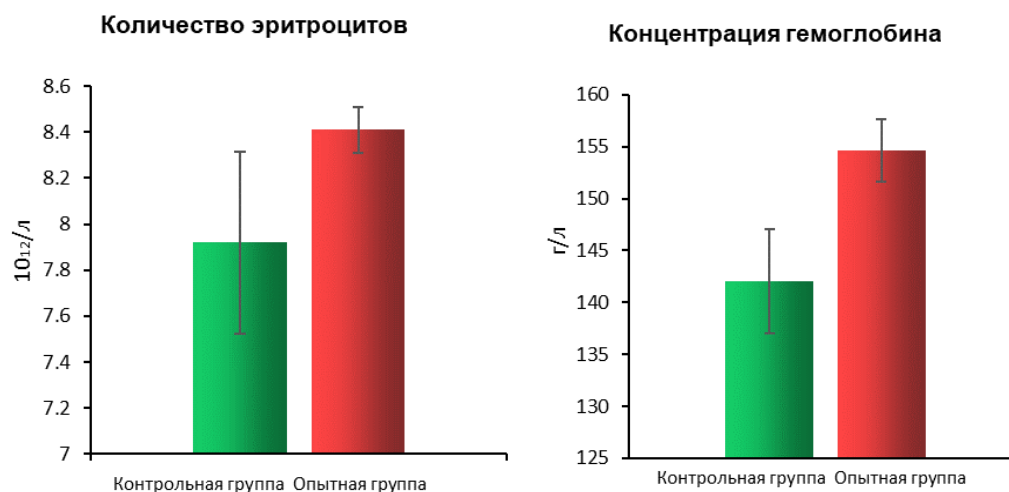
Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.). Количественные данные, имеющие приближённо нормальное распределение, описывали средним значением. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Полученные результаты.

Масса тела животных опытной и контрольной групп не отличалась. У крыс контрольной группы количество эритроцитов, концентрация гемоглобина и средняя концентрация гемоглобина в эритроците соответствовала нормальным значениям для животных этого возраста [11].

Через 1,5 месяца после начала эксперимента у крыс, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, было выявлено статистически значимое повышение концентрации гемоглобина, а также увеличение средней концентрации гемоглобина в эритроците (рис. 1). При этом, количество эритроцитов увеличилось незначительно.

Проведенное исследование показало, что длительное потребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводит к усилению накопления гемоглобина в эритроцитах, следствием которого стало увеличение концентрации гемоглобина в крови здоровых крыс. Известно, что синтез гемоглобина продолжается в эритроците на протяжении всего его раннего развития от проэритробласта до ретикулоцита в костном мозге. После потери ядра, остаточная рибосомная РНК обеспечивает дальнейший синтез гемоглобина до тех пор, пока ретикулоцит не потеряет свою РНК вскоре после попадания в сосудистую сеть. Концентрация гемоглобина в зрелом эритроците остается неизменной на протяжении всего его жизненного цикла [12]. Таким образом, потребление воды с пониженным содержанием дейтерия в течение 1,5 месяцев способствует ускорению синтеза гемоглобина в предшественниках эритроцитов. При этом не было отмечено ускорения процесса эритропоэза, что выразилось в отсутствии изменений в количестве эритроцитов у контрольной и опытной групп.



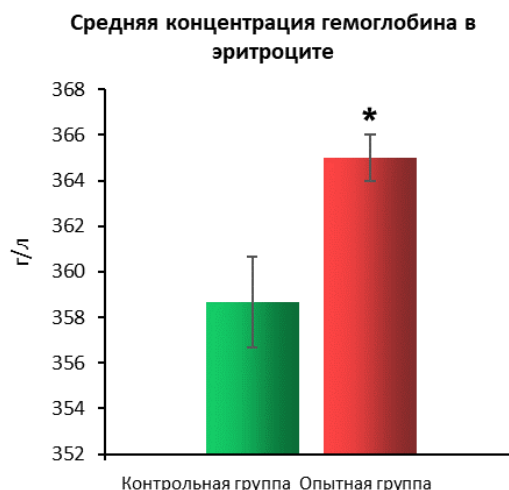


Рисунок 1. Изменения количества эритроцитов, концентрации гемоглобина и средней концентрации гемоглобина в эритроците через 6 недель потребления воды с пониженным содержанием дейтерия ($M \pm m$).

В научной литературе имеются данные, что содержание дейтерия во внутренней среде организма приводит к большому разнообразию морфологических и физиологических изменений, включая изменения в фундаментальных процессах, таких как клеточное деление или энергетический обмен. [13, 14]. Также отмечается, что адаптация клеток к пониженным концентрациям дейтерия может способствовать увеличению их функциональной активности [6, 15]. Данные факты позволяют предположить, что более длительное потребление воды с пониженным содержанием дейтерия, могут способствовать ускорению процесса эритропоэза, поэтому актуальны дальнейшие исследования более длительных сроков воздействия.

Выводы.

Длительное потребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводит к значительному снижению его во внутренней среде организма и способствует ускорению синтеза гемоглобина в предшественниках эритроцитов.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Понижение содержания дейтерия в организме способствует усилению синтеза гемоглобина и повышению его содержания в эритроцитах.

Работа выполнена по госзаданию № FGFZ-2022-0035.

Литература.

1. Janz T., Johnson R., Rubenstein S. Anemia in the emergency department: evaluation and treatment // *Emergency Medicine Practice*. 2013. V. 15. N. 11. P. 1–15.
2. Клочкова-Абельяну С.А., Суржикова Г.С. Железодефицитная анемия и анемия хронических заболеваний: некоторые аспекты патогенеза и перспективы дифференциальной диагностики // *Медицина в Кузбассе*. 2019. Т. 18. № 3. С. 25–28.
3. Снеговой А.В., Аарго М., Гладков О.А., Кононенко И.Б., Конн М.В., Королева И.А., Ларионова В.Б., Моисеенко В.М., Поддубная И.В., Птушкин В.В., Чернов В.М. Практические рекомендации по лечению анемии у онкологических больных // *Злокачественные опухоли*. 2016. № 4. Спецвыпуск 2. С. 368–377. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-4s2-368-377
4. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Obernikhin S.S., Yaglov V.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. V. 24. 3107. doi: 10.3390/ijms24043107;

5. Kolesova O.E., Pomytkin I.A. Relationship between natural concentration of heavy water isotopologs and rate of H₂O₂ generation by mitochondria // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2006. V. 142. N. 5. P. 570–572. doi: 10.1007/s10517-006-0420-9;
6. Текуцкая Е.Е., Барышева Е.В., Каде А.Х. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на состояние ДНК лимфоцитов человека в норме и патологии // *Современные проблемы науки и образования*. 2014. № 6. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=15441> (дата обращения: 03.04.2023)
7. Yavari K., Kooshesh L. Deuterium Depleted Water Inhibits the Proliferation of Human MCF7 Breast Cancer Cell Lines by Inducing Cell Cycle Arrest // *Nutr. Cancer*. 2019. V. 71. N. 6. P. 1019-1029. doi: 10.1080/01635581.2019.1595048
8. Gyöngyi Z., Budán F., Szabó I., Ember I., Kiss I., Krempels K., Somlyai I., Somlyai G. Deuterium depleted water effects on survival of lung cancer patients and expression of *Kras*, *Bcl2*, and *Myc* genes in mouse lung // *Nutr. Cancer*. 2013. V. 65. N. 2. P. 240-246. doi: 10.1080/01635581.2013.756533
9. Hassanzade A., Mandegary A., Sharif E., Rasooli R., Mohammadnejad R., Masoumi-Ardekani Y. Cyclooxygenase inhibitors combined with deuterium-enriched water augment cytotoxicity in A549 lung cancer cell line via activation of apoptosis and MAPK pathways // *Iran. J. Basic Med. Sci*. 2018. V. 21. N. 5. P. 508-516. doi: 10.22038/IJBMS.2018.25366.6269
10. Wang H., Zhu B., Liu C., Fang W., Yang H. Deuterium-depleted water selectively inhibits nasopharyngeal carcinoma cell proliferation in vitro // *Nan fang yi ke da xue xue bao J. South. Med. Univ*. 2012. V. 32. P. 1394–1399
11. Мустафина О.К., Трушина Э.Н., Шумакова А.А., Арианова Е.А., Тышко Н.В., Пашорина В.А. Гематологические показатели у крыс вистар разного возраста, содержащихся на полусинтетическом полноценном виварном рационе // *Вопросы питания*. 2013. Т. 82. № 2. С. 10-16.
12. Kafina M.D., Paw B.H. Intracellular iron and heme trafficking and metabolism in developing erythroblasts // *Metallomics*. 2017. V. 9. N. 9. P. 1193-1203. doi: 10.1039/c7mt00103g
13. Ehleringer J.R., Rundel P.W., Nagy K.A. Stable isotopes in physiological ecology and food web research // *Trends Ecol. Evol*. 1986. V. 1. N. 2. P. 42-45. doi: 10.1016/0169-5347(86)90072-8
14. Syroeshkin A.V., Antipova N.V., Zlatska A.V., Zlatskiy I.A., Skylska M.D., Grebennikova T.V., Goncharuk V.V. The effect of the deuterium depleted water on the biological activity of the eukaryotic cells // *J. Trace Elem. Med. Biol*. 2018. V. 50. P. 629-633.
15. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Яглов В.В. Реактивные изменения лимфоцитопоза в тимусе при кратковременном уменьшении содержания дейтерия в организме // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022. Т. 173. №4. С.508-511. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-173-4-508-511

Сведения об авторах

Information about author

Екатерина Петровна Тимохина

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

Ekaterina Petrovna Timokhina

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

Наталья Валентиновна Яглова

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

Nataliya Valentinovna Yaglova

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

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

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

УДК 591.128.3:57.034
ГРНТИ 76.03.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.35-39

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

ДЕЙТЕРИЙ: РЕГУЛЯТОР ИЛИ ДИСРАПТОР ТИРЕОИДНОЙ ФУНКЦИИ?

В статье обсуждаются новые данные о влиянии сдвигов в содержании дейтерия в организме на функционирование эндокринных желез. Приводятся результаты исследований об изменениях продукции гормонов щитовидной железой и тиреотропного гормона гипофизом при повышении содержания дейтерия в организме. По данным исследования эндокринные железы являются чувствительными к изменению содержания дейтерия в организме. Выявленные изменения рассматриваются с точки зрения регуляторного и дисрегуляторного аспектов действия изотопа водорода на гормоногенез.

Ключевые слова: дейтерий, эндокринные дисрапторы, щитовидная железа, гипофиз

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

DEUTERIUM: REGULATOR OR DISRUPTOR OF THYROID FUNCTION?

The article discusses novel data on impact of altered deuterium body content on endocrine function. The paper represents the results of investigation of thyroid hormones and pituitary thyroid stimulating hormone production during gradual increase of deuterium body content. The research revealed sensitivity of the endocrine glands to changes in deuterium content. The revealed findings are considered from the point of view of the regulatory and dysregulatory aspects of action of the hydrogen isotope on hormone genesis.

Key words: deuterium, endocrine disruptors, thyroid gland, pituitary gland

Введение.

К эндокринным дисрапторам относят вещества способные нарушать синтез, выделение, транспорт гормонов, их взаимодействие с клетками-мишенями, активацию гормональных сигналов и развитие самих желез [1]. Эндокринные дисрапторы представлены как органическими, так и неорганическими соединениями, но большую часть дисрапторов составляют именно органические низкомолекулярные соединения антропогенного происхождения. К эндокринным дисрапторам, нарушающим тиреоидную функцию, относят полихлорированные дифенилы, полибромидные дифениловые эфиры, бисфенол А, фталаты, различные пестициды, из которых наиболее распространенным в экосистемах является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) [2]. Среди неорганических соединений дисрапторными свойствами по отношению к щитовидной железе обладают перхлораты и тиоцианаты. Наименее изученным вопросом является способность изотопов, в первую очередь стабильных, биогенных атомов влиять на функционирование эндокринных желез. Среди таких изотопов самым распространенным в

организме является изотоп водорода дейтерий [3]. Его содержание в несколько раз превышает таковое основных макроэлементов. В научной литературе имеются сведения о влиянии различных концентраций дейтерия на пролиферацию и апоптоз клеток, процессы синтеза и распада веществ, структуру клеток [4,5,6,7,8]. Влияние дейтерия на функционирование органов и систем менее изучено. Большой интерес представляет изучение влияния дейтерия на секреторный процесс в клетках и определение роли дейтерия в функционировании эндокринных желез.

Цель работы.

Изучить изменения продукции гормонов щитовидной железой и их механизмы, а также регуляторную функцию гипофиза при повышении содержания дейтерия в организме.

Материалы и методы.

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс Вистар. Животные экспериментальной группы потребляли 50% D₂O, контрольной группы – дистиллированную водопроводную воду с содержанием дейтерия 0,146 ‰. Производили динамическое определение массы тела и объема потребляемой жидкости, концентраций тиреоидных гормонов общего и свободного Т₄ (сТ₄), общего и свободного Т₃ (сТ₃), а также тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (“Cusabio”, Китай) с 1-ых по 21-ые сутки эксперимента. Также изучали динамику концентрации натрий-йодного симпортера в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (“Cusabio”, Китай).

Статистическую обработку данных исследования проводили с помощью программы «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Полученные результаты.

Поскольку в эксперименте использовались молодые животные, у крыс контрольной группы было выявлено увеличение массы тела к 21-м суткам эксперимента. У крыс, потреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия, отмечался меньший прирост массы, которая на 21-е сутки была статистически значимо меньшей, чем у крыс контрольной группы.

Через 24 часа после начала потребления крысами 50% D₂O у крыс отмечалось усиление продукции тироксина и закономерное снижение секреции тиреотропного гормона. В течение двух последующих суток концентрация тиреоидных гормонов в системном кровотоке продолжала увеличиваться, а к 7-м суткам было отмечено уменьшение уровня тиреоидных гормонов до значений контрольной группы. Однако уровень тиреотропного гормона не повышался в ответ на снижение продукции гормонов щитовидной железой. На 14-е сутки выявлено статистически значимое уменьшение концентрации всех тиреоидных гормонов и тиреотропного гормона. К 21-м суткам продукция гормонов щитовидной железой восстановилась, а также и функционирование обратной связи в оси гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа, что проявлялось снижением секреции тиреотропного гормона в ответ на повышение продукции тиреоидных гормонов.

Проведенное изучение уровня основного транспортера йода натрий-йодного симпортера показало, что его концентрация постепенно увеличивалась с 1 по 21 сутки и не коррелировала ни с изменениями уровня Т₃ и Т₄, а также ТТГ, являющегося основным регулятором его синтеза (рис. 1).

Наблюдаемые изменения указывали на чувствительность обеих эндокринных желез к содержанию дейтерия. Она была более высокой у щитовидной железы, нежели у

гипоталамо-гипофизарного комплекса. Увеличение содержания дейтерия во внутренней среде организма в первые трое суток оказывало стимулирующее воздействие на секреторные процессы в щитовидной железе, а затем приводило к снижению секреции тиреотропного гормона гипофизом и развитию транзиторного гипотиреоза. Но нормализация продукции гормонов щитовидной железы и гипофизарного контроля к 21-м суткам свидетельствовала о том, что даже столь выраженное дейтерирование, в том числе тканей не ингибирует синтез гормонов в ней. Определение свободных форм тиреоидных гормонов показало, что в процессе повышения содержания дейтерия в организме их концентрации становятся менее вариабельными по сравнению с контролем. Это свидетельствует о сохранении, как уровня продукции, так и связывающей способности белков, осуществляющих транспорт тиреоидных гормонов в системном кровотоке, при сдвиге баланса дейтерия/протия в организме.

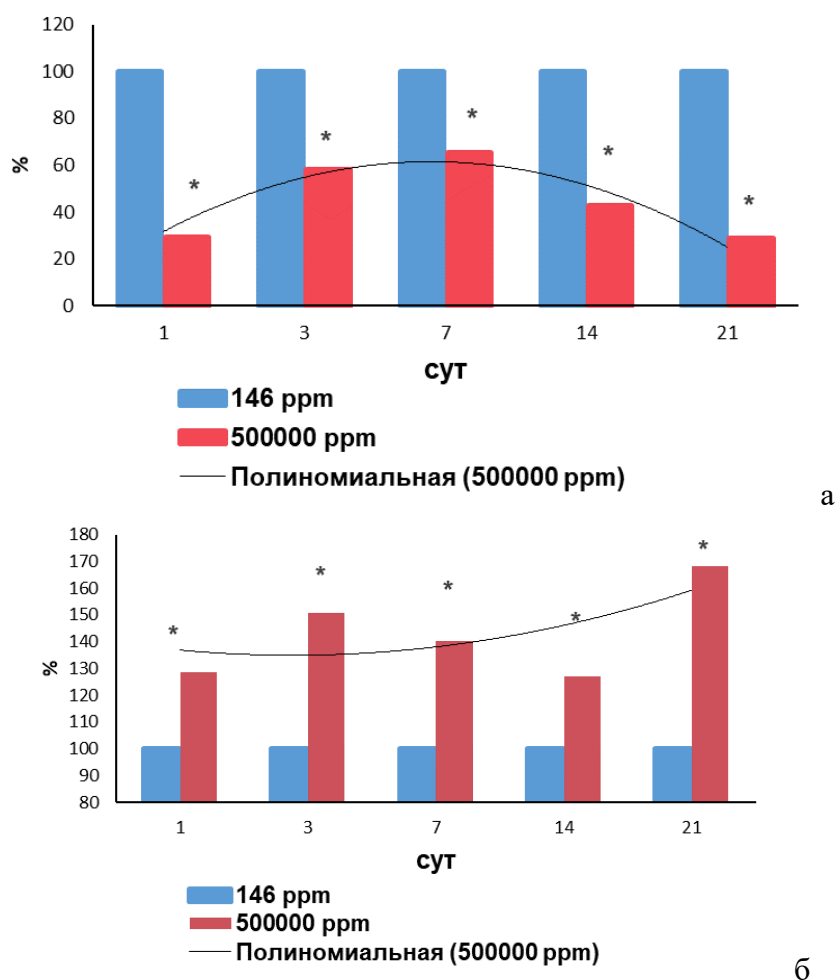


Рис. 1. Относительные изменения концентрации натрий-йодного симпортера (а) и ТТГ (б) в сыворотке крови крыс при повышении поступления дейтерия в организме. Значения контрольной группы приняты за 100%. * – статистически значимые отличия от контроля.

Полученные данные о явно стимулирующем действии дейтерия на синтез гормонов в щитовидной железе вызывают закономерный вопрос о механизмах этого явления. Одним из ключевых моментов секреторного цикла фолликулярных тироцитов является поступление йода. Основным транспортером йода в клетки является натрий-йодный симпортер – белок, формирующий ионный канал в мембранах тироцитов. В случае недостаточного поступления йода синтез натрий-йодного симпортера усиливается. Основным стимулом его синтеза является тиреотропный гормон. Настоящее исследование показало, что повышение продукции тиреоидных гормонов не связано с увеличением синтеза натрий-йодного симпортера. Второй важной особенностью являлось повышение уровня натрий-йодного симпортера при длительно снижающемся уровне

тиреотропного гормона. Механизмы этого повышения не понятны и указывают на определенную роль дейтерия в регуляции формирования ионных каналов мембран, что требует дальнейших исследований.

Выводы.

Дейтерий является стимулятором функциональной активности щитовидной железы. Повышение его содержания вызывает транзиторное функциональное нарушение гипоталамического контроля, но не влияет на обратную связь в оси гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа. Однако, он нарушает регуляцию синтеза йодного транспортера, что вероятно, можно рассматривать как механизм стимулирующего действия дейтерия на синтез тиреоидных гормонов, но отсутствие связи между продукцией Т4 и Т3 и натрий-йодного симпортера и взаимосвязь уровня тиреоидных гормонов с тиреотропным гормоном гипофиза указывает на наличие дополнительных факторов, которые разобщают связь тиреотропного гормона и натрий-йодного симпортера.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Щитовидная железа демонстрирует высокую чувствительность к повышению содержания дейтерия и увеличивает интенсивность гормоногенеза в отличие от тиротропоцитов гипофиза, которые реагируют позже и снижают свою секреторную активность в процессе дейтерирования организма. Продукция натрий-йодного симпортера увеличивается независимо от уровня тиреотропного гормона, что позволяет рассматривать дейтерий как потенциальный дисраптор эндокринной системы.

Работа выполнена по государственному заданию рег. номер FGFZ-2022-0035.

Литература.

1. La Merrill M.A., Vandenberg L.N., Smith M.T., Goodson W., Browne P., Patisaul H.B., Guyton K.Z., Kortenkamp A., Cogliano V.J., Woodruff T.J., Rieswijk L., Sone H., Korach K.S., Gore A.C. Zeise L., Zoeller R.T. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2020. V. 18. P. 45–57. Doi: 10.1038/s41574-019-0273-8
2. Mansouri A., Cregut M., Abbes C., Durand M.-J., Landoulsi A., Thouand G. The environmental issues of DDT pollution and bioremediation: a multidisciplinary review // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017. V. 181. P. 309–339. Doi: 10.1007/s12010-016-2214-5
3. Yaglova N.V., Timokhina E.P., Obernikhin S.S., Yaglov V.V. Emerging Role of Deuterium/Protium Disbalance in Cell Cycle and Apoptosis // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24, 3107. Doi: 10.3390/ijms24043107
4. Cong F., Zhang Y., Sheng H., Ao Z., Zhang S., Wang J. Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis // *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2010. V. 1. P. 277-283. doi: 10.3892/etm_00000043 19.
5. Джимаков С.С., Барышев М.Г., Басов А.А., Тимаков А.А. Влияние воды со сниженным содержанием дейтерия на изотопный состав лиофилизированных тканей и морфофункциональные показатели организма у крыс из разных поколений // *Биофизика.* 2014. Т. 59. №4. С. 749-756.
6. Basov A., Fedulova L., Vasilevskaya E., Dzhimak S. Possible Mechanisms of Biological Effects Observed in Living Systems during 2H/1H Isotope Fractionation and Deuterium Interactions with Other Biogenic Isotopes // *Molecules.* 2019. V. 24. 4101. doi: 10.3390/molecules24224101.
7. Косенков А.В., Лобышев В.И., Гуляев М.В., Юсубалиева Г.М., Баклаушев В.П. Обратимое дейтерирование тканевой жидкости и биополимеров в нормальных и опухолевых тканях мышей // *Биофизика.* 2018. Т. 63, №5. С. 1021-1026.
8. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Тимохина Е.П., Диатроптова М.А., Диатроптов М.Е., Яглов В.В. Влияние уменьшения поступления дейтерия в организм на процессы

Сведения об авторах

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

Эл. почта: yaglova@mail.ru

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

Эл. почта: ober@mail.ru

Валентин Васильевич Яглов
доктор мед. наук, профессор, главный
научный сотрудник,
НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Ав-
цына ФГБНУ «РНЦХ им. ак. Б.В. Петров-
ского»
Москва, Россия

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

Information about author

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

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

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

К ВОПРОСУ О ФОРМИРОВАНИИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ У БОЛЬНЫХ С COVID-19

Статья посвящена изучению динамики изменений биохимических показателей сыворотки крови на фоне формирования анемии, ассоциированной с COVID-19. Данные исследования помогают определить механизм формирования анемии после перенесения COVID-19 и назначить терапию для дальнейшего ее лечения.

Ключевые слова: ферритин, гемоглобин, сывороточное железо, СРБ, эритроциты, анемия, COVID-19

M. L. Zolotavina, E.A. Gaidabura
Kuban State University

ON THE ISSUE OF THE FORMATION OF IRON DEFICIENCY ANEMIA IN PATIENTS WHO HAVE UNDERGONE COVID-19

The article is devoted to the study of the dynamics of changes in biochemical parameters of blood serum against the background of the formation of anemia associated with COVID-19. These studies help to determine the mechanism of anemia formation after COVID-19 and prescribe therapy for its further treatment.

Keywords: ferritin, hemoglobin, serum iron, CRP, erythrocytes, anemia, COVID-19

Введение

По данным ВОЗ в последние годы у более 35% населения наблюдается недостаток концентрации ионов железа в крови. Такой высокий процент развития и хронизации процесса анемии может быть вызван пандемией COVID-19. Изучение последствий влияния новой коронавирусной инфекции на клетки и организм человека: процесс формирования «постковидной» анемии – остается актуальной проблемой [1].

Новая коронавирусная инфекция является полиорганным заболеванием, затрагивающим различные системы организма и вызывающим изменения метаболизма в организме в целом. По мнению некоторых исследователей [2] эта связь объясняется тем, что вирус SARS-COV-2 содержит белки, способные при взаимодействии с эритроцитами. Что легло в основу исследования – изучение динамики биохимических показателей в сыворотке крови в оценке изменения обмена железа в процессе формирования анемии, ассоциированной с COVID-19.

Материалы и методы

Исследовательская работа проводилась в клинико-диагностических лабораториях ГБУЗ «НИИ-Краевая больница № 1 им. С.В. Очаповского» и ООО «Современные диагностические технологии» с использованием спектрофотометрических и гематологических методов исследования. В качестве исследуемых показателей были выбраны биомаркеры воспаления сыворотки крови ферритин и СРБ и гематологические показатели для оценки возможных механизмов развития анемии – сывороточное железо, гемоглобин, количество и особенности структуры эритроцитов. В качестве биологического материала использовалась 227 сывороток крови больных в возрасте от 45 до 68 лет страдающих (группа БЭ – 108 человек) или перенесших COVID-19 (группа ПЭ – 30 человек, обратившиеся за лечением через 6-9 месяцев после выздоровления) (возрастная категория была выбрана с учетом наиболее подверженной заболеванию и осложнениям группы людей), образовавшие экспериментальные и контрольные группы. Экспериментальные группы исследования были разделены по принадлежности к полу (56

Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

сывороток крови принадлежали мужчинам, образовав группу БЭМ и 52 сыворотки крови женщин больных COVID-19 – группа БЭЖ) и 15 сывороток крови мужчин (группа ПЭМ) и

15 сывороток крови женщин, недавно перенесших COVID-19 (группа ПЭЖ). В качестве группы контроля нами была выбрана сыворотка крови 89 относительно здоровых людей (46 сыворотки крови мужчин – группа КМ, 43 сыворотки крови женщин – группа КЖ). Статистическая обработка данных проводилась с применением пакета прикладных программ «STATISTICA» и «Microsoft Excel 2013».

Полученные результаты.

В результате исследования были определены концентрации основных маркеров воспаления, показатели и критерии форменных элементов крови в процессе лечения COVID-19 и в «постковидном» этапе.

Ряд исследователей указывали на низкий уровень ферритина в крови больных с диагнозом COVID-19, однако в ходе исследования мы наблюдали высокие концентрации ферритина в период поражения организма вирусом SARS-COV-2 [3]. Концентрация ферритина превышала референсные значения более, чем в 5 раз, что связано с тем, что ферритин является белком острой фазы. При внедрении в организм вируса новой коронавирусной инфекции в крови группы больных БЭМ уровень концентрации достигал

Показатель /группы исследования	Экспериментальные группы				Контрольные группы	
	Во время течения COVID-19		После COVID-19		мужчин КМ (n=46)	женщин КЖ (n=43)
	мужчин БЭМ (n=56)	женщин БЭЖ (n=52)	мужчин ПЭМ (n=15)	женщин ПЭЖ (n=15)		
Ферритин (мкг/л)	**# ^{oo} >>	**# ^{oo} >>	**#	**#	oo	oo
Железо сыв. (мкмоль/л)	##		**## <	** <	**	**
Гемоглобин (г/л)	##	##	## ^{oo} <	## ^{oo} <	oo	oo
СРБ (мг/л)	# ^{oo} >>	# ^{oo} >>	#	# ^o >	oo	oo
Эритроциты (×10 ¹² в 1 л)	!!	##<		##	oo	

значений в 812,0±0,23 мкг/л, а в крови группы больных БЭЖ оказывался ниже и составлял 778,0±0,51 мкг/л (p≤0,05) (таблица 1).

Примечания: КМ/КЖ – контрольная группа мужчин/женщин, БЭМ/БЭЖ – группа болеющих мужчин/женщин, ПЭМ/ПЭЖ – группа мужчин/женщин с «постковидным» синдромом;

** p≤0,01, ** p≤0,05 – уровень значимости различий между показателями экспериментальных групп мужчин и женщин; #p≤0,01, ##p≤0,05 – уровень значимости различий между показателями экспериментальных групп БЭМ и ПЭМ (БЭЖ и ПЭЖ);*

^op≤0,01, ^{oo}p≤0,05 – уровень значимости различий между показателями экспериментальными группами и экспериментальными;

< – значения находятся на нижней границе референсных значений или меньше в 2-4 раза; > – значения в 2-15 раз превышают референсные значения; >> – значения более чем в 15 раз превышают референсные значения

Таблица 1 – Динамика изменений биохимических показателей крови у больных с диагнозом COVID-19 и после перенесенного заболевания COVID-19

При этом, следует отметить, уровень сывороточного железа в крови во время течения заболевания COVID-19 оставался в пределах референсных значений, что не может влиять на увеличение концентрации ферритина за счет перенасыщения железом.

Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

Соответственно, нарушения обмена железа в «постковидный» период в сыворотке крови больных групп ПЭМ и ПЭЖ не связано с процессом гиперферритинемии, развивающейся при COVID-19 [4]. В крови группы БЭМ концентрация сывороточного железа оказалась равна $27,2 \pm 0,31$ мкмоль/л и в крови группы БЭЖ – $21,5 \pm 0,22$ мкмоль/л.

При этом между показателями этих групп исследования была выявлена значимость различий ($p \leq 0,05$), что вероятнее всего, было связано с физиологически более высоким уровнем железа в крови мужчин. Снижение концентрации железа отмечалось в период выздоровления. В сыворотке крови группы ПЭМ уровень показателя в крови был значительно понижен, чем в крови группы ПЭЖ, и не превышал $11,41 \pm 0,23$ мкмоль/л.

Изменения концентрации гемоглобина в процессе исследования имели тенденцию к понижению в сыворотке крови экспериментальных групп, перенесших недавно новую коронавирусную инфекцию. Так, уровень гемоглобина снижался до показателей $99,23 \pm 0,30$ г/л, что ниже нижней границы референсных значений в 1,54 раза в крови исследуемой контрольной группы ($p \leq 0,05$). Подобные события указывали на вероятное разрушение гемоглобина в результате развития в организме во время заболевания мощной иммунной реакции, запускающей патологическое поглощение макрофагами форменных элементов крови, в том числе эритроцитов, а также разрушения транспортного белка белками вируса.

Следует отметить, что повышение концентрации во фракции белков острой фазы, в нашем случае ферритина и СРБ, происходило по времени раньше, что позволяет предположить о причинно-следственной связи между показателями. Данные показатели могли служить фактором, влияющим на понижение концентраций гемоглобина и железа.

Концентрация СРБ достигала высоких значений в крови группы БЭМ и составляла $83,12 \pm 0,26$ мг/л, что 27,7 раз превышает значения в крови группы контроля ($p \leq 0,05$). В крови группы БЭЖ также наблюдались высокие показатели СРБ, указывающие на наличие в организме больных мощного воспалительного процесса. У некоторых больных было отмечено сохранение повышенной концентрации СРБ в сыворотке крови больных даже после выздоровления. Так, в крови группы ПЭЖ концентрация СРБ в крови в 2 раза превышала референсные значения показателя ($p \leq 0,01$). В этой же группе наблюдалось значительное понижение концентрации гемоглобина в сыворотке крови.

Следуя цели исследования и логике понимания патологических процессов клетки участвующих в формировании анемии были изучены показатели общего анализа крови – количество и особенности структуры эритроцитов. На графике отмечено, что в крови групп больных COVID-19 количество эритроцитов выходило за пределы допустимых значений, причем, в крови группы БЭЖ концентрация красных кровяных клеток была равна $4,2 \pm 0,18 \times 10^{12}$ в 1 л, а в группе БЭМ – $3,3 \pm 0,23 \times 10^{12}$ в 1 л, что в 1,2 раза ниже результатов крови группы контроля ($p \leq 0,01$). Подобные процессы и полученные данные могли свидетельствовать о патологических разрушениях эритроцитов в острую фазу заболевания, что в дальнейшем вызвало развитие анемии [5]. Подобные изменения могли стать результатом того, что белок СРБ и белок ферритин, как белки острой фазы способны провоцировать коагуляционные изменения в крови и, изменяя мембраны эритроцитов, ускорять процесс их слипания и снижать жизнеспособности эритроцитов в кровеносном русле [5] (рисунок 1).

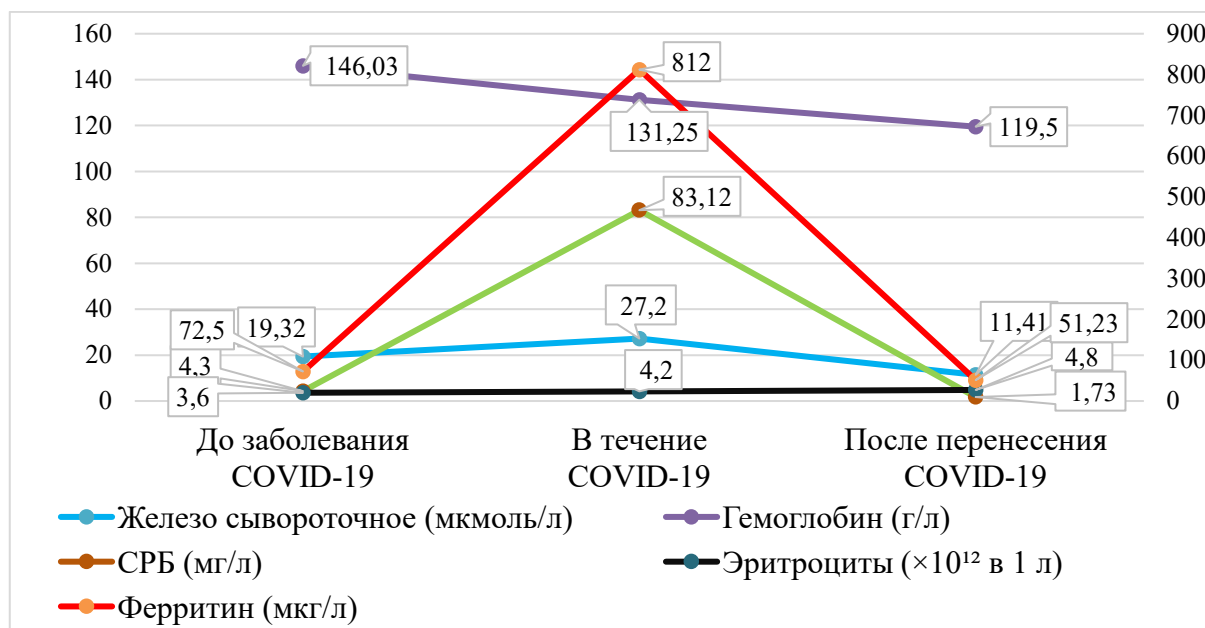


Рисунок 1. Динамика изменений биохимических показателей крови экспериментальных групп исследования

Выводы.

В крови больных в период течения инфекционного процесса, вызванного вирусом SARS-COV-2 высокие значения принимали показатели белка ферритина (повышался в 5 раз) и белка СРБ (повышался в 27,7 раз); отмечалось снижение количества эритроцитов (в 1,2–1,4 раза) в крови; показатели гемоглобина и сывороточного железа были снижены.

В крови групп больных, перенесших новую коронавирусную инфекцию показатели концентрации ферритина и СРБ возвращались в нормальные значения или были повышены не более, чем в 2 раза. Уровень эритроцитов имел тенденцию к повышению количества, но оставался в пределах нижнего допустимого значения. Наиболее значительные отклонения были отмечены в концентрациях гемоглобина и сывороточного железа. Их уровень был понижен в 1,5–2 раза в сравнении с показателями крови контрольной группы исследования, свидетельствуя о наличии у больных анемии, ассоциированной с COVID-19.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: дефицит железа в сыворотке крови и нарушение его транспорта ассоциированы с развитием мощного иммунного ответа в организме, в результате которого происходит снижение количества эритроцитов в крови, но в содержании железа наблюдалось повышенное содержание ферритина, что свидетельствует о процессах затянувшегося воспалительного процесса.

Литература.

1. Бразгина Я.Е., Бикбулатова В.И., Попова Н.И. Железодефицитная анемия на фоне COVID-19. Клинический случай // Актуальные исследования. 2022. 49 (128). С. 66–68.

2. Mousavizadeh, L. *Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis* // *Journal of Microbiol. Immunol. Infect.* 2020. №1182(20). P. 30082–30087.
3. Горбунов А.А., Сорокина Л.Е., Чегодарь Д.В., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И. *Диагностика COVID-19: Современное состояние проблемы и перспективы в отрасли* // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2020. 10 (2). С. 69–77.
4. Иванова, В. В. *Особенности биохимических изменений в клетках и плазме крови при COVID-19* // *Педиатрия.* 2020. №9. С. 38–43.
5. Lagadinou M., Salomidou E.E., Zareifopoulos N. *Prognosis of COVID-19: Changes in laboratory parameters* // *Infez Med.* 2020. (28). P. 89–95.

Сведения об авторах

Мария Леонидовна Золотавина

к. б. н., доц., доц. КубГУ
ФГБОУ ВПО "Кубанский государственный университет",
Краснодар, Россия

Елена Александровна Гайдабура

магистр биологических наук КубГУ,
ФГБОУ ВПО "Кубанский государственный университет",
Краснодар, Россия

Эл. почта: alena.gajdabura@mail.ru

Information about author

Maria Leonidovna Zolotavina

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,
Associate Professor of KubGU
Kuban State University,
Krasnodar, Russia

Elena Aleksandrovna Gaidabura

Master of Biological Sciences of Kuban State University,
Kuban State University,
Krasnodar, Russia

E-mail: alena.gajdabura@mail.ru

УДК 611.018:591.441

ГРНТИ 76.03.35

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.44-48

Б.Б. Гагулаева, Н.В. Яглова

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

РАЗВИТИЕ ЛИМФОИДНЫХ ЛИНИЙ СЕЛЕЗЕНКИ КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ПРЕНАТАЛЬНОМУ И ПОСТНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ

Проведено исследование влияния эндокринного дисраптора ДДТ на пренатальное и постнатальное развитие селезенки. Установлено, что низкодозовое воздействие ДДТ не вызывает выраженных изменений в развитии селезенки крыс, но нарушает дифференцировку лимфоидных линий селезенки.

Ключевые слова: селезенка, эндокринный дисраптор, ДДТ, пренатальное воздействие, лимфоидные линии

B.B. Gagulaeva, N.V. Yaglova

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

DEVELOPMENT OF SPLENIC LYMPHOID LINEAGES IN RATS PRENATALLY AND POSTNATALLY EXPOSED TO THE ENDOCRINE DISRUPTOR DDT

Impact of the endocrine disruptor DDT on prenatal and postnatal development of the spleen was investigated. Low-dose exposure to DDT was found not to affect spleen growth, but disturbed differentiation lymphoid cell lineages.

Key words: *spleen, endocrine disruptor, DDT, prenatal exposure, lymphoid lineages*

Введение.

Воздействие эндокринных дисрапторов как дисморфогенетический фактор начало изучаться сравнительно недавно. Первые работы о способности эндокринных дисрапторов влиять на гистогенез в пренатальном развитии, а также эпигенетическую регуляцию появились около 10 лет назад [1]. Выдвигались предположения, что способность эндокринных дисрапторов нарушать сигналинг гормонов может приводить к нарушениям деления, миграции и дифференцировки клеток [2,3,4]. Однако исследования показывают, что даже дисрапторы тиреоидных гормонов, которые непосредственно влияют на морфогенетические процессы, не имеют специфических механизмов действия [5]. Эндокринные дисрапторы показывают влиять на эпигенетическую регуляцию транскрипции генов и тем самым, обуславливать нарушения развития органов и клеток [6,7]. Эти данные указывают, что наиболее распространенные эндокринные дисрапторы могут быть фактором, обуславливающим популяционные изменения в формировании, развитии и функционировании органов, в первую очередь, эндокринной и иммунной систем.

На сегодняшний день идентифицировано несколько сотен химических соединений, обладающих свойствами эндокринных дисрапторов. Наиболее часто в экосистемах встречается дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) – пестицид, активно применяющийся и по сегодняшний день. ДДТ обладает свойством длительно разлагаться в природе, что обуславливает его персистенцию [8]. ДДТ легко проникает через фетоплацентарный барьер и оказывает непосредственное воздействие на развитие органов плода. В ряде работ было показано, что ежедневное низкодозовое воздействие ДДТ на развивающийся организм в пренатальном и постнатальном развитии приводит к изменению морфогенетических процессов в тимусе, обуславливает нарушения созревания Т-клеток в организме [9,10]. Следовательно, ДДТ может провоцировать изменения и в других лимфоидных органах.

Цель работы.

Изучить формирование селезенки и ее лимфоидных линий в раннем постнатальном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ.

Материалы и методы.

Проведено исследование потомства мужского пола самок крыс Вистар, потреблявших низкие дозы ДДТ (2,9-3,2 мкг/кг/сут) в течение всей беременности и вскармливания. В качестве контрольной группы использовали потомство мужского пола интактных самок. Исследование проводили на новорожденных крысятах и в возрасте 7 суток. Определяли абсолютную и относительную массу селезенки. Получали первичную культуру клеток селезенки и определяли содержание в ней Т- и В-лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии с использованием антител к CD3 и CD45R, меченных флуорохромами.

Проводили статистическую обработку материала с помощью пакета прикладных программ “Statistica 7.0” (“StatSoft, США). Статистически значимыми различия считались при $p < 0,01$.

Полученные результаты.

У новорожденных крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, абсолютная и относительная масса селезенки не отличались от значений контрольной группы. В возрасте 7 суток масса абсолютная масса селезенки увеличилась как в контрольной, так и экспериментальной группе (рис. 1а). Относительная масса органа также увеличилась и не отличалась в сравниваемых группах (рис. 1б).

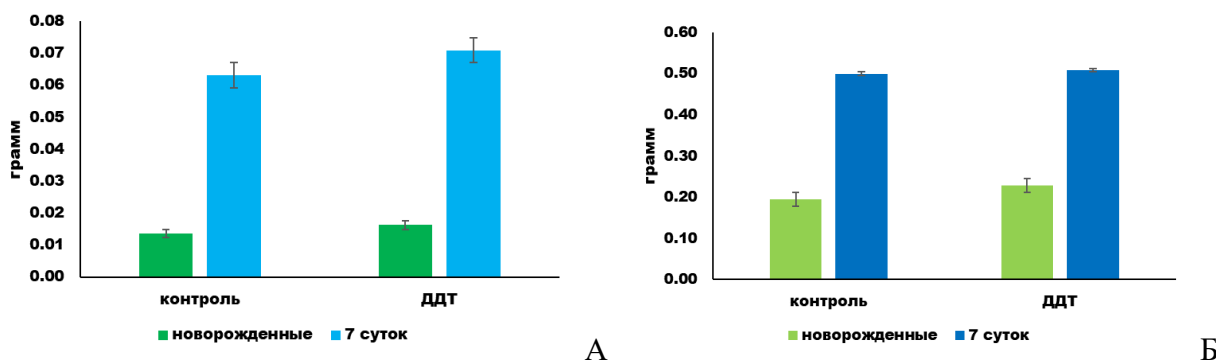


Рис. 1. Возрастные изменения абсолютной (А) и относительной (Б) масс селезенки крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ, ($M \pm m$).

У новорожденных животных контрольной группы основную долю клеток селезенки составляли низкодифференцированные клетки. В-клетки составляли третью часть от общего количества спленоцитов (рис. 2а). Численность Т-клеток была в 20 раз ниже (рис. 2б). У животных, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, содержание В-клеток было более чем в два раза ниже, чем в контрольной группе. Процент Т-клеток также был меньше, но эти различия не достигали статистической значимости (рис. 2).

К 7-м суткам процентное содержание В-клеток в селезенке уменьшилось в обеих группах. Содержание Т-клеток, напротив, увеличилось. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, численность Т- и В-клеток была более низкой (рис. 2).

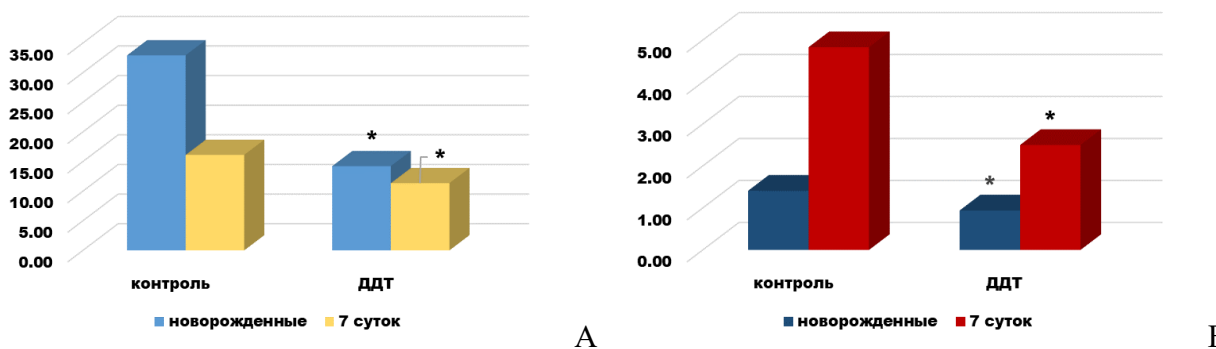


Рис. 2. Формирование В-клеточной (А) и Т-клеточной (Б) лимфоидных линий селезенки в раннем постнатальном периоде у крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ. * – $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Известно, что формирование и функциональное становление лимфоидных органов зависит от действия различных экзогенных и эндогенных факторов [10,11,12,13]. В данном случае мы наблюдали негативное влияние ДДТ на дифференцировку Т- и В-клеток в селезенке. Настоящее исследование показывает, что пренатальное и продолжающееся постнатальное воздействие эндокринного дисраптора вызывает наименьшие изменения в формировании структуры и росте органа, и наибольшие изменения – в дифференцировке лимфоцитов селезенки, что может сказаться на реализации иммунных реакций.

Выводы.

Воздействие эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах вызывает замедление дифференцировки Т- и В-клеточной линии лимфоцитов в селезенке.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Эндокринный дисраптор ДДТ не вызывает выраженных изменений в развитии структуры селезенки крыс, но нарушает дифференцировку лимфоидных линий селезенки.

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

Литература.

1. Kahn L.G., Philippat C., Nakayama S.F., Slama R., Trasande L. *Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health // Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020. V. 8. N. 8. P. 703-718. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30129-7.
2. Palmer J.R., Boggs D.A., Hatch E.E., Troisi R., Titus-Ernstoff L., Strohsnitter W.C., Adam E., Hoover R.N. *Prenatal DES exposure in relation to breast size // Cancer Causes Control.* 2013. V. 24. N. 9. P. 1757-1761. doi: 10.1007/s10552-013-0248-3.
3. Tournaire M., Epelboin S., Devouche E., Viot G., Le Bidois J., Cabau A., Dunbavand A., Levadou A. *Adverse health effects in children of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES) // Therapie.* 2016. V. 71. N. 4. P. 395-404. doi: 10.1016/j.therap.2016.01.006.
4. LaPlante C.D., Bansal R., Dunphy K.A., Jerry D.J., Vandenberg L.N. *Oxybenzone Alters Mammary Gland Morphology in Mice Exposed During Pregnancy and Lactation // J. Endocr. Soc.* 2018. V. 2. N. 8. P. 903-921. doi: 10.1210/js.2018-00024.
5. Spaan K., Haigis A.C., Weiss J., Legradi J. *Effects of 25 thyroid hormone disruptors on zebrafish embryos: A literature review of potential biomarkers // Sci. Total Environ.* 2019. V. 656. P. 1238-1249. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.071.
6. Zama A.M., Uzumcu M. *Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes // Endocrinology.* 2009. V. 150. P. 4681-4691.
7. Hernandez-Cortes D., Alvarado-Cruz I., Solís-Heredia M.J., Quintanilla-Vega B. *Epigenetic modulation of Nr2f2 and Ogg1 gene expression in testicular germ cells by methyl parathion exposure // Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018. V. 346. P. 19-27. doi: 10.1016/j.taap.2018.03.010.
8. Mansouri A., Cregut M., Abbes C., Durand M.J., Landoulsi A., Thouand G. *The Environmental Issues of DDT Pollution and Bioremediation: a Multidisciplinary Review // Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017. V. 181. N. 1. P. 309-339. doi: 10.1007/s12010-016-2214-5.
9. 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.
10. Яглова Н.В., Цомартова Э.С., Назимова С.В., Обернихин С.С., Мухамедова С.Г., Пашина Н.Р., Мусаева Д.О. *Морфологические изменения тимуса новорожденных крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) во внутриутробном периоде развития // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2019. Т.167. № 2. С. 261-264.
11. Dietert R., Lee J., Olsen J., Fitch K., Marsh J. *Developmental immunotoxicity of dexamethasone: Comparison of fetal versus adult exposures // Toxicology.* 2003. No. 194(1-2). P.163-176
12. Яглова Н.В., Обернихин С.С. *Регуляторная роль тучных клеток в морфогенетических процессах органов иммунной системы потомства мышей, перенесших*

активацию иммунной системы в ранние сроки беременности // Клиническая и экспериментальная морфология. 2013. Т. 2. № 6. С. 62-68.

13. Prahl M., Odorizzi P., Gingrich D., Muhindo M., McIntyre T., Budker R., Jagannathan P., Farrington L., Nalubega M., Nankya F., Sikyomu E., Musinguzi K., Naluwu K., Auma A., Kakuru A., Kamyu M.R., Dorsey G., Aweeka F., Feeney M.E. *Exposure to pesticides in utero impacts the fetal immune system and response to vaccination in infancy // Nat. Commun. 2021. V. 12. 132. Doi: 10.1038/s41467-020-20475-8*

Сведения об авторах

Белла Борисовна Гагулаева

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

Москва, Россия

Эл. почта: gagulati@mail.ru

Наталья Валентиновна Яглова

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

Москва, Россия

Эл. почта: yaglova@mail.ru

Information about author

Bella Borisovna Gagulaeva

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

E-mail: gagulati@mail.ru

Nataliya Valentinovna Yaglova

Doctor of Science (Med.),

Head of Department,

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

E-mail: yaglova@mail.ru

УДК 611.018:611.453

ГРНТИ 76.03.35

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.48-53

Э.С. Цомартова^{1,2}, Н.В. Яглова¹, С.С. Обернихин¹,
Д.А. Цомартова^{1,2}, Е.В. Черешнева²

¹НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына
ФГБНУ «РНЦХ

им. ак. Б.В. Петровского»

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России

(Сеченовский Университет)

ОТЛИЧИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ТИМУСА ПОСЛЕ ДОСТИЖЕНИЯ ПОЛОВОЙ ЗРЕЛОСТИ У КРЫС, РАЗВИВАВШИХСЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ

В статье изложены результаты экспериментов, направленных на определение морфофункционального состояния тимуса после достижения половой зрелости у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ. Показано, что пренатальное и постнатальное воздействие низких доз ДДТ обуславливало у половозрелых животных нарушения пролиферации и миграции тимоцитов и функционирования ретикулярного эпителия тимуса.

Ключевые слова: тимус, ретикулярный эпителий, тимоциты, эндокринный дисраптор

E.S. Tsomartova^{1,2}, N.V. Yaglova¹, S.S. Obernikhin¹, D.A. Tsomartova^{1,2},
E.V. Cheresheva²

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

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

DIFFERENCES IN THYMUS MORPHOLOGY AND FUNCTION IN POSTPUBERTAL RATS DEVELOPMENTALLY EXPOSED TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT

The article represents the results of investigation aimed at evaluation of thymus morphology and function in adult rats developmentally exposed to the endocrine disruptor DDT. Prenatal and postnatal exposure to low doses of DDT was found to disturb proliferation and immigration of thymic lymphocytes and cell cycles of thymic epithelial cells.

Key words: thymus, thymic epithelium, thymocytes, endocrine disruptor

Введение.

Воздействие на организм фоновых доз дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) и его метаболитов является насущной проблемой, поскольку это вещество встречается повсеместно [1, 2, 3, 4]. Оно обладает установленными дисрапторными свойствами по отношению к щитовидной, надпочечным и половым железам [5, 6, 7, 8]. Гистофизиология тимуса имеет ярко выраженную зависимость от гормонального фона, в первую очередь от половых гормонов [9]. Из литературных данных известно, что гормональный дисбаланс у животных, вызванный воздействием ДДТ, сопровождался пониженным пролиферативным ответом тимоцитов на Т-клеточный митоген [10, 11]. Среди лимфоидных органов тимус наиболее рано подвергается возрастной инволюции, и ее темпы определяют снижение параметров иммунных реакций [8, 9, 10]. В наших предыдущих исследованиях было установлено, что пренатальное воздействие эндокринного дисраптора ДДТ изменяет морфогенетические процессы в раннем постнатальном развитии тимуса [12].

Цель работы.

Определить показатели морфофункционального состояния тимуса после достижения половой зрелости у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ

Материалы и методы.

Эксперимент выполнен на самцы крыс Вистар в возрасте 2,5 мес. Опытную группу (n=10) составило потомство самок, потреблявших вместо питьевой воды раствор о,п-ДДТ с концентрацией 20 мкг/л в течении всей беременности и лактации. Затем самцы крыс самостоятельно потребляли аналогичный раствор. Среднесуточное потребление ДДТ составило $2,7 \pm 0,2$ мкг/кг. Потомство мужского пола интактных самок (n=10) использовалось в качестве контроля. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила. Определяли массу тела и массу тимуса, рассчитывали относительную массу тимуса. Изготавливали гистологические препараты тимуса, окрашенные гематоксилином и эозином. Для компьютерной морфометрии использовали программу "ImageScope" ("Leica Microsystems", Германия). Измеряли площадь коркового и мозгового вещества, подсчитывали общее количество лимфоцитов в 1 мм^2 коркового и мозгового вещества. Определяли количество тимических телец в единице площади мозгового вещества, степень их развития по Н.В. Ягловой [13], количество клеток в составе тимических телец. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica 7.0» («StatSoft», США). Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп

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

Полученные результаты.

Тимус крыс представлял собой орган, состоящий из двух долей. Снаружи он был покрыт соединительнотканной капсулой. Тимус имел дольчатую структуру. Коровое и мозговое вещество долек имело четкую границу. В корковом веществе встречались очаги гибели тимоцитов. В мозговом веществе выявлялось небольшое количество тимических телец. Встречались тельца 1ой, 2ой и 3ей стадии. Они состояли в среднем из трех ретикулярных эпителиоцитов.

У крыс, развивавшихся при воздействии низких доз ДДТ тимус имел типичное строение. Абсолютная и относительная массы органа не отличались от значений контрольной группы (рис. 1).

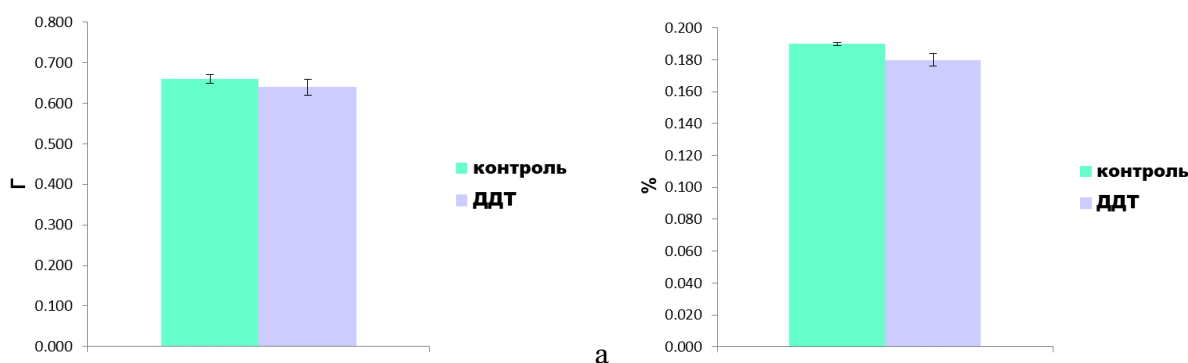


Рис. 1. Абсолютная (а) и относительная (б) массы тимуса половозрелых крыс контрольной группы и развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ.

Соотношение коркового и мозгового вещества также не имело принципиальных отличий от контроля (рис. 2). Коровое вещество было хорошо развито и составляло три четверти долек как у крыс контрольной, так и экспериментальной групп.

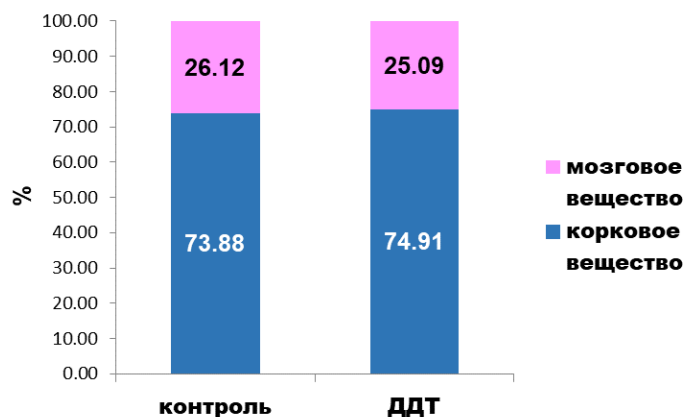


Рис. 2. Соотношение коркового и мозгового вещества в тимусе половозрелых крыс контрольной группы и развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ.

Количество лимфоцитов в единице площади коркового вещества было большим наблюдались очаги опустошения (рис. 3). В мозговом веществе также выявлено большее число лимфоцитов по сравнению с контрольными животными (рис. 3). Количество тимических телец вдвое превышало значения контрольной группы (рис. 3). Тимические тельца состояли в основном из трех ретикулярных эпителиоцитов. В отличие от контроля преобладали тельца первой стадии развития.

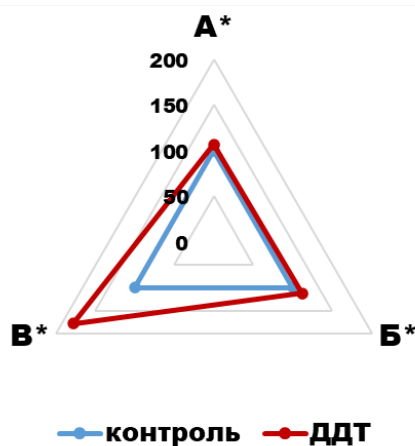


Рис. 3. Количество тимоцитов в 1мм² коркового (А) и мозгового (Б) вещества и количество тимических телец в 1 мм² мозгового вещества (В) у половозрелых крыс контрольной группы и развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ.

Примечание. Значения контрольной группы приняты за 100%, * – $p < 0,05$ при сравнении с контролем.

Результаты исследования показывают, что у половозрелых крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора в пренатальном и постнатальном онтогенезе, тимус характеризуется повышенным содержанием лимфоцитов как в корковом, так и мозговом веществе, то есть активацией пролиферативных процессов, а также активацией образования тимических телец. Эти изменения указывают как на цитотоксичное действие дисраптора [14], так и на сдвиги в органогенезе, что может повлечь изменения и в гистофизиологии вторичных лимфоидных образований.

Выводы.

После достижения половой зрелости у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, в тимусе более активно происходил тимопоэз и наблюдалось снижение миграции лимфоцитов из мозгового вещества в сочетании с более активным формированием тимических телец.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты. Пренатальное и постнатальное воздействие эндокринного дисраптора ДДТ обуславливало у половозрелых животных нарушения пролиферации и миграции тимоцитов и функционирования ретикулярного эпителия тимуса.

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

Литература.

1. Peng S., Kong D., Li L., Zou C., Chen F., Li M., Cao T., Yu C., Song J., Jia W., Peng P. Distribution and sources of DDT and its metabolites in porewater and sediment from a typical tropical bay in the South China Sea // *Environ Pollut.* 2020. V. 267. 115492. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115492
2. Gałgowska M., Pietrzak-Fiećko R. The level of selected organochlorine compounds residues in popular edible mushrooms from north-eastern Poland // *Food Chem.* 2021. V. 353. 129441. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129441
3. Anand N., Chakraborty P., Ray S. Human exposure to organochlorine, pyrethroid and neonicotinoid pesticides: Comparison between urban and semi-urban regions of India // *Environ. Pollut.* 2021. V. 270. 116156. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116156.

4. Vasseghian Y., Hosseinzadeh S., Khataee A., Dragoi E.N. The concentration of persistent organic pollutants in water resources: A global systematic review, meta-analysis and probabilistic risk assessment // *Sci. Total Environ.* 2021. V. 796. 149000. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149000.
5. Calsolaro V., Pasqualetti G., Niccolai F., Caraccio N., Monzani F. Thyroid disrupting chemicals // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. 2583. Doi: 10.3390/ijms18122583
6. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Влияние пренатального и постнатального воздействия низких доз дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на секрецию катехоламинов у крыс в разные периоды онтогенеза // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2017. Т.163. № 4. С. 415-418.
7. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Cytophysiological changes in the follicular epithelium of the thyroid gland after long-term exposure to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2017. V. 162. N. 5. P. 699-702.
8. Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Yaglov V.V. Differences in production of adrenal steroid hormones in pubertal rats Exposed to low doses of the endocrine disrupter DDT during prenatal and postnatal development // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2018. V. 12. N. 1. P. 80–86. Doi: 10.1134/S1990750818010122
9. Xia J., Wang H., Guo J., Zhang Z., Coder B., Su D.M. Age-related disruption of steady-state thymic medulla provokes autoimmune phenotype via perturbing negative selection // *Aging Dis.* 2012. N. 3. P. 248–259.
10. Coder B.D., Wang H., Ruan L., Su D.M. Thymic involution perturbs negative selection leading to autoreactive T cells that induce chronic inflammation // *J. Immunol.* 2015. V. 194. P. 5825–5837. doi: 10.4049/jimmunol.1500082
11. Cowan J.E., Takahama Y., Bhandoola A., Ohigashi I. Postnatal involution and counter-involution of the thymus // *Front. Immunol.* 2020. N. 11. 897. doi: 10.3389/fimmu.2020.00897
12. Обернихин С.С., Яглова Н.В., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Яглов В.В. Формирование пролиферативного ответа лимфоцитов тимуса на Т-клеточный митоген у крыс, развивавшихся в условиях воздействия эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2020. Т.169. №1. С. 66-69.
13. 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.
14. Ge Q., Zhao Y. Evolution of thymus organogenesis // *Developmental and Comparative Immunology.* 2013. V. 39. P. 85–90.

Сведения об авторах

Information about author

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

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

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

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

Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

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

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

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

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

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

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

УДК 611.018:611.453
ГРНТИ 76.03.35
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.53-57

**В.В. Яглов¹, С.В. Назимова¹, М.Ю. Иванова²,
Т.А. Ломановская²**

¹НИИ морфологии человека им. ак. А.П. Авцына ФГБНУ
«РНЦХ им. ак. Б.В. Петровского»
²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет)

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ КЛЕТОЧНУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ, В СЕТЧАТОЙ ЗОНЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ В ПУБЕРТАТНОМ ВОЗРАСТЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА В ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Изучено развитие сетчатой зоны надпочечников в пубертатном возрасте и экспрессия факторов, регулирующих клеточную дифференцировку, при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ в постнатальном периоде. Установлено, что эндокринный дисраптор нарушает экспрессию факторов, регулирующих клеточную дифференцировку, и обуславливает преждевременную остановку роста сетчатой зоны надпочечников.

Ключевые слова: надпочечник, сетчатая зона, транскрипционная регуляция, эндокринный дисраптор

V.V. Yaglov¹, S.V. Nazimova¹, M.Y. Ivanova², T.A. Lomanovskaya²

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

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

ALTERATIONS IN EXPRESSION OF FACTORS REGULATING CELL DIFFERENTIATION, IN ADRENAL ZONA RETICULARIS DURING PUBERTY INDUCED BY POSTNATAL EXPOSURE OF ENDOCRINE DISRUPTOR

Growth parameters of adrenal zona reticularis and expression of factors regulating cell

differentiation were studied in rats exposed to endocrine disruptor DDT during postnatal development. The endocrine disruptor was found to affect expression of factors regulating cell differentiation and provoke preliminary growth arrest.

Key words: *adrenal gland, zona reticularis, transcriptional regulation, endocrine disruptor*

Введение.

Сетчатая зона коркового вещества надпочечников активно развивается до пубертатного периода и является основным источником половых стероидов. Нарушение развития сетчатой зоны может вызывать изменения полового созревания, а затем негативно влиять на репродуктивную функцию. На сегодняшний день не вызывает сомнения, что одной из ведущих причин нарушения развития эндокринной системы является воздействие на организм эндокринных дисрапторов – химических соединений антропогенного происхождения, которые обладают способностью нарушать различные стадии синтеза гормонов и их взаимодействия с клетками-мишенями [1,2,3,4]. В последние десятилетия отмечается значительное увеличение случаев аномалий развития и нарушений функционирования мужской и женской половой системы, что обуславливает значительный интерес исследователей к этой проблеме [3,4]. Многие из дисрапторов являются стойкими загрязнителями с длительным периодом полураспада за счет чего они персистируют в экосистемах. Ярким примером такого соединения является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Он легко проникает и депонируется в клетках за счет высокой липофильности и способности проникать через гистогематические барьеры. Как эндокринный дисраптор он обладает антиандрогенными свойствами [5, 6], а также нарушает йод-аккумулирующую функцию щитовидной железы и синтез стероидных гормонов и катехоламинов в надпочечниках [7,8,9]. Мониторинговые исследования населения показывают, что низкодозовое воздействие ДДТ, вызывает разнообразные структурные и функциональные нарушения репродуктивной системы мужчин и женщин, но изменения в сетчатой зоне надпочечников и их механизмы мало изучены.

Цель работы.

Изучить экспрессию факторов, регулирующих клеточную дифференцировку, в сетчатой зоне надпочечников в пубертатном возрасте при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ в постнатальном периоде.

Материалы и методы

Работа выполнена на самцах крыс Вистар (n=20), подвергавшихся низкодозовому воздействию *o,n*-ДДТ с рождения. Среднесуточное потребление ДДТ потомством составило $3,2 \pm 0,12$ мкг/кг. Расчет дозы ДДТ выполняли согласно требованиям к определению его низких доз [10]. Животные контрольной группы потребляли водопроводную воду. Животных выводили из эксперимента в возрасте 6 недель, что соответствует пубертатному периоду. Проводили гистологическое исследование экваториальных срезов надпочечников. Определение β -катенина в кортикостероцитах, а также Ki-67, Oct4, Sonic Hedgehog (Shh) проводили методом иммуногистохимии с помощью поликлональных кроличьих антител («Abcam» США). Реакцию визуализировали с помощью набора реактивов «UltraVision LP Detection System» («ThermoScientific», США). Для количественной оценки морфологических параметров использовали программу для морфометрии «ImageScore» («Leica Microsystems», Германия). Статистическую обработку данных производили с помощью программы Statistica 7.0 («Statsoft Inc.», США). Сравнение независимых групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и χ^2 . Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Полученные результаты.

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с рождения, в пубертатном возрасте сетчатая зона надпочечников имела меньшие размеры, чем у интактных крыс (рис.1).

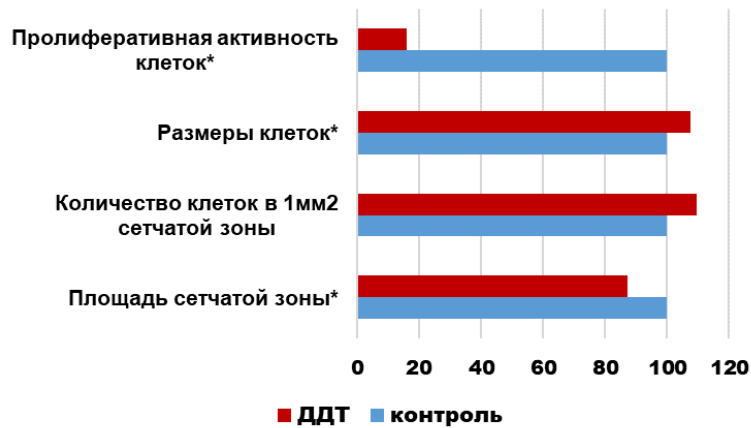


Рис. 1. Морфофункциональные отличия сетчатой зоны коркового вещества надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора ДДТ в постнатальном развитии. Значения контрольной группы приняты за 100%; * – статистически значимые отличия от контрольной группы.

Плотность клеток не отличалась от значений контрольной группы. Размеры клеток превышали контрольные значения. Пролиферативная активность кортикостероцитов сетчатой зоны также была резко понижена (рис. 1).

Исследование канонического Wnt-сигналинга показало, что уровень его активации в кортикостероцитах был крайне низким. Экспрессия фактора поддержания плюрипотентного состояния клеток была повышенной. Экспрессия лиганда Shh, напротив, была пониженной (рис. 2).



Рис. 2. Отличия в экспрессии факторов, регулирующих клеточную дифференцировку, в сетчатой зоне надпочечников в пубертатном возрасте при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ в постнатальном периоде. Значения контрольной группы приняты за 100%; * – статистически значимые отличия от контрольной группы.

Результаты гистологического исследования показали, что воздействие ДДТ приводило к более раннему торможению роста сетчатой зоны, что подтверждало снижение пролиферативной активности ее клеток. Согласно теории центростремительной миграции источником кортикостероцитов всех зон являются камбиальные клетки, которые локализуются под капсулой или в промежуточной зоне, а затем мигрируют в направлении мозгового вещества, изменяя при этом свой фенотип [11]. Вторым механизмом пополнения пула кортикостероцитов является клеточная пластичность – способность клеток изменять секреторный профиль в ответ на гормональные сигналы и сигналы

клеточного микроокружения. Одной из форм пластичности является дедифференцировка при которой дифференцированная клетка превращается в менее дифференцированную клетку в пределах одной и той же линии ткани [12]. Oct4 – один из ключевых факторов, обеспечивающих поддержание эмбриональных клеток в плюрипотентном состоянии и способных вызывать дедифференцировку дифференцированных клеток во взрослом организме в ответ на различные стимулы [13]. В ряде работ было показано, что зонирование и регенерация коры надпочечников контролируются сигнальными путями развития, такими как Shh и WNT/ β -катенин-сигналинг [14]. Также известно, что Oct4- и Shh-позитивные клетки в сетчатой зоне встречаются в норме и их численность увеличивается после завершения роста органа, формируя пул для физиологической регенерации [15]. Выраженное снижение активации Wnt-сигналинга свидетельствует о торможении роста, а высокий уровень Oct4 вероятно указывает на более раннюю активацию его экспрессии в связи с более ранним прекращением роста сетчатой зоны.

Выводы.

Воздействие низких доз ДДТ нарушает развитие сетчатой зоны надпочечников и ингибирует канонический Wnt-сигналинг. На фоне остановке роста зоны происходит усиленное формирование пула Oct4-экспрессирующих клеток.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: воздействие эндокринного дисраптора ДДТ в постнатальном периоде нарушает экспрессию факторов, регулирующих клеточную дифференцировку, и обуславливает преждевременную остановку роста сетчатой зоны надпочечников.

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

Литература.

1. Oliveira K.J., Chiamolera M.I., Giannocco G., Pazos-Moura C.C., Ortiga-Carvalho T.M. Thyroid function disruptors: from nature to chemicals // *J. Mol. Endocrinol.* 2019. V. 62. №1. P. R1–R19.
2. Papalou O., Kandaraki E.A., Papadakis G., Diamanti-Kandarakis E. Endocrine Disrupting Chemicals: An Occult Mediator of Metabolic Disease // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2019. V. 10. Art. 112.
3. Interdonato L., Siracusa R., Fusco R., Cuzzocrea S., Di Paola R. Endocrine Disruptor Compounds in Environment: Focus on Women's Reproductive Health and Endometriosis // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24. N. 6. 5682. <https://doi.org/10.3390/ijms24065682>
4. Gore A., Chapell V., Fenton S., Flaws J., Nadal A., Prins J., Toppari J., Zoeller J. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine Disrupting Chemicals // *Endocrine Reviews*. 2015. V. 36. № 6. P. E1–E150.
5. Ouyang F., Perry M.J., Venners S.A., Chen C., Wang B., Yang F., Fang Z., Zang T., Wang L., Xu X., Wang X. Serum DDT, age at menarche, and abnormal menstrual cycle length // *Occup. Environ. Med.* 2005. V. 62. P. 878–884.
6. Aneck-Hahn N.H., Schulenburg G.W., Bornman M.S., Farias P., de Jager C. Impaired semen quality associated with environmental DDT exposure in young men living in a malaria area in the Limpopo Province, South Africa // *J. Androl.* 2007. V. 28. P. 423–434.
7. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Mechanisms of Disruptive Action of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on the Function of Thyroid Follicular Epitheliocytes // *Bull. Exp. Biol.* 2015. V. 160. № 2. P. 231–233.
8. Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Yaglov V.V. Differences in Production of Adrenal Steroid Hormones in Pubertal Rats Exposed to Low Doses of the Endocrine Disruptor DDT during

Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

Prenatal and Postnatal Development // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2018, V. 12, N. 1, P. 80–86.

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

10. Vandenberg L., Colborn T., Hayes T., Heindel J., Jacobs D., Lee D.-H., Shioda T., Soto A., vom Saal F., Welshons W., Zoeller R., Myers J. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses // *Endocrine Reviews. 2012. Vol. 33. P. 378–455.*

11. Bird I.M. In the zone: understanding zona reticularis function and its transformation by adrenarche // *J. Endocrinol. 2012. V. 214. № 2. P. 109–111.*

12. Tetteh P.W., Farin H.F., Clevers H. Plasticity within stem cell hierarchies in mammalian epithelia // *Trends Cell. Biol. 2015. V. 25. № 2. P. 100–108.*

13. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cell // *Science. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.*

14. Ching S., Vilain E. Targeted disruption of Sonic hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia // *Genesis. 2009. V. 47. № 9. P. 628–637.*

15. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Цомартова Д.А. Воздействие низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) нарушает транскрипционную регуляцию развития сетчатой зоны надпочечников у самцов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т.170. №11. С.651-655.*

Сведения об авторах

Валентин Васильевич Яглов

доктор мед. наук, профессор, главный научный сотрудник,

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

Москва, Россия

Эл. почта: vyaglov@mail.ru

Светлана Владимировна Назимова

Канд. мед. наук, с.н.с.,

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

Москва, Россия

Эл. почта: pimka60@list.ru

Марина Юрьевна Иванова

канд. мед. наук, доцент

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

Эл. почта: ivanova_m_y@mail.ru

Татьяна Александровна Ломановская

канд. мед. наук, старший преподаватель

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

Эл. почта: tatiana_80_80@inbox.ru

Information about author

Valentin Vasilyevich Yaglov

Doctor of Science (Med.), Professor,
Principle Researcher,

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

E-mail: vyaglov@mail.ru

Svetlana Vladimirovna Nazimova

PhD (PhD (Med), Senior Scientist,

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

E-mail: pimka60@list.ru

Marina Yuryevna Ivanova

PhD (Med), Associate Professor, Federal State Autonomous
Educational Institution of Higher Education

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University
of the Ministry of Health of the Russian Federation
(Sechenov University)

e-mail: ivanova_m_y@mail.ru

Tatiana Alexandrovna Lomanovskaya

PhD (Med.), Senior Lecturer, Federal State Autonomous
Educational Institution of Higher Education I.M.

Sechenov First Moscow State Medical University of the
Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov
University), Russian Federation

e-mail: tatiana_80_80@inbox.ru

УДК 611-018.2+611-013:616-003.93

ГРНТИ 34.39.45

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.58-63

Е. Ю. Шаповалова, Л. М. Дышлевая,
Т. А. Бойко, Ю. Г. Барановский,
С. В. Харченко, И. А. Демьяненко,
И. А. Лугин

Институт «Медицинская академия имени С.И.
Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный
университет имени В.И. Вернадского»

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАТА ИШЕМИЗИРОВАННОГО КОЖНОГО ДЕФЕКТА НА 23-И СУТКИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И СУРФАКТАНТА

В статье обсуждается влияние тканеинженерной конструкции, состоящей из легочного сурфактанта и дермальных аллофибробластов на регенерацию модельного ишемизированного кожного дефекта. Представлены оригинальные морфологические исследования биоптатов заживающей раны на 23-и сутки репаративной регенерации. Изучение толщины эпидермиса, коллагенообразования и васкуляризации биоптатов контрольной и экспериментальной групп с помощью морфологических и статистических методов показали, что тканеинженерная конструкция ускоряет репаративный гистогенез тканей кожи, частично восстанавливает шерстяной покров и архитектуру коллагеновых волокон в слоях дермы биоптатов.

Ключевые слова: ишемизированный кожный дефект, репаративная регенерация, фибробласты, сурфактант.

УДК 611-018.2+611-013:616-003.93

E.Y. Shapovalova, L.M. Dyishlevaya,
T.A. Boyko, Yu.G. Baranjvskiy,

S.V. Harchenko, I.A. Demyanenko, I.A. Lugin

The Institute "Medical Academy named after S.I.
Georgievsky" "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE REGENERATE OF ISCHEMIC SKIN DEFECT ON DAY 23 AFTER TRANSPLANTATION OF DERMAL FIBROBLASTS AND SURFACTANT

The paper discusses the effect of a tissue-engineered construct consisting of pulmonary surfactant and dermal allofibroblasts on the regeneration of a model ischemic skin defect. Original morphological studies of biopsy specimens of a healing wound on the 23rd day of reparative regeneration are presented. The study of the thickness of the epidermis, collagen formation and vascularization of biopsy specimens from the control and experimental groups using morphological and statistical methods showed that the tissue engineering structure accelerates the reparative histogenesis of skin tissues, partially restores the coat and the architectonics of collagen fibers in the dermal layers of the biopsy specimens.

Key words: ischemic skin defect, reparative regeneration, fibroblasts, surfactant.

Введение. Хроническая венозная недостаточность, которой страдает более 20% населения мира, вызвана венозным стазом, приводящим к каскаду патологических изменений окружающих тканей на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях [1]. Осложнением ХВН является трофическая язва. Один из подходов в терапии такой патологии заключался в доставке жизнеспособных аллогенных фибробласты, в трофическую язву [2]. Лечение дефектов кожи с использованием культивированных *in vitro* клеток получило широкое признание во всем мире, как безопасный и эффективный метод [3]. Способность фибробластов формировать межклеточный матрикс, синтезировать цитокины, вызывать миграцию и пролиферацию разных типов клеток при

повреждениях кожи делает их перспективными для широкого клинического применения [4]. Они имеют возможность активно делиться и участвуют в заживлении ран [2]. Тканеинженерные кожные трансплантаты с дермальными фибробластами доказали свою эффективность при закрытии глубоких кожных ран, в том числе и при нарушении венозного кровообращения [3]. В здоровом легком альвеолоциты 2-го типа секретируют белки сурфактанта, которые важны для защиты легких от воздействия патогенов [5]. Сурфактант успешно используется при лечении не осложненных кожных дефектов [6].

Целью исследования было изучить морфологические особенности биоптатов заживающего ишемизированного кожного дефекта у мышей на 23-й день после трансплантации тканеинженерной конструкции из легочного сурфактанта и дермальных фибробластов.

Материалы и методы. В работе использованы 16 белых лабораторных мышей линии C57/B1, достигших возраста 4–6 месяцев. Все животные были разделены на контрольную и экспериментальную группы по 8 особей в каждой. Эксперименты проводили со следованием всем принципам гуманности, содержащихся в директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС) и в соответствии с «Правилами выполнения работ с привлечением экспериментальных животных». Во всех группах операцию по моделированию кожной раны в лопаточной области производили после внутрибрюшинного введения 2,5% раствора авертина 0,3-0,4 мл. Кожу иссекали в виде круга диаметром 12 мм, к краям раны кожно-фасциальными узловыми швами фиксировалось силиконовое кольцо с наружным диаметром 12 мм атравматичным шовным материалом «Полипропилен» 5-0 для исключения возможности эпителизации раны и закрытия её мобильной кожей области спины. Методика формирования модельной раны описана в работе Барановского Ю. Г. с соавт., 2016 [7]. Экспериментальная группа (8 особей) объединяла мышей, которым на модельную рану во время операции трансплантировали 2D конструкцию, состоящую из поверхностно нанесенного легочного сурфактанта, а края и дно раны обкалывали 0,4 мл взвеси аллофибробластов 2-го или 3-го пассажей с фенотипом CD44+CD90+CD105+CD73+CD45+CD31-CD34-CD45- в ростовой среде DMEM F12 (Lonza) в количестве 1,33 млн клеток. Методика получения и культивации дермальных фибробластов подробно приведена в статье Шаповалова Е.Ю., с соавт., 2017 [8].

Существует линейка коммерчески доступных препаратов легочных сурфактантов, которые содержат липофильную фракцию после лаважа или экстракции из легких животных. Среди поверхностных эмульгирующих свойств фосфолипидов и гидрофобных белков сурфактанта SP-B и SP-C, которые облегчают абсорбцию и распространение пленки сурфактанта, присутствующие фосфатидилглицерин [9], DPPC18, SP-B31 и SP-C32 обладают противовоспалительными и антибактериальными свойствами [10]. У мышей ЭГ использовали раствор препарата природного сурфактанта – порактант альфа (коммерческое название Куросульф (Curosulf) фирмы Chiesi Farmaceutici (Италия), представляющего собой сложный комплекс, включающий гидрофобные низкомолекулярные протеины, полярные фосфолипиды и полисахариды, полученные из измельченных легких телят и поросят. Сверху рану закрывали асептической повязкой «Воскопран» с левомиколом.

По истечении 23-х суток восстанавливающийся ишемизированный дефект кожного покрова иссекали при повторном оперативном вмешательстве. Операционную рану ушивали и, после ее заживления, мышей возвращали в виварий. По общепринятой методике материал фиксировали в 10% растворе формалина и пропитывали парафином. Обзорная окраска срезов была проведена первым красителем – гематоксилином Майера, а затем вторым – эозином. Толщину эпидермиса, площадь, занимаемую коллагеновыми волокнами и микрососудами в грануляционной ткани биоптатов измеряли с помощью программы "ImageJ" при общем увеличении в 400 раз светового микроскопа «Олимпус» CX40 по 30 измерений на срез. Площадь коллагеновых волокон и кровеносных сосудов рассчитывали в процентах от площади грануляционной ткани в срезах.

Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

Сравнения статистических выборок толщины эпидермиса, площади коллагеновых волокон и кровеносных сосудов производили в процентах по отношению к КГ в каждом сроке заживления, используя программу MS Office Excel 2007 и STATISTICA 10,0 Enterprise (StatSoft Inc., США), с помощью критерия Манна-Уитни (U-критерий) со степенью достоверности различий $p=0,05$.

Полученные результаты. На 23-и сутки после моделирования ишемизированного кожного дефекта в межлопаточной области спины лабораторных мышей рана полностью эпителизирована. В контрольной группе толщина многослойного плоского частично ороговеающего эпителия на поверхности биоптатов кожного дефекта составляет $62,84 \pm 0,01$ мкм (таблица 1). В его составе эпидермоциты, проходя процесс ороговения, дифференцируются и формируют четыре слоя: базальный, шиповатый, зернистый и роговой, свойственные тонкой коже (рисунок 1А). Наименее всего развит роговой слой, насчитывающий всего один ряд уплощенных кератиноцитов с плоскими ядрами в центре. Закладки таких дериватов кожи как шерстинки не обнаруживаются. Базальная мембрана эпидермиса ясно контурируется. Граница между эпидермисом и дермой биоптатов без вдавлений, свидетельствующих о начале образования дермальных сосочков. Грануляционная ткань под эпидермисом биоптатов находится на третьей стадии раневого процесса – стадии фиброзирования. Основу грануляционной ткани составляют толстые пучки коллагеновых волокон, однако, еще без четкой параллельной локализации по отношению к базальной мембране (см. рис. 1). Средняя площадь коллагеновых волокон равна $64,93 \pm 0,01\%$ от площади дермы биоптатов. Морфологическая картина грануляционной ткани однородна по всей глубине биоптатов. Между пучками коллагеновых волокон свободные пространства заполнены межклеточным веществом, клетками и кровеносными сосудами. Кровеносные сосуды представляют собой капилляры, стенка которых образована одним слоем эндотелиоцитов, лежащих на базальной мембране. Площадь, занимаемая кровеносными капиллярами, в среднем составляет $1,05 \pm 0,001\%$ от площади грануляционной ткани.

Таблица 1 - Количественные характеристики компонентов биоптатов контрольной (КГ) и экспериментальной (ЭГ) групп на 23-и сутки репаративного гистогенеза

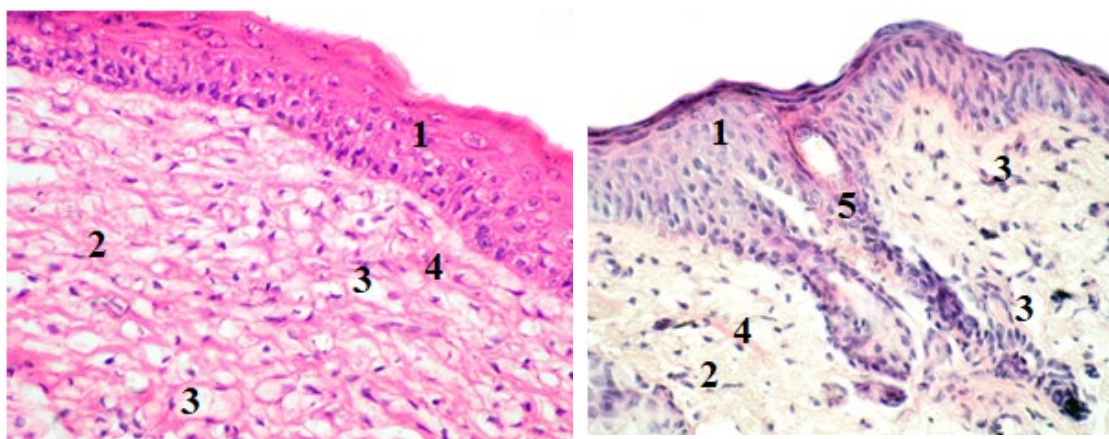
Рубцы кожи	Толщина эпидермиса в мкм	Площадь сосудов в дерме в %	Площадь коллагеновых волокон в дерме в %
Рубцы кожи в КГ	$62,84 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,001$	$64,93 \pm 0,01$
Рубцы кожи в ЭГ	$120,12 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,001$	$60,18 \pm 0,02$

У мышей экспериментальной группы после трансплантации в ишемизированную операционную рану сурфактанта и обкалывания дермальными аллофибробластами на 23-и сутки заживления в срезах эпидермис выглядит заметно более толстым и дифференцированным. Его толщина статистически достоверно на $47,69 \pm 0,01\%$ больше, чем в контрольной группе (см. табл. 1). Увеличение толщины многослойного плоского частично ороговевающего эпителия произошло за счет увеличения рядов эпителиоцитов в шиповатом и зернистом слоях. Уплотненные клетки рогового слоя лежат в 1-2 ряда и имеют плоские ядра, но полоса ороговения на поверхности эпидермиса не образовалась (рисунок 1Б). В периферических отделах биоптатов присутствуют закладки дериватов эпидермиса – шерстинки. Эти закладки относительно не глубокие. В центральной части биоптатов такие дериваты кожи отсутствуют. Грануляционная ткань биоптатов так же, как в контроле, находится на третьей стадии раневого процесса. Прослеживается разная морфологическая картина ее строения непосредственно под эпидермисом и в глубоких слоях биоптатов. Возможно, тканеспецифическая активация фибробластов в зависимости от тканевого позиционирования идет за счет присутствия сурфактанта, описанного в работе Raslan, A.A. et al., 2020 [11].

Под эпидермисом коллагеновые волокна менее грубые. Эти волокна образуют сетчатую структуру, в отличие от более объемных грубых волокон в глубоких слоях биоптатов. Такие волокна ориентированы параллельно друг другу и залегают под закладкой шерстинок. Площадь, занимаемая коллагеновыми волокнами, статистически достоверно на $5,16 \pm 0,01\%$ меньше, чем в контрольной группе. Прослеживается заметное обеднение фиброзирующейся грануляционной ткани кровеносными сосудами. Площадь, занимаемая кровеносными капиллярами статистически достоверно на $48,57 \pm 0,01\%$ меньше, чем в контрольной группе.

Выводы. Тканеинженерная конструкция на основе легочного сурфактанта и дермальных аллофибробластов ускоряет заживление ишемизированного кожного дефекта. На 23-и сутки после моделирования раны эпидермис биоптатов раны в 2 раза толще и более дифференцирован по сравнению с контролем. В экспериментальной группе наблюдается закладка дериватов эпидермиса – шерстинок. Грануляционная ткань в биоптатах обеих групп находится в стадии фиброзирования. При этом площадь коллагеновых волокон в экспериментальной группе на $5,16 \pm 0,01\%$ больше, а площадь кровеносных сосудов вдвое меньше по сравнению с контрольной группой. Архитектоника коллагеновых волокон в грануляционной ткани регенерата после трансплантации легочного сурфактанта и дермальных гетерофибробластов схожа с таковой в неповрежденной коже.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: Трансплантация в ишемизированный кожный дефект тканеинженерной конструкции, состоящей из легочного сурфактанта и культивированных аллогенных дермальных фибробластов ускоряет репаративные процессы за счет стимуляции функции коллагенообразования фибробластов, ускорения эпителизации дефекта и оптимизации его васкуляризации, что приводит к восстановлению кожного и частично шерстяного покрова, а также сосочкового и сетчатого слоев кожи вместо плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани рубца в контрольной группе.



А

Б

Рисунок 1. Эпидермис и дерма биоптатов ишемизированной раны кожи мышей контрольной и экспериментальной групп на 23-и сутки репаративного гистогенеза. Окраска гематоксилином и эозином. А – Контрольная группа. Увеличение: $\times 400$. Б – Экспериментальная группа. Увеличение: $\times 100$. 1 – эпидермис; 2 – грануляционная ткань; 3 – сосуд; 4 – коллагеновые волокна; 5 – закладка шерстинки.

Литература

1. Комарова Л.Н., Ряхин Р.Н., Алиев Ф.Ш., Звезда С.А. Результаты лечения больных варикозной болезнью нижних конечностей за 10 лет // Архивъ внутренней медицины. 2018. N 3. С. 215-218.
2. Sriram G, Bigliardi P.L., Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro // Eur J Cell Biol. 2015. Vol. 94. P. 483–512.
3. Zorin V., Zorina A., Smetanina N., Kopnin P., Ozerov I., Leonov S., Isaev A., Klokov D., Andreyan N. Osipov A.N. Diffuse colonies of human skin fibroblasts in relation to cellular senescence and proliferation // AGING. 2017. No. 5(9). P. 1404-1413.
4. [Buken C.](#), [Sahana J.](#), [Corydon T.](#), [Melnik D.](#), [Bauer J.](#) Morphological and Molecular Changes in Juvenile Normal Human Fibroblasts Exposed to Simulated Microgravity // [Sci Rep.](#) 2019. N. 9. P. 11882.
5. Ruaro B., Salton F., Braga L., Wade B. The History and Mystery of Alveolar Epithelial Type II Cells: Focus on Their Physiologic and Pathologic Role in Lung // Int. J. Mol. Sci. 2021. N 5 (22). – P. 2566.
6. Mirastschijski U., Schwab I., Coger V., Zier U. Lung Surfactant Accelerates Skin Wound Healing: A Translational Study with a Randomized Clinical Phase I Study // Sci Rep. 2020. N 2 (13). P. 2581.
7. Барановский Ю.Г., Ильченко Ф.Н., Шаповалова Е.Ю. Способ моделирования трофической язвы у лабораторных мышей в опытной модели // Вестн. неотложной и восстановительной хир. 2016. № 2. – С. 258–260.
8. Шаповалова Е.Ю., Морозова М.Н., Барановский Ю.Г., Бойко Т.А., Барановский А.Г. Сравнительная характеристика волокнистого состава рубца после введения ауто- и гетерофибробластов в рану у мышей // Журнал научных статей «наука и образование в XXI веке. 2017. Т. № 3 (19). С. 100-104.
9. Numata M, Kandasamy P, Voelker DR. Anionic pulmonary surfactant lipid regulation of innate immunity // Expert. Rev. Respir. Med. 2012. № 6. P. 243–246.
10. Olmeda B, Martinez-Calle M, Perez-Gil J. Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling // Ann. Anatomischer Anzeiger: Off. Organ. Anatomische Ges. 2017. Vol. 209. P. 78–92.
11. Raslan, A.A., Yoon J.K. WNT Signaling in Lung Repair and Regeneration. Mol. Cells. 2020. N43. P. 774–783.

Сведения об авторах

Елена Юрьевна Шаповалова

доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой гистологии и эмбриологии

Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имни В.И. Вернадского»

Симферополь, Россия

Эл. почта: Shapovalova_L@mail.ru

Лилия Михайловна Дышлевая

Соискатель кафедры гистологии и эмбриологии

Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имни В.И. Вернадского»

Симферополь, Россия

Эл. почта: 12345@mail.ru

Барановский Юрий Геннадиевич

кандидат медицинских наук, доцент кафедры хирургии №2

Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имни В.И. Вернадского»

Симферополь, Россия

Эл. почта: Baranovskiy Yura@mail.ru

Татьяна Анатольевна Бойко

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии

Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имни В.И. Вернадского»

Симферополь, Россия

Эл. почта: tatyana_boyko_5@mail.ru

Светлана Анатольевна Харченко

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии

Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имни В.И. Вернадского»

Симферополь, Россия

Эл. почта: kcharchenkos@mail.ru

Инна Алексеевна Демьяненко

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии

Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имни В.И. Вернадского»

Симферополь, Россия

Эл. почта: innademianenko@mail.ru

Игорь Анатольевич Лугин

Кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии

Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ имни В.И. Вернадского»

Симферополь, Россия

Эл. почта: iglug@list.ru

Information about author

Elena Yur'evna Shapovalova

Medical Doctor, PhD, Professor, Head of Department of Histology & Embryology The Institute "Medical Academy named after S.I. Georgievsky" "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"

Simferopol, Russian Federation

E-mail: Shapovalova_L@mail.ru

Dyishlevaya Liliya Mihaylovna

applicant, applicant The Institute "Medical Academy named after S.I. Georgievsky" "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"

Simferopol, Russian Federation

E-mail: dliliya1986@mail.ru

Baranovskiy Yuriy Gennadievich

PhD, Docent of Department of Surgery N2 The Institute "Medical Academy named after S.I. Georgievsky" "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"

Simferopol, Russian Federation

E-mail: Baranovskiy Yura@mail.ru

Tatyana Anatol'evna Boyko

PhD, Docent of Department of Histology & Embryology The Institute "Medical Academy named after S.I. Georgievsky" "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"

Simferopol, Russian Federation

E-mail: tatyana_boyko_5@mail.ru

Svetlana Vladimirovna Harchenko

PhD, Docent of Department of Histology & Embryology The Institute "Medical Academy named after S.I. Georgievsky" "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"

Simferopol, Russian Federation

E-mail: kcharchenkos@mail.ru

Inna Alexeevna Demyanenko

PhD, Docent of Department of Histology & Embryology The Institute "Medical Academy named after S.I. Georgievsky" "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"

Simferopol, Russian Federation

E-mail: innademianenko@mail.ru

Igor Anatol'evich Lugin

PhD, Docent of Department of Histology & Embryology The Institute "Medical Academy named after S.I. Georgievsky" "V.I. Vernadsky Crimean Federal University"

Simferopol, Russian Federation

E-mail: iglug@list.ru

ГЕМОСТАТИЧЕСКИЕ И РЕПАРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПОРОШКОВ ЯБЛОЧНОГО И ЦИТРУСОВОГО ПЕКТИНОВ

В статье представлены данные о гемостатических и репаративных свойствах порошков яблочного и цитрусового пектинов в эксперименте на лабораторных животных. Остановка кровотечения из ран почки и печени с помощью порошков пектина наступает в течение 10 секунд с формированием прочного фиксированного сгустка. Морфологические данные говорят об ускорении репарации тканей паренхиматозного органа при отсутствии эозинофильной реакции.

Ключевые слова: лабораторные животные, раны паренхиматозных органов, пектины, гемостаз, репарация.

¹Pavlenko S.G., ²Evglevsky A.A., ³Berdysh D.S.
¹NSEPI HE "Kuban Medical Institute"
²FBGOU HE "Kuban State Medical University"
³FBGOU HE «Maikop State Technological University»

HEMOSTATIC AND REPARATIVE PROPERTIES OF APPLE AND CITRUS PECTIN POWDERS

The article presents data on the hemostatic and repair properties of apple and citrus pectin powders in an experiment on laboratory animals. Stopping bleeding from wounds of the kidney and liver with the help of pectin powders occurs within 10 seconds with the formation of a strong fixed clot. Morphological data indicate an acceleration of tissue repair of the parenchymal organ in the absence of an eosinophilic reaction.

Key words: laboratory animals, wounds of parenchymal organs, pectins, hemostasis, reparation.

Введение

Пектины обладают рядом полезных свойств, которые широко применяются в онкологии, в хирургии, в качестве дезинтоксикационной терапии, в пищевой промышленности в качестве стабилизаторов. В экспериментальной хирургии доказаны репаративные свойства пектинов на модели спаек брюшной полости. Уникальные свойства пектинов привлекают внимание большого числа исследователей самых разных специальностей. Роль полимеров в жизни человека является общепризнанной, и все области их применения в быту, промышленном производстве, науке, медицине, культуре трудно даже просто перечислить [1, 2]. Пектины представляют собой природные полисахариды, которые содержатся почти во всех высших растениях. Как вещество, пектин был открыт более 200 лет назад и впервые получен из корнеплода топинамбура. На территории России источниками пектиносодержащего сырья являются яблоки, сахарная свекла, цитрусовые, подсолнечник, клубни топинамбура и др. [3, 4]. Одним из важнейших свойств пектиновых веществ является их комплексообразующая способность, основанная на взаимодействии молекулы пектина с ионами металлов. Комплексообразующие свойства пектиновых веществ зависят от содержания свободных карбоксильных групп, то есть степени этерификации карбоксильных групп метанолом. Степень этерификации определяет линейную плотность заряда макромолекулы, а, следовательно, силу и способ связи катионов [5,6,7].

Целью исследования является проведение эксперимента на лабораторных крысах по получению данных о гемостатических и репаративных свойствах порошков яблочного и цитрусового пектина на модели раны почки и печени.

Материалы и методы.

Работа по исследованию гемостаза проводилась на печени и почках лабораторных крысах линии Wistar. 10 крыс подверглись резекции нижнего полюса почки, 10 – тангенциальному повреждению печени. 10 крыс составили контрольную группу. По результатам сравнительного анализа времени остановки кровотечения в условиях применения аппликационных кровоостанавливающих материалов в виде порошков яблочного и цитрусового пектинов показали, что все средства, включенные в исследование, обладают гемостатическими свойствами (табл. 1). Препараты для исследования фиксировались в забуференном растворе формалина, окраска выполнялась гематоксилин-эозином по стандартной методике.

Полученные результаты.

Пользуясь данными исследований на паренхиматозных органах животных видно, что при остановке кровотечения из почек: M_e^* для левой почки составило $1,5 \pm 0,01$ мл (яблочный пектин), M_e^* для правой почки составило $1,6 \pm 0,01$ мл (яблочный пектин). Для цитрусового пектина эти показатели составили M_e^* для левой почки $1,8 \pm 0,01$ мл., для правой почки $1,6 \pm 0,01$ мл. ($p < 0,001$) и ГКГ ($p < 0,05$) ($\chi^2_{набл} < \chi^2_{кр}$).

Гемостаз при использовании пектинов:

Время наступления гемостаза на поверхности раны: M_e^* для левой почки $10 \pm 0,1$ сек (яблочный пектин), для правой почки $10 \pm 0,1$ сек (яблочный пектин). Для цитрусового пектина: M_e^* для левой почки $11 \pm 0,1$ сек., для правой почки $12 \pm 0,1$ сек. ($p < 0,001$) и ГКГ ($p < 0,05$) ($\chi^2_{набл} < \chi^2_{кр}$).

Помимо хороших гемостатических свойств, порошки пектинов обладают выраженными репаративными свойствами и способны в разы ускорять регенеративные процессы в тканях.

Всем лабораторным крысам, которые использовались в серии экспериментов, проводились хирургические операции с секторальными резекциями печени и почек с последующим закрытием раны порошками пектинов. Органы не ушивались. В качестве сравнительных материалов и способов гемостаза использовалась гемостатическая губка и термическая коагуляция. По окончанию экспериментального времени органы извлекались и подвергались гистологической верификации. Статистически достоверными по отношению к контролю кровоостанавливающими свойствами ($p < 0,05$) обладают все опытные образцы пектинов.

Морфологические данные:

На 7-е сутки от начала эксперимента в группе контрольных животных в зоне термического воздействия, использованного для гемостаза раны, наблюдается наслоение масс тканевого детрита густой инфильтрацией мононуклеарами. На границе тканевых структур почки, частично сохранивших архитектонику, наблюдаются деструктивные изменения почечных канальцев и почечных телец в фазе альтерации. Сосуды полнокровны, а в ряде зон наблюдается имбибиция межклеточного вещества эритроцитами (рис. 1).

При гемостазе гемостатической губкой в зоне контакта с гемостатическим материалом имеются участки ткани в виде лакун, заполненных кровью. Наблюдаются явления отека межклеточного вещества; органная структура почки в целом сохранена; явления деструкции канальцевого аппарата и почечных телец выражены умеренно; в отдельных зонах препарата в межклеточном веществе заметно выделение гранул гемосидерина (рис. 2).

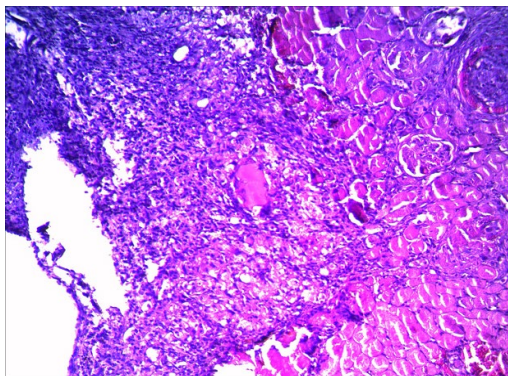


Рис. 1. Ткани почки после термокоагуляции. 7-е сутки эксперимента. Гематоксилин–эозин. Ув. 200х.

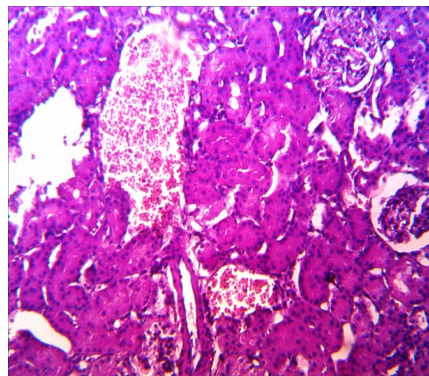


Рис. 2. Ткани почки при использовании гемостатической губки. 7-е сутки эксперимента. Гематоксилин–эозин. Ув. 200х.

При использовании в виде гемостатического вещества пектина, тканевая организация паренхимы почки сохранена. Явления альтерации клеток как в канальцах почек, так и в почечных тельцах, весьма умеренны, имеется незначительное расширение полости капсулы Шумлянско-Боумена (рис. 3).

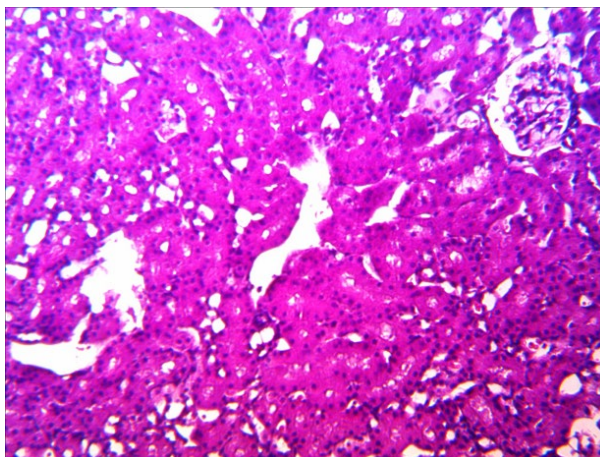


Рис. 3. Ткани почки при использовании пектина в качестве гемостатического препарата на седьмые сутки эксперимента. Гематоксилин–эозин. Ув. 200х

На 14-е сутки от начала эксперимента в группе контроля в зоне термического воздействия наблюдается постепенное восстановление тканевой организации почек. Деструктивные изменения почечных канальцев сохраняются. Явления отека межклеточного вещества носят выраженный характер. Заметны явления альтерации клубочкового аппарата (рис. 4).

При использовании гемостатической губки в качестве гемостаза в зоне контакта с гемостатическим материалом тканевая организация коркового вещества в значительной мере восстанавливается, в то же время сохраняются явления отека межклеточного вещества и деструкции канальцевого аппарата и почечных телец (рис. 5).

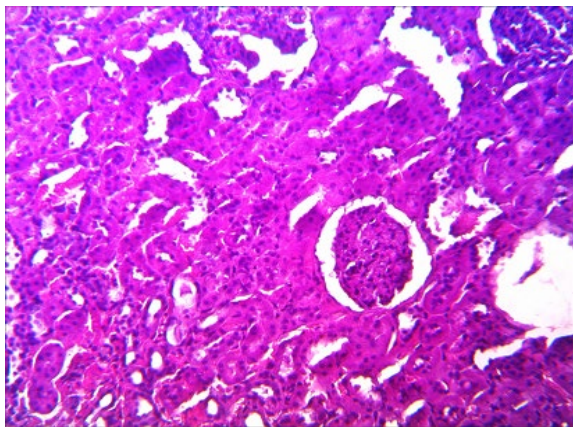


Рис. 4. Ткани почки после термокоагуляции. 14-е сутки эксперимента. Гематоксилин–эозин. Ув. 200х.

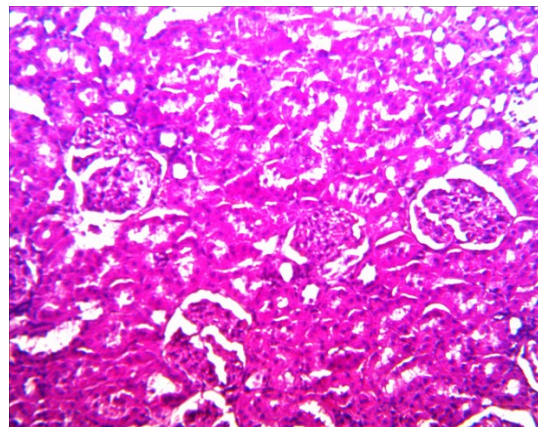


Рис. 5. Ткани почки при использовании гемостатической губки. 14-е сутки эксперимента. Гематоксилин–эозин. Ув. 200х.

При использовании для гемостаза препарата пектина тканевая организация паренхимы почки не отличается от интактной. Явления альтерации клеток как в канальцах почек, так и почечных тельцах, практически отсутствуют. Появляется хорошо заметная соединительнотканная структура, ограничивающая зону регенерации тканей (рис. 6).

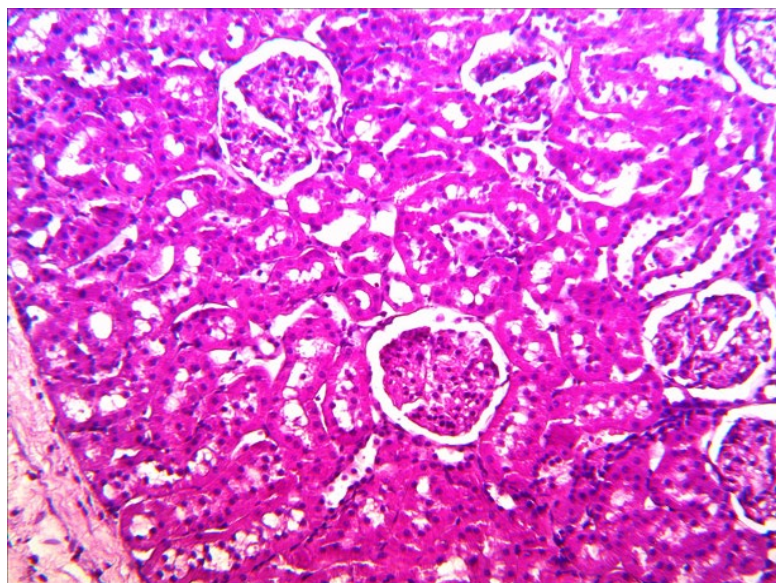


Рис. 6. Ткани почки при использовании препарата пектина в качестве гемостатического материала на 14-е сутки эксперимента. Гематоксилин–эозин. Ув. 200х

На 21-е сутки от начала эксперимента в группе контрольных животных в зоне термического воздействия наблюдается существенное восстановление тканевой организации почек, однако явления отека межклеточного вещества все еще сохранены (рис. 7). При использовании гемостатической губки также отмечаются умеренные признаки деструкции в зоне коркового вещества почек (рис. 8). В то же время при использовании для гемостаза препарата пектина тканевая организация паренхимы почки интактна (рис. 9).

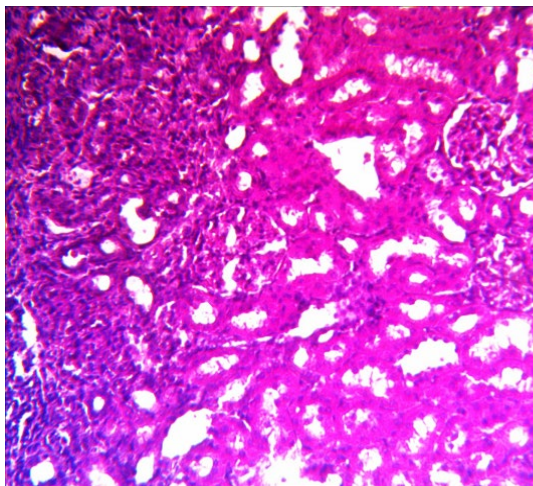


Рис. 7. Ткани почки после термокоагуляции. 21-е сутки эксперимента. Гематоксилин-эозин. Ув. 200х.

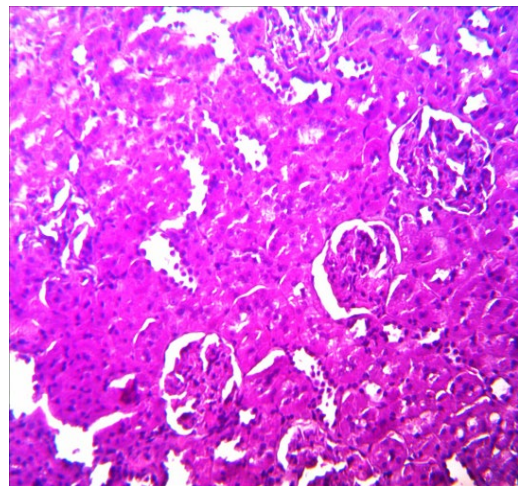


Рис. 8. Ткани почки при использовании гемостатической губки. 21-е сутки эксперимента. Гематоксилин-эозин. Ув. 200х.

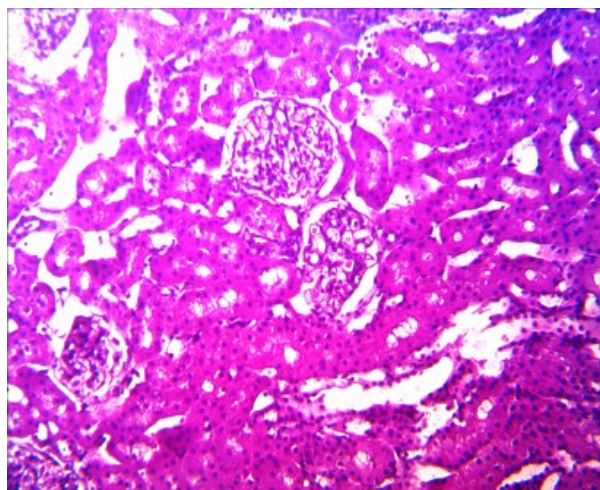


Рис. 9. Ткани почки при использовании препарата пектина в качестве гемостатического материала на 21-е сутки эксперимента. Гематоксилин-эозин. Ув. 200х.

В сравнительном анализе можно сказать, что при использовании порошков пектинов в качестве гемостатического и репаративного вещества в тканях полностью отсутствуют воспалительные компоненты и, по сравнению с контрольной группой и группой, где в качестве гемостатика применялась гемостатическая губка, состояния интактности органа наблюдаются уже на 7-е сутки.

В ходе экспериментов по изучению репаративных свойств *печени*, на основании гистологической верификации, сделаны следующие выводы:

На *третьи сутки* от начала опыта (рис. 10) с использованием порошков пектинов в репаративной ткани наблюдается выражения фагоцитарная активность. Ткань инфильтрирована макрофагами. Экссудативная реакция выражена слабо, с низким содержанием нейтрофилов. Умеренно выражена инфильтрация тучными клетками.

Слабо выражена пролиферация фибробластов на границе репарации. Организация коллагеновыми волокнами отсутствует.

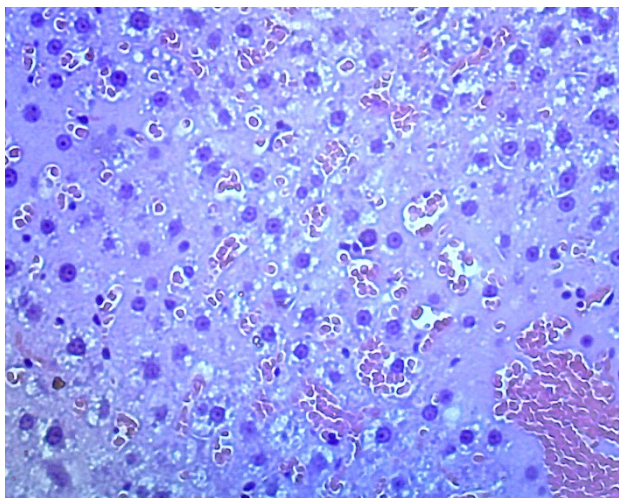


Рис. 10. Препарат печени. 3-и сутки от начала эксперимента. Гематоксилин–эозин. Ув. 200х.

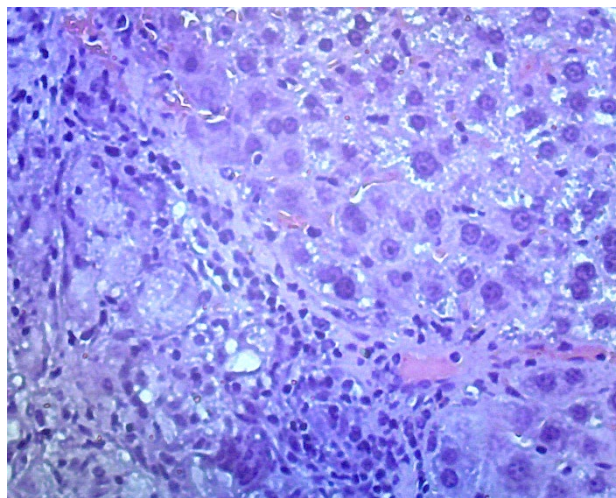


Рис. 11. Препарат печени. 7-е сутки от начала эксперимента. Гематоксилин–эозин. Ув. 200х.

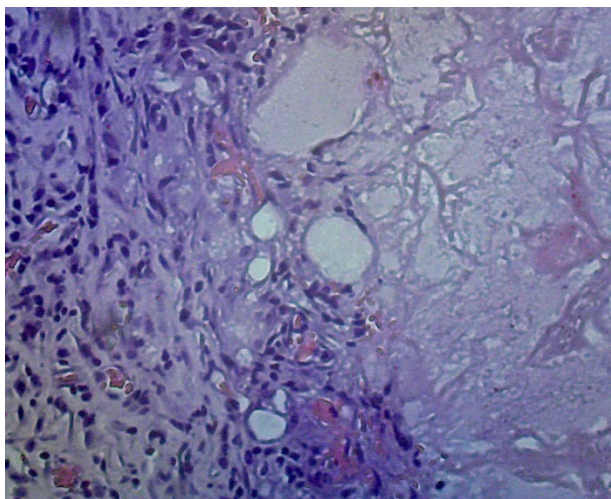
Умеренно выражена резорбция пектина, пектин инфильтративно пропитывает паренхиму. В печени наблюдаются дисциркуляторные расстройства (синусное полнокровие), выражена ядерно-цитоплазматическая диссоциация.

В гистологических образцах ткани печени, где в качестве гемостатического средства использовалась гемостатическая губка, наблюдаются шоковые состояния, вакуольная дистрофия и стаз. Зона соприкосновения гемостатической губки и паренхимы печени инфильтрирована макрофагами и нейтрофилами, выражен воспалительный компонент.

На **седьмые сутки** (рис. 11) в зоне репарации с порошками пектинов выражена фагоцитарная активность, экссудативная реакция отсутствует. Активная пролиферация фибробластов во всем репаративном слое, выраженное прорастание коллагеновых волокон. Слабо выражена мезенхимальная ткань в зоне репарации (признаки восстановления капсулы). Пектин расположен островковыми фрагментами и погружен в цитоплазму макрофагов. В ткани печени наблюдается дольковое строение, но выражено слабо. Ядерно-цитоплазматическая диссоциация отсутствует. Активный митоз.

В образцах с гемостатической губкой сохранены макрофагально-нейтрофильные реакции, стаз и полнокровие органа умеренно выражены, фибробластная пролиферация отсутствует.

На **четырнадцатые сутки** (рис. 12) в тканях с порошками пектинов слабо выражена фагоцитарная активность. Резко выражена фибробластная пролиферация, активное коллагеновое прорастание. Наблюдается плотный мезотелиальный слой с кровеносными сосудами. Сформирована капсула репаративного слоя. Пектин расположен одиночными зернами в цитоплазме макрофагов. В ткани печени наблюдается четкое дольковое строение, признаки дисциркуляторных расстройств отсутствуют.



*Рис. 12. Препарат печени. 14-е сутки
От начала эксперимента.
Гематоксилин-эозин. Ув. 200х.*

В образцах с пектином слабо выражены макрофагально-нейтрофильные реакции, шоковые состояния выражены слабо, пектин активно подвергнут резорбции, мезангий не развит, в зоне контакта фибриново-коллагеновая пробка. Фибробластная пролиферация слабо выражена.

Выводы.

1. Таким образом, можно сделать вывод, что использование порошков пектина в качестве гемостатического средства в лечении ран паренхиматозных органов является приемлемым в связи с высокой скоростью – до 10 секунд – образования прочного кровяного сгустка на поверхности раны – стойкого гемостаза.
2. Использование порошков цитрусового и яблочного пектинов вызывает увеличение скорости репарации тканей в несколько раз, при этом отсутствуют реакции воспаления, не наблюдаются эозинофильные реакции, интактность органа наступает через 3 дня. В ходе серии различных экспериментов на ранах паренхиматозных органов пектины показали надежность и качество гемостаза и репарации.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Пектин-полимер природного происхождения / Л. Ф. Зидиханова, Е. И. Кулиш, В. В. Чернова, А. С. Шуришина // Доклады Башкирского университета. – 2018. – Т. 3. – № 6. – С. 608-614. – EDN YTDDXV.
2. Зобкова, Н. В. Пектины как средства детоксикации. Комплексообразующие свойства пектинов / Н. В. Зобкова, Е. И. Глушихина // Оренбургские горизонты: прошлое, настоящее, будущее: Сб. материалов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 275-летию Оренбургской губернии и 85-летию Оренбургской области, Оренбург, 21–22 ноября 2019 года. – Оренбург: ООО "Фронтир", 2019. – С. 314-317. – EDN DDCGRE.
3. Мударисова, Р. Х. Комплексообразование яблочного пектина, модифицированного фармакофорами, с катионами марганца (II) в водных растворах / Р. Х. Мударисова, А. Ф. Сагитова, О. С. Куковинец // Химия растительного сырья. – 2020. – № 1. – С. 25-32. – DOI 10.14258/jcprm.2020015161. – EDN LZZQGT.
4. Aliyev, Sh. Study of the Pectin-based Beverage Preparation Technology from Fruits and Vegetables Grown in Azerbaijan / Sh. Aliyev, M. Khalilov, R. Saidov // Bulletin of Science

5. Sriamornsak P., Thirawong N., Nunthanid J. et al. // *Proc. 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.* 2006. V. 5. P. 93
6. Schmidgall J., Hensel A. // *Int. J. Biol. Macromolec.* 2002. V. 30. P. 217
7. Гилевская К.С., Грачева Е.А., Агабеков В.Е. // *Докл. НАН Беларуси.* 2013. Т. 57. № 3. С. 84.

Сведения об авторах

Сергей Георгиевич Павленко:

доктор мед. наук, профессор,
зав. кафедрой хирургических болезней Кубанского медицинского института.

Краснодар, Россия

Эл. почта: drpaulson@mail.ru

Андрей Александрович Евглевский:

кандидат мед. наук, доцент кафедры гистологии, старший научный сотрудник отдела иммунологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО Кубанского государственного медицинского университета.

Краснодар, Россия

Эл. почта: evglander@mail.ru

Денис Сергеевич Бердыш:

аспирант кафедры хирургии ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет».

Эл. почта: drberdysh@bk.ru

Information about authors

Sergey Georgievich Pavlenko:

MD, Professor. Head of the Department of Surgical Diseases at the Kuban Medical Institute.

Krasnodar, Russian Federation

E-mail: drpaulson@mail.ru

Andrey Alexandrovich Evglevsky:

Candidate med. Sci., Associate Professor, Department of Histology, Senior Researcher, Department of Immunology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University.

Krasnodar, Russia

E-mail: evglander@mail.ru

Denis Sergeevich Berdysh:

Postgraduate student of the Department of Surgical Diseases at the Maikop Tecnology University.

Email: drberdysh@bk.ru

УДК 612-092

ГРНТИ 76.03.53

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.71-81

А.Д. Черкасов

ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии

Е.Н. Петрова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича
Российской академии наук

СПАСТИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ МЫШЦ ПОЗВОНОЧНИКА. ПРИЧИНЫ И ПРОФИЛАКТИКА

В статье обсуждаются причины возникновения спастических состояний межпозвоноковых мышц. Мы считаем, что спастические состояния межпозвоноковых мышц и остеохондроз позвоночника вызываются неизвестным нейротоксином, вырабатываемым микрофлорой кишечника. Спастические состояния мышц позвоночника и вызываемый ими остеохондроз позвоночника могут быть предотвращены сменой микрофлоры кишечника.

Ключевые слова: МРТ, суставы, мышцы, миофасциальный синдром, остеохондроз позвоночника, спастические состояния мышц.

A.D. Cherkasov

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology

E.N. Petrova

Institute for Information Transmission Problems (Kharkevich Institute), Russian Academy of Sciences

SPASTIC CONDITIONS OF THE SPINE MUSCLES. CAUSES AND PREVENTION

The article discusses the causes of spastic conditions of the intervertebral muscles. We believe that spastic conditions of the intervertebral muscles and osteochondrosis of the spine are caused by an unknown neurotoxin produced by the intestinal microflora. Spastic conditions of the muscles of the spine and the resulting osteochondrosis of the spine can be prevented by changing the intestinal microflora.

Key Words: MRI, muscle, knee, spine, osteochondrosis, spastic, neurologic syndromes, rehabilitation.

Введение

По данным ВОЗ в развитых странах болями в спине и позвоночнике страдают в течение своей жизни 80% жителей. Остеохондрозом позвоночника страдает практически каждый человек. Страдания этих людей делятся десятилетиями и уже более 50 лет проблема болей в суставах и позвоночнике не поддается решению.

Боли в коленных суставах встречаются достаточно часто. Это заметно, когда наблюдаешь, как некоторые люди поднимаются по лестницам, переступая со ступеньки на ступеньку только одной ногой. При обращении к врачу-ортопеду врач ставит диагноз артрит – воспалительный процесс в тканях сустава, а при назначении МРТ-исследования не всегда, но часто обнаруживаются изменения структуры костной ткани и скользящих синовиальных поверхностей сустава. В этом случае пациенту ставится диагноз – артроз коленного сустава.

Однако во многих случаях МРТ-исследования показывают, что в коленных суставах при болях отсутствуют проявления артрита и артроза. Но что же тогда вызывает адскую боль в суставах? При наблюдении за больными было замечено, что в положении лёжа на спине небольшие перемещения ног или изменения позы приводят к исчезновению боли в суставе на некоторое время. Проф. Л.Ф. Васильева объясняет этот феномен наличием обратимого функционального нарушения – функционального блока в мышцах – гипертонуса мышц [1]. То есть боль вызвана не артритом или артрозом, а нарушениями в работе мышц. Как правило, этот феномен встречается у молодых людей, когда артроза ещё не может быть, а проявления артрита (опухание сустава) также отсутствуют.

До конца 80-х годов прошлого века причиной болей в спине считали радикулит – воспаление нервных корешков. Нервные корешки – это очень короткие пучки нервов длиной 4 мм, выходящие непосредственно из спинного мозга. Уже в 20-х — 30-х годах прошлого века появились первые работы ортопедов и нейрохирургов, в которых основная роль в возникновении поясничных болей отводилась позвоночнику. Остеохондроз позвоночника впервые описал в 1933 г. Хильдебрант (A. Hildebrandt). Под остеохондрозом позвоночника (ОП) первоначально понимали истончение межпозвонковых дисков, их обезвоживание, снижение тургора, фрагментацию пульпозного ядра, истончение гиалиновых пластин, радиальные и концентрические щели, внедрение пульпозного ядра в субстанцию тел позвонков — грыжа Шморля.

После выхода монографии проф. Я.Ю. Попелянского в конце 70-х годов причиной болевых синдромов стали считать компрессию нервных корешков, вызванную дистрофическим состоянием межпозвонковых дисков, а именно: снижение толщины межпозвонкового диска [8]. Благодаря авторитетным работам Я.Ю. Попелянского и его школы безраздельно утвердился взгляд на поясничные боли как результат остеохондроза позвоночника, в который включают и грыжи дисков. Термин же «остеохондроз», к сожалению, настолько прочно вошел в медицинский обиход, что стал синонимом

Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

самого болевого синдрома. Причиной остеохондроза позвоночника Попелянский считал прямохождение человека. При этом он утверждал, что дистрофические процессы первичны, а болевые синдромы являются их следствием.

Затем первое место среди причин поясничных болей стали отводить грыжам межпозвоночных дисков – выпячиванию диска в канал спинного мозга. Причины болей видели в компрессии нервных корешков грыжами дисков. Третьим источником боли назвали миофасциальные синдромы. Эти болевые синдромы развиваются в поверхностных мышцах спины и характеризуются наличием триггерных точек – участков мышцы, нажатие на которые вызывает сильную боль.

Все эти гипотезы родились до развития магнитно-резонансной томографии (МРТ) и компьютерной томографии (КТ) на основе данных рентгенографии, метода, на тот момент, неспособного детализировать мелкие структуры позвоночника. В последние два десятилетия в связи с появлением новых данных по развитию остеохондроза произошел пересмотр причин развития остеохондроза, происхождения болей в спине и пояснице, а также стратегии лечения заболеваний позвоночника.

Доктор Вольф (по Васильев А. Ю., Витько Н. К., 2000 [2]) привел результаты обследования 50000 пациентов с пояснично-крестцовой радикулопатией: 40% пациентов с изменениями на рентгенограммах не имели клинических проявлений и, наоборот, 40% больных имели клиническую симптоматику без рентгенологической. И только у значительно меньшего процента обследованных лиц боли в позвоночнике совпадают с областями дистрофических проявлений в дисках. (Wolf G.D., Вена, 1995 г. Материалы международного симпозиума по ортопедии.)

В 1998 была опубликована книга М.Я. Жолондза «Остеохондроз позвоночника — заблуждение». М.Я. Жолондз показал, что боли в позвоночнике, считающиеся проявлением остеохондроза, устраняются методами рефлексотерапии, в то время как остеохондроз как проявления дистрофии и грыжи дисков сохраняются [6].

Главный научный сотрудник Российского центра рентгено-радиологии доктор медицинских наук П.Л. Жарков пишет о теории остеохондроза: «... умозрительные утопические учения приносят вред не только общественным, но и конкретным природо-ведческим наукам, и в частности медицине. Примером этому может служить наше отечественное изобретение — учение об остеохондрозе как причине не только всех болей в области позвоночника, но и практически всех болевых синдромов в опорно-двигательной системе. Результат таких учений один — вред медицинской науке и больному, поскольку, создавая видимость научной обоснованности, эти лженаучные учения тормозят развитие настоящих продуктивных научных исследований» [5].

На теории остеохондроза воспитывается уже несколько поколений врачей различных специальностей — неврологов, ортопедов, ревматологов, терапевтов, хирургов и рентгенологов. Но в этой теории имеется ряд принципиальных ошибок, описанных П. Л. Жарковым [3, 4, 5]. Остеохондрозу по этой теории приписываются множество неврологических синдромов, которые на самом деле являются миофасциальными синдромами.

По мнению П.Л. Жаркова «никаких корешковых синдромов в естественных условиях не бывает и в принципе быть не может, а такие диагнозы как корешковый синдром, радикулит, остеохондроз позвоночника (в качестве неврологического диагноза при болях) следует расценивать как курьёз, обусловленный явно недостаточной анатомической грамотностью врача. Болевой синдром в позвоночнике нельзя отождествлять с патоморфологией остеохондроза» [4].

Из этого следует, что неврологические синдромы — боли в спине, позвоночнике и конечностях напрямую не связаны с реальным остеохондрозом позвоночника, протрузиями и грыжами.

На основе собственных исследований Жарков пишет следующее: «В современной медицине бытует представление, что костные остеохондрозные разрастания и, особенно, грыжи и выпячивания межпозвоночных дисков травмируют корешки

спинномозговых нервов, что приводит к болевым синдромам. Такие представления абсолютно не состоятельны, поскольку, во-первых, за пределами спинномозгового канала (дурального мешка) нет корешков, а есть только спинномозговые нервы, повреждения которых проявляются вовсе не болями, а выпадением двигательных и чувствительных функций. Во-вторых, спинномозговые нервы выходят из позвоночного канала в верхней части межпозвонкового отверстия, непосредственно под дугой верхнего (в позвоночном сегменте) позвонка, тогда как межпозвонковый диск, его грыжи и выпячивания располагаются на уровне нижней трети межпозвонкового отверстия. То есть нервы и диски расположены в разных (параллельных друг другу) поперечных (позвоночнику) плоскостях» [4]. Теория остеохондроза как источника болей в спине оказалась несостоятельной.

Диагноз «Остеохондроз позвоночника» в 2020 г был изъят из Международной Классификации Болезней одиннадцатой редакции (МКБ — 11). В настоящее время причины болей в спине в 80% случаев в отсутствие грыж позвоночника считаются неизвестными, и эти болевые синдромы названы неспецифическим болевым синдромом. Остальные 20% болей называются специфическими болевыми синдромами, вызванными грыжами дисков.

Остеохондрозу позвоночника и болям в спине посвящены около десяти монографий и десятки научных статей. Но где скрывается источник боли - остается неизвестным. Все публикации на тему остеохондроза имеют одну примечательную особенность. В них не описываются межпозвонковые мышцы позвоночника, но описываются межпозвонковые связки [1, 7]. Позвоночник по всей длине стягивается тремя связками: передняя продольная связка, задняя продольная связка и желтая связка. Они представляют собой длинные полосы из коллагеновых волокон, не позволяющие позвоночнику растягиваться и разрывать спинной мозг. Связки, с одной стороны, ограничивают подвижность позвоночника на изгиб более чем на 45 градусов, а с другой стороны не оказывают противодействия внешним силам, действующим на изгиб, кроме усилия на растяжение. Следовательно, прочность позвоночника обеспечивается напряжением коротких межпозвонковых мышц, соединяющих и стягивающих каждые соседние позвонки. Это три пары мышц на каждый сегмент позвоночника (позвонок и межпозвонковый диск). Однако, в медицинской литературе, посвященной позвоночнику, за исключением учебников по анатомии, описание этих мышц не встречается.

Цель исследования. На основе данных МРТ диагностики позвоночника выявить структуры, ответственные за развитие остеохондроза позвоночника как дистрофического процесса.

Результаты.

Обследование состояния мышечного корсета позвоночника с помощью функциональных проб на латерофлексию.

Мы провели изучение подвижности сегментов позвоночника по 100 функциональным пробам наших пациентов на латерофлексию – изгибы позвоночника в стороны. Мы получили данные о том, что в областях с болевым синдромом в позвоночнике значительно снижена или отсутствует полностью подвижность сегментов позвоночника относительно друг друга. Области с нарушениями подвижности сегментов позвоночника называются функциональными мышечными блоками – напряженными мышцами позвоночника (ФМБ). По мнению ортопедов и мануальных терапевтов ФМБ возникают как защита сегментов позвоночника, подверженных остеохондрозу позвоночника, от дальнейшего травмирования при изгибах. ФМБ, в основном, обнаруживаются в грудном отделе позвоночника. В 50% случаев они не вызывают болевые синдромы. Однако мануальная диагностика глубоких мышц позвоночника показала, что боль в этих зонах возникает при вибрационном воздействии на паравертебральные зоны – области, отстоящие от остистых отростков позвоночника на 2-3 см.

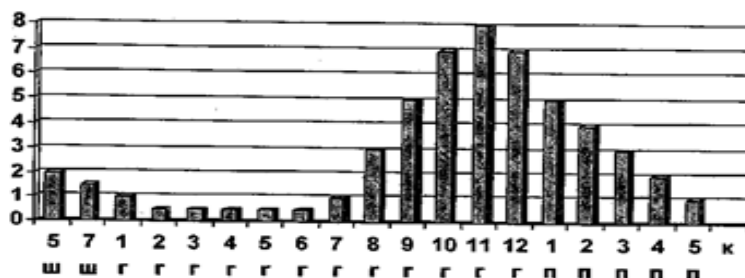
Обследование состояния подвижности сегментов позвоночника спортсменов показало, что из 20 спортсменов только 6 не имели проблем с мышцами позвоночника.

На рис. 1 показаны примеры функциональных проб спортсменов.

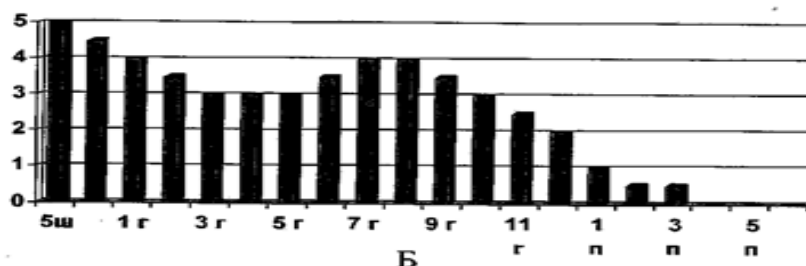


Рис. 1. Пример измерения подвижности сегментов позвоночника. У спортсмена слева заблокированы верхнегрудной и среднегрудной отделы позвоночника. Данный спортсмен более года страдает болями в спине. Спортсмен справа имеет хорошую подвижность верхнегрудного отдела позвоночника. Болевой синдром в спине отсутствует.

Измерение углов, на которые может изгибаться позвоночник при наклонах в сторону, показало наличие областей с ограниченной подвижностью позвоночных двигательных сегментов (ПДС) или их полной неподвижностью (рис. 1, фото слева). В норме подвижность ПДС должна составлять 5 градусов. У первого обследованного спортсмена полностью заблокирован верхнегрудной отдел позвоночника и имеется гиперподвижность грудопоясничного перехода. У второго спортсмена подвижность ПДС лишь слегка снижена (рис. 1, фото справа).



А



Б

Рис. 2. А. Диаграмма подвижности позвоночных сегментов в грудном и поясничном отделах позвоночника 1-го спортсмена. Суммарная (в обе стороны) подвижность позвоночника составляет 60 градусов. По оси ординат угол наклона в градусах. По оси абсцисс номера позвонков, обозначения: ш — шейный, г — грудной, п — поясничный отделы позвоночника.

Б. Диаграмма подвижности позвоночных сегментов в грудном и поясничном отделах позвоночника 2-го спортсмена. Суммарная (в обе стороны) подвижность позвоночника составляет 90 градусов. По оси ординат угол наклона в градусах. По оси абсцисс номера позвонков, обозначения: ш — шейный, г — грудной, п — поясничный отделы позвоночника.



Рис. 3. Пример подвижности сегментов позвоночника при регулярных занятиях гимнастикой для позвоночника.

У лиц, которые регулярно в течение ряда лет занимались специальной гимнастикой для позвоночника или китайской гимнастикой Цигун, картина подвижности позвоночника выглядит иначе (рис. 3). Обследуемая женщина 40 лет, более 10 лет занимающаяся китайской гимнастикой для позвоночника (рис. 4).

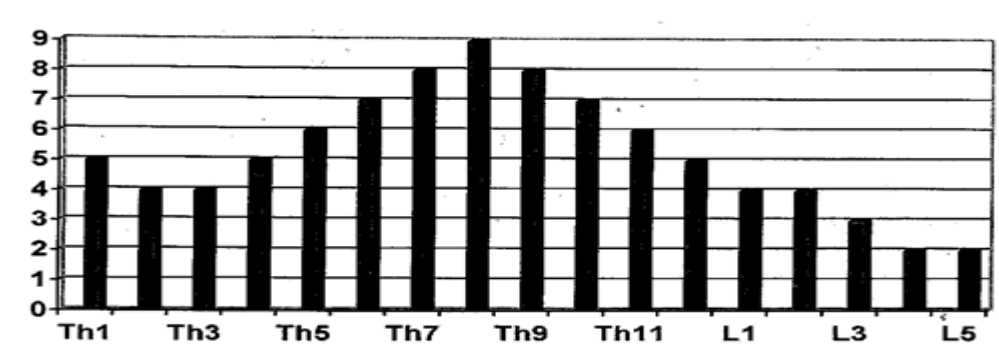


Рис. 4. Диаграммы суммарной (в обе стороны) подвижности позвоночных сегментов при регулярных занятиях гимнастикой для позвоночника. Общий суммарный изгиб позвоночника составляет 88 градусов, что составляет норму для лиц молодого возраста при возрасте обследуемой в 40 лет.

МРТ исследование причин развития остеохондроза позвоночника

Мы изучили более 600 заключений врачей лучевой диагностики по МРТ исследованиям состояния тканей позвоночника у пациентов с сильной болью в позвоночнике. Ни в одном из них мы не нашли заключения о состоянии межпозвонковых мышц, за исключением формулировок: «мягкие ткани без изменений». Здесь имеется ввиду диагностика новообразований. Наши двадцатилетние исследования привели нас к заключению, что именно межпозвонковые мышцы, находясь в спазмированном состоянии, являются источником болевых синдромов. Мы опровергаем представление о том, что дистрофические изменения возникают раньше спастических состояний мышц и, соответственно, болевых синдромов.

Приведём в качестве примера МРТ обследование одного из наших пациентов. На

Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

МРТ снимке грудного отдела девушки 17 лет, в течение трех лет страдавшей болями в спине во всем грудном отделе, обнаружены дистрофические изменения в межпозвоночных дисках (рис. 5). На этом снимке мы видим начальные проявления остеохондроза в области 12-го грудного позвонка, выраженные в небольшом снижении толщины диска, изменении его структуры — разрушается пульпозное ядро и возникают неровности на поверхности позвонка, примыкающего к этому диску. Это начальная стадия грыжи Шморля — внедрение диска в тело позвонка. Нами были обнаружены область сниженной подвижности верхнегрудного отдела позвоночника (рис. 6).

На рис. 6 показаны функциональные пробы на латерофлексию. Диаграмма подвижности сегментов позвоночника, построенная на основе функциональных проб (рис. 7), показывает, что грудной отдел позвоночника заблокирован. В области 9 – 11 грудных позвонков имеется сколиоз – искривление позвоночника в левую сторону. Боль в спине имеется в области с 6-го грудного позвонка по 9-й. В этой области мы можем наблюдать истончение подкожно-жировой клетчатки и более темный тон мышц позвоночника, который указывает на большее, чем в норме, содержание воды в мышцах и сокращение доли липидов. При данном режиме исследования на снимках структуры, содержащие жир, видны как самые яркие структуры (подкожно-жировая клетчатка и спинной мозг), а все жидкости, не имеющие в своем составе липиды, отображаются как самые темные структуры.



Рис. 5. МРТ грудного отдела позвоночника девушки 17 лет. Имеется начальная стадия остеохондроза позвоночника в области 12-го грудного позвонка.

Дистрофический процесс в позвоночнике начался в области 12-го грудного позвонка и привел к изменению структур межпозвоночных дисков по обе стороны от позвонка. В этих дисках уже отсутствует пульпозные ядра, которые в других дисках отображаются светлыми полосами. В области 6 – 9 позвонков дистрофический процесс отсутствует, а болевой синдром имеет максимальный уровень. Со временем и в этой области начнется дистрофический процесс, если спастические состояния мышц не будут устранены.

Обнаруженное нами спастическое состояние мышц позвоночника в среднегрудном отделе имело место еще за 3 года до МРТ обследования позвоночника. Это

Секция 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА В ТРЕТЬЕМ ТЫСЯЧЕЛЕТИИ

позволяет предположить, что спастические состояния межпозвоковых мышц предшествуют дистрофическим процессам в дисках и позвонках.



Рис. 6. Пример измерения подвижности сегментов позвоночника.

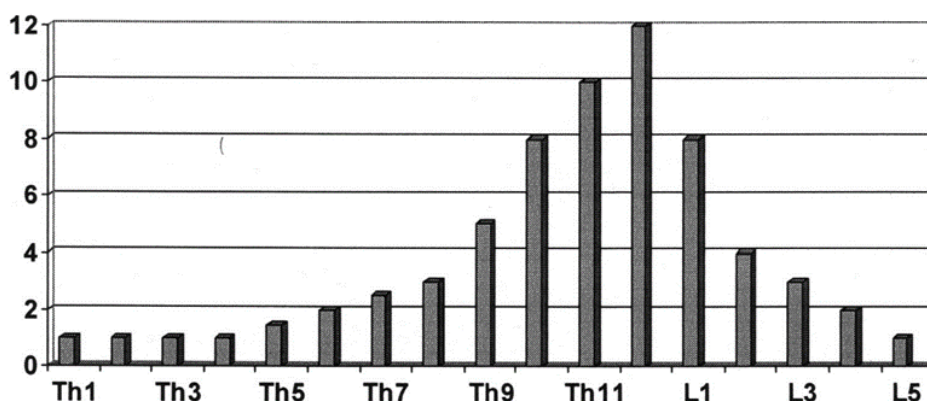


Рис. 7. Диаграмма подвижности сегментов позвоночника при латерофлексии пациентки 17 лет.

Спастические состояния межпозвоковых мышц можно видеть на снимке другого пациента в возрасте 23-х лет. Он был нашим пациентом, и у него имелся болевой синдром в области 8-го грудного позвонка. На МРТ-снимке (рис. 8), мы видим один межпозвоковый диск, имеющий сниженную толщину. Пульпозное ядро в этом диске уже отсутствует. Это проявление остеохондроза позвоночника. Мышцы в области болевого синдрома имеют темный фон, указывающий на присутствие жидкости (воды) и отсутствие жировых прослоек.



Рис. 8. МРТ исследование грудного отдела позвоночника пациента 23 лет.

Обсуждение

Прочность позвоночника поддерживается межпозвонковыми мышцами: межостистыми, межпоперечными и поперечно-остистыми. Именно эти мышцы позволяют человеку сохранять форму позвоночника при больших физических нагрузках. Медикам трудно поверить, что сила совместного напряжения этих мышц составляет до 5 тонн на каждый сегмент позвоночника при выполнении тяжелых физических нагрузок. На Востоке йоги показывают такой трюк. Йог ложится животом вверх, опираясь только шеей на спинку одного стула и ахилловым сухожилием на спинку другого стула. Ему на живот, грудь и бедра встают трое взрослых мужчин. При этом позвоночник йога практически не прогибается. Это состояние называется каталептический мост.

В отличие от рентгенографии и компьютерной томографии, МРТ позволяет оценить состояние тканей, т.к. картина МРТ снимка содержит информацию не только о форме объекта исследования, но и о его химическом составе. Анализ МРТ-снимков позволил определить патологическое состояние мышц позвоночника при начальных стадиях развития остеохондроза позвоночника. Нашими пятнадцатилетними исследованиями на молодых пациентах показано, что развитию остеохондроза, которое в отдельных случаях начинается уже в 14-летнем возрасте как дистрофический процесс, предшествуют болевые синдромы в области позвоночника. В своей практике мы встречали случаи сильных болей в спине в возрасте 7, 13 и 15 лет. Это были мышечные боли, вызванные спастическими состояниями мышц спины. МРТ исследования показали патологическое состояние межпозвонковых мышц в области болевого синдрома, в то время, когда остеохондроз позвоночника ещё не развился. Патологические состояния мышц проявлялись как области мышечного корсета позвоночника с более темным тоном по отношению к тону мышц за пределами болезненного участка позвоночника [9, 10]. Это связано с более высоким содержанием воды в мышцах и более низким содержанием липидов. Данное состояние однозначно интерпретируется как воспалительный процесс в мышцах – миозит и последующий отек.

Исследования подвижности сегментов позвоночника, мануальная диагностика и термография областей позвоночника с болевым синдромом показали, что неврологические синдромы в спине и позвоночнике, которые отождествляют с остеохондрозом позвоночника, вызываются спастическими состояниями межпозвонковых мышц. Эти состояния проявляются как мышечные блоки в мышечном корсете позвоночника – области нарушения подвижности нескольких смежных двигательных сегментов позвоночника.

Спастические состояния мышц приводят к нарушению кровообращения и тропики позвонков, вызывая развитие остеохондроза позвоночника как необратимого дистрофического процесса в костной и хрящевой ткани. Это приводит к преждевременному старению позвоночника – остеохондрозу позвоночника. При этом спазмированные глубокие межпозвоночные мышцы позвоночника вызывают боль не только в позвоночнике, но во внутренних органах и в конечностях.

Причины возникновения спастических состояний в мышцах

Наши двадцатилетние наблюдения показали, что спастические состояния в мышцах спины и в мышцах суставов часто возникают на следующий день после употребления избыточного количества сахара, риса и мучных изделий. Эти наблюдения указывают на то, что микрофлора кишечника вырабатывает неизвестный на сегодняшний день нейротоксин, вызывающий нарушения работы кальциевых насосов в мышцах. Напряжение мышечного волокна возникает при пассивном входе в цитоплазму миоцита ионов кальция по электрическому и концентрационному градиенту. Для расслабления мышечного волокна из его цитоплазмы кальций удаляется кальциевыми насосами против электрического и концентрационного градиентов.

Реабилитация при болевых синдромах в мышцах

Нами показано, что радикальная смена микрофлоры кишечника на лактобактерии и бифидобактерии устраняет болевые синдромы в суставах и в скелетной мускулатуре, вызванные спастическими и посттравматическими состояниями мышц. По всей вероятности, исходя из состава пищи, приводящей к развитию болевых синдромов, токсины вырабатываются какими-то видами дрожжей или других грибков, обитающих в кишечнике. Наблюдения за нашими пациентами, страдающими болями в позвоночнике и суставах, выявили два основных фактора, приводящих к развитию долговременной мышечной спастики. Это избыточное потребление сахара и крахмала при недостатке витамина В1. Нами было проверено, что устранение двух этих факторов приводит к исчезновению болей в суставах, которые считаются следствием артрозов и артритов, при сохранении имеющих место артрозов. Мы рассматриваем боли в спине, мышцах и суставах как европейский более легкий вариант болезни бери-бери или гиповитаминоз витамина В1 (от сингальского *beri* — слабость; синоним: алиментарный полиневрит, эндемический полиневрит, В1-авитаминоз). Эпидемия этого заболевания в конце XIX и в начале XX веков, разразившаяся в юго-восточной Азии, была вызвана употреблением очищенного риса. Эта эпидемия уносила в год более 200 000 жизней. За установление роли нехватки витамина В1 в развитии этого заболевания Христиану Эйкману была присуждена Нобелевская премия.

Для устранения спастических состояний в межпозвоночных мышцах необходима гимнастика для позвоночника [11].

Выводы

1. Многолетние спастические состояния мышц позвоночника приводят к нарушению кровообращения в позвонках и развитию дистрофических процессов. Фактически остеохондроз позвоночника является преждевременным старением костно-хрящевых тканей позвоночника.
2. Болевые синдромы в спине, пояснице и шее также не являются заболеваниями, которые могут быть вылечены с помощью медикаментов. Они вызваны обратимым нарушением функционального состояния межпозвоночных мышц.
3. Развитие остеохондроза позвоночника может быть предотвращено и остановлено на протяжении всей жизни пациента методами устранения спастических состояний межпозвоночных мышц – массажем мышц спины и позвоночника по принципам миофасциального релизинга (расслабления глубоких мышц позвоночника), гимнастикой для позвоночника и обязательным употреблением витамина В1.
4. Проблемы болевых синдромов в суставах, в спине и остеохондроза позвоночника не являются медицинскими проблемами, а являются проблемами физической культуры и правильного питания.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: Болевые синдромы в позвоночнике вызваны спастическими состояниями межпозвоночных мышц под действием неизвестного в настоящее время нейротоксина, вырабатываемого микрофлорой кишечника. Спастические состояния мышц могут быть устранены радикальной (в результате очищения кишечника) сменой микрофлоры на лактобактерии. Для устранения болей, вызванных спастическими состояниями межпозвоночных мышц, дополнительно необходима регулярная гимнастика для позвоночника.

Литература:

1. Васильева Л.Ф. *Функциональные блоки суставов позвоночника и конечностей. (Мануальная диагностика и терапия с основами прикладной кинезиологии).* / Л.Ф. Васильева. – Новокузнецк: ОАО «Новокузнецкий полиграфкомбинат», 1999. – 159 с.
2. Васильев А.Ю., Витько Н.К. *Компьютерная томография в диагностике дегенеративных изменений позвоночника* / А.Ю. Васильев, Н.К. Витько. – М.: Видар-М, 2000. – 116 с.
3. Жарков П.Л. *Поясничные боли.* / П.Л. Жарков, А.П. Жарков, С.М. Бубновский. – М.: ООО «Юниартпринт», 2001. – 143 с.
4. Жарков П.Л. *Что такое остеохондроз в клинической практике?* / П.Л. Жарков // Бюллетень №5. XIII-я конференция мануальных терапевтов. Актуальные вопросы мануальной терапии. – Москва, 2003, – С. 97-98.
5. Жарков П.Л. // XV-я конференция мануальных терапевтов. Актуальные вопросы мануальной терапии. Бюллетень №7. – М., 2005. – С. 132 – 134.
6. Жолондз М.Я. *Медицина против медицины. Остеохондроз позвоночника – заблуждение* / М.Я. Жолондз. – СПб.: Лань, 1996.
7. Жулев Н.М. и др. *Остеохондроз позвоночника. Руководство для врачей.* / Н.М. Жулев, Ю.Н. Бардзгардзе, С.Н. Жулев. – СПб.: Лань, 1999.
8. Попелянский Я.Ю. *Болезни периферической нервной системы.* / Я.Ю. Попелянский. – М.: Медицина, 1989.
9. Черкасов А.Д. *Пути предотвращения остеохондроза позвоночника. Часть 1. Локализация дегенеративно-дистрофических изменений в позвоночнике.* // *Фундаментальные исследования.* – 2008. - № 7. – С. 41-44.
10. Черкасов А.Д. *Пути предотвращения остеохондроза позвоночника. Часть 2. Характеристики мышечных блоков в позвоночнике.* // *Фундаментальные исследования.* – 2008. - № 7. – С.45-49.
11. <http://healthsys.ru>.

Сведения об авторах

Черкасов Анатолий Данилович

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии.

Москва, Россия

Эл. почта: healthsys@mail.ru

Петрова Елена Николаевна, кандидат физико-математических наук, с.н.с.

ИППИ РАН

Москва, Россия

Эл. почта: petrova@iitp.ru

Information About the Authors

Cherkasov Anatoly Danilovich

PhD(PhD Biol), Senior researcher
Research Institute of General Pathology and Pathophysiology

Moscow, Russian Federation

E-mail: healthsys@mail.ru

Petrova Elena Nikolaevna

PhD(PhD Math), Senior researcher
Institute for Information Transmission Problems (Kharkevich Institute), Russian Academy of Sciences

Moscow, Russian Federation

E-mail: petrova@iitp.ru

УДК 577.122+577.152]:616.14-005.6
ГРНТИ 34.17.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.82-85

**Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин,
И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе**
Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ E-СЕЛЕКТИНА И NO СИНТАЗ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ВЕНОЗНЫМ ТРОМБОЗОМ

В статье представлены результаты исследования уровня E-селектина, NO-синтаз в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом по сравнению со здоровыми донорами, и их взаимосвязь.

Ключевые слова: адгезивная функция эндотелия; iNO-синтаза, eNO-синтаза, молекулы адгезии, селектин E

**N.V. Korotkova, R.E. Kalinin,
I.A. Suchkov, N.D. Mzhavanadze**
Ryazan State Medical University

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE LEVEL OF E-SELECTIN AND NO SYNTHASES IN PATIENTS WITH ACUTE VENOUS THROMBOSIS

The article presents the results of a study of the level of E-selectin, NO-synthase in the blood serum of patients with acute venous thrombosis compared with healthy donors, and their relationship.

Key words: adhesive function of the endothelium; iNO-synthase, eNO-synthase, adhesion molecule

Введение

Согласно настоящим представлениям, эндотелий представляет собой монослой эндотелиальных клеток, прочно связанных между собой межклеточными контактами и выполняющим пара-, ауто- и эндокринную функции вследствие того, что синтезирует большое количество биологически активных субстанций, действию которых подвергаются практически все органы и системы человеческого организма. Из важнейших функций эндотелия необходимо отметить такие, как гемостатическая, ангиогенная, вазомоторная, а также адгезивная [1, с. 659]. В обеспечении последней задействованы молекулы межклеточной адгезии, одним их семейств является семейство селектинов – гликопротеинов, обеспечивающих связывание и трансвазацию лейкоцитов в окружающие ткани [2, с. 2835]. В настоящее время открыт ряд факторов, которые способны усиливать экспрессию селектинов, к примеру, такие, как гипергликемия, гипоксия, действие цитокинов – IL-6, IL-1, ФНО-α. Изучается влияние на указанный процесс оксида азота, тем не менее, остается много нераскрытых моментов в данном направлении исследований [3, с. 28].

E-селектин является молекулой межклеточной адгезии; представляет собой гликопротеин. Экспрессия E-селектина осуществляется эндотелиоцитами и является индуцибельной; так, в стимулированных провоспалительными цитокинами эндотелиоцитах она повышается. Основная его функция - привлечение лейкоцитов из кровотока в очаг повреждения при воспалительных и иммунных заболеваниях [4, с.1878]. Молекула E-селектина имеет трансмембранное положение, и, соответственно, в структуре выделяют цитоплазматический хвост, трансмембранный домен, и экстрацеллюлярную часть, которая может подвергнуться протеолитическому шеддингу, в результате чего в

кровь попадает растворимый фрагмент sE-селектин (*soluble E-selectin*), определение концентрации которого используется в научных целях.

Венозный тромбоз (ВТ) – потенциально опасное для жизни состояние, является одним из основных осложнений сердечно-сосудистых заболеваний. По статистике среди патологий сосудов он находится на третьем месте после ишемической болезни сердца и ишемического инсульта [5, с.116; 6, с.548]. При этом нарушается нормальное функционирование эндотелия и изменение его адгезивной функции.

Цель работы: выявить взаимосвязь между уровнем селектина sE и NO-синтаз: *iNOS* *eNOS* в сыворотке крови пациентов с острым венозным тромбозом.

Материалы и методы. Представленное исследование одобрено на заседании ЛЭК ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, протокол № 9 от 15.04.2020. Объектом исследования явились 20 пациентов с острым венозным тромбозом. Контрольную группу составили 12 здоровых лиц, статистически значимых различий изучаемого показателя по возрасту и полу между исследуемой и контрольной группами выявлено не было ($p \leq 0,05$). Материалом для исследования послужила сыворотка крови. Забор крови у пациентов и доноров проводился однократно из локтевой вены утром натощак. После двухчасового нахождения при комнатной температуре кровь центрифугировали в течение 20 минут при ускорении 1000g. Количественное определение NO-синтаз проводили сэндвич-методом ИФА в сыворотке крови на иммуноферментном анализаторе *Stat Fax 2100 (microplate reader)* (*Awareness technology Inc. Palm City, FL 34990, USA*). Результаты выражали в нг/мл.

Принцип метода заключается в следующем: микропланшет в наборе сорбирован антителами специфичными к *NOS*. Стандарты или образцы добавляются в определенные лунки планшета. Затем авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (*HRP*) добавляется в каждую лунку планшета и инкубируется. После добавления ТМБ цвет изменяется только в лунках, содержащих *NOS*, антитела с биотином и авидин с пероксидазой хрена. Ферментативная реакция прекращается добавлением раствора серной кислоты. Оптическая плотность (ОП) измеряется фотометрическим методом на длине волны 450 ± 10 нм. Концентрация *NOS* в образцах рассчитывается в соответствии со стандартными (калибровочными) кривыми.

Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с использованием программ *Microsoft Office Excel 2016* и *IBM SPSS Statistics 26 (StatSoft Inc., США)*. Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Для определения статистической значимости различий непрерывных величин использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Полученные результаты. В процессе исследования были получены следующие результаты. Содержание индуцибельной *iNOS* в сыворотке крови пациентов с ВТ была выше, чем у здоровых доноров в 5,2 раза, что явилось статистически значимым. Уровень же *eNOS* демонстрировал не столь значимое повышение – только в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой (Рис 1).

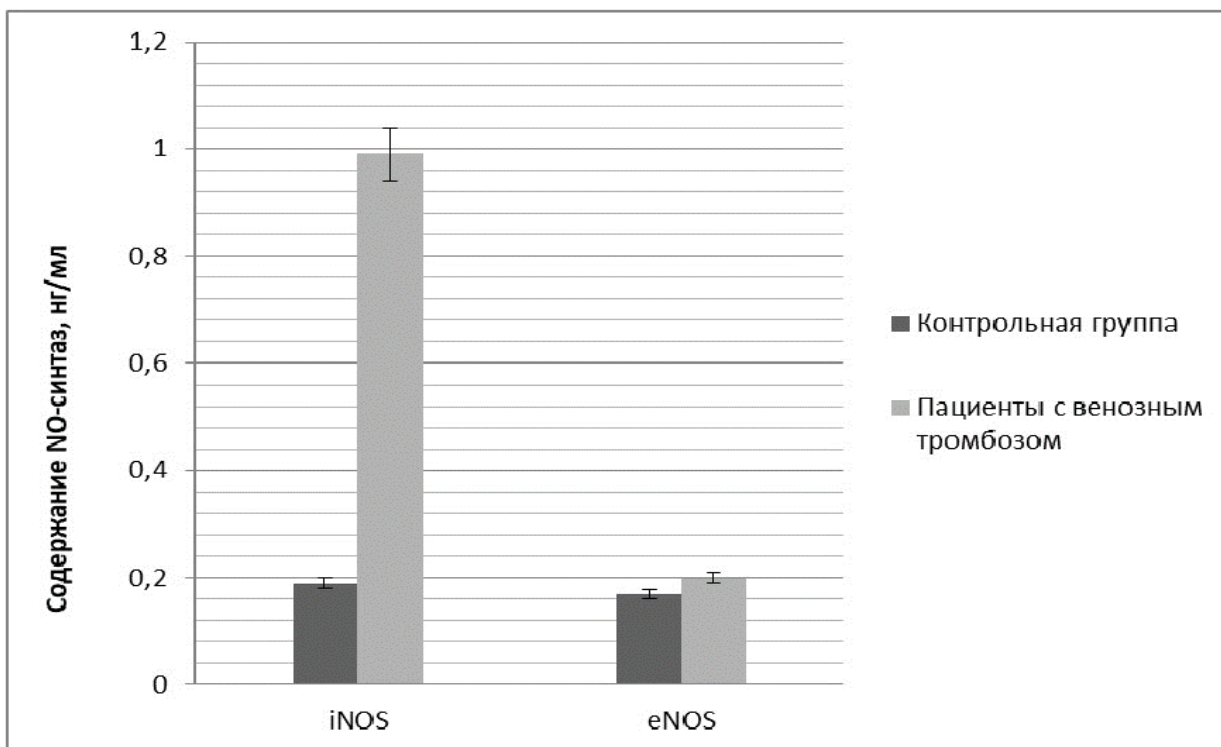


Рис.1 Изменение концентраций индуцибельной и эндотелиальной NOS у пациентов венозным тромбозом, по сравнению с группой контроля, нг/мл

*статистически значимые отличия от контрольной группы ($p \leq 0,05$)

Кроме того, при оценке корреляционных связей была выявлена положительная корреляционная связь высокой степени между концентрациями sE-селектина и *iNOS* ($R=0,73$), в то время как между содержанием sE-селектина и eNOS была выявлена слабая положительная корреляционная связь ($R=0,2$). Синтез оксида азота в физиологических условиях осуществляется главным образом конститутивными формами NO-синтаз. Индуцибельные же NOS продуцируют повышенные количества NO (в 100-1000 раз больше, чем конститутивные) [7. с.35]. Ранее нами было показано некоторое снижение количества sE-селектина у пациентов с венозным тромбозом по сравнению со здоровыми лицами [8, с.22]. На основании вышеизложенного можно предположить, что повышение *iNOS* приводит к повышению NO, являющегося в больших концентрациях токсичным для клеток, что ведет к нарушению функционирования эндотелиоцитов и снижению экспрессии E-селектина.

Выводы. Авторы предполагают, что уровень индуцибельной NO-синтазы влияет на экспрессию молекулы клеточной адгезии E-селектина, снижая его.

Литература.

1. Мельникова Ю.С., Макарова Т.П. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней // Казанский медицинский журнал. 2015. том 96. №4. С. 659-665.
2. Tvaroška I, Selvaraj C, Koča J. Selectins – The Two Dr. Jekyll and Mr. Hyde Faces of Adhesion Molecules – A Review // *Molecules*. 2020. 25(12):2835.
3. Hossain M., Qadri S.M., Liu L. Inhibition of nitric oxide synthesis enhances leukocyte rolling and adhesion in human microvasculature // *J. Inflamm. (Lond)*. 2012. 9(1):28.
4. Silva M., Videira P.A., Sackstein R. E-Selectin Ligands in the Human Mononuclear Phagocyte System: Implications for Infection, Inflammation, and Immunotherapy // *Front Immunol*. 2018. 8:1878.

5. Леонченко С.В. Генетические факторы венозного тромбоза в свете персонифицированного подхода к лечению пациентов с венозными тромбоэмболическими осложнениями // Наука молодых (EruditioJuvenium). 2020. 8(1):116-123.
6. Петриков А.С., Простов И.И. Продленная терапия и вторичная профилактика венозных тромбоэмболических осложнений // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2020. 28(4):548-566.
7. Пожилова Е.В., Новиков В.Е. Синтаза оксида азота и эндогенный оксид азота в физиологии и патологии клетки // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2015. Т. 14. № 4. С.35-41.
8. Короткова Н.В., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Никифоров А.А., Романов Б.К., Бодрова О.В. Оценка уровня селектинов и их лиганда PSGL-1 у пациентов с острым венозным тромбозом. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022. №25(5):22–27.

Сведения об авторах

Короткова Наталья Васильевна

к.м.н., доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ДПО, с.н.с. лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ
Рязань, Россия
Эл. почта: fnv8@yandex.ru

Калинин Роман Евгеньевич

д.м.н., профессор, заведующий кафедрой сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики
Рязань, Россия
E-mail: kalinin-re@yandex.ru
Сучков Игорь Александрович
д.м.н., профессор, профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики
Рязань, Россия
E-mail: i.suchkov@rzgmu.ru

Мжаванадзе Нина Джансуговна

д.м.н., доцент, профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики, с.н.с. лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ
Рязань, Россия
E-mail: nina_mzhavanadze@mail.ru

Information about author

Korotkova Natalya Vasilevna

MD, PhD, associate professor, department of biological chemistry with course of clinical laboratory diagnostics of Continuing Professional Education Faculty, senior researcher at the central research laboratory
Ryazan, Russian Federation
E-mail: fnv8@yandex.ru

Kalinin Roman Evgenievich

MD, PhD, Professor, Head of the department of cardiovascular, endovascular surgery and diagnostic radiology
Ryazan, Russian Federation
E-mail: kalinin-re@yandex.ru

Suchkov Igor Aleksandrovich

MD, PhD, Professor, Professor of the department of cardiovascular, endovascular surgery and diagnostic radiology
Ryazan, Russian Federation
E-mail: i.suchkov@rzgmu.ru

Mzhavanadze Nina Dzhansugovna

MD, PhD, professor of the department of cardiovascular, endovascular surgery and diagnostic radiology, senior researcher at the central research laboratory
Ryazan, Russian Federation
E-mail: nina_mzhavanadze@mail.ru

УДК 616.34-06:891-07 + 616 +
612.13
ГРНТИ 76.29
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.86-93

В.П. Реутов¹, Л.А. Давыдова², Е.Г. Сорокина³
¹ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН; ²Белорусский государственный медицинский университет; ³ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр» здоровья детей Минздрава России

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ NO₂ В ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГАНГЛИЕВ

При трансплантации ганглиев часть нейронов под влиянием ишемии, децентрализации и повреждения аксонов подвергается патологическим изменениям вплоть до их гибели. Задача настоящей статьи состоит в анализе существующей проблемы с тем, чтобы предотвратить или уменьшить гибель нейронов, которая может привести к гибели животных в эксперименте и пациентов в клинике.

Ключевые слова: ганглии, трансплантация, нейроны, цикл оксида азота, нитриты

V.P. Reutov¹, L.A. Davydova², E.G. Sorokina³
¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences;
²Belarusian State Medical University;
³National Medical Research Center for Children's Health of the Ministry of Health of the Russian Federation

POSSIBLE ROLE OF NO₂ IN DEATH OF NEURONS DURING GANGLIA TRANSPLANTATION

During ganglion transplantation, some neurons undergo pathological changes under the influence of ischemia, decentralization, and damage of axons, up to and including their death. The purpose of this article is to analyze the existing problem in order to prevent or reduce the death of neurons, which can lead to the death of animals in the experiment and patients in the clinic.

Keywords: ganglia, transplantation, neurons, nitric oxide cycle, nitrites, NO

Введение. Восстановление функции органа, нарушенной в результате разрыва его связей с центральной нервной системой (ЦНС) является одной из актуальных задач современной биологии и медицины [1–3]. Разрывы связей между органом и ЦНС могут наступить вследствие заболевания, травмы или при трансплантации органа. В настоящее время область регенеративной медицины является одной из процветающих областей современной медицины – от кардиологии и невропатологии до урологии и косметологии [3]. Традиционное донорство в настоящее время не может обеспечить всех нуждающихся в пересадке органов. Поэтому медицина остро нуждается в таких технологиях, которые дополняют трансплантацию донорских органов, а иногда используются как ее альтернатива. В этой области регенеративной медицины широко применяют метод тканевой инженерии (tissue engineering) [2, 3]. Тканевая инженерия – это отрасль биотехнологии, основанная на создании органов и тканей человеческого тела в лаборатории [4]. Тканеинженерные конструкции представляют собой биомедицинский клеточный продукт, который состоит из клеток (клеточных линий), биосовместимого материала и вспомогательных веществ [4].

Одним из первых методов тканеинженерных конструкций стал метод создания нового центра местной нейрогуморальной регуляции – метод ганглиопексии,

основанный на образовании новых нервных и сосудистых связей [6–10]. Основоположником этого метода считают академика НАН Беларуси Д.М. Голуба (1901–2001) [5]. Аналогов исследований, которые проводил Д.М. Голуб, долгое время не было не только в нашей стране, но и за рубежом. Для школы Д.М. Голуба характерен широкий комплекс эмбриологических, анатомических, гистологических, гистохимических методов с применением методов люминесцентной и электронной микроскопии [6–10]. Сотрудники Д.М. Голуба (Л.А. Давыдова и другие коллеги) установили, что при трансплантации ганглиев часть нейронов под влиянием ишемии, децентрализации и повреждения аксонов подвергается патологическим изменениям вплоть до их гибели. Нередко при подобных патологических изменениях гибнут не только нейроны, но и пациенты. Это происходит менее чем в 30% случаев. Одной из задач настоящей статьи является анализ существующей проблемы с тем, чтобы предотвратить или уменьшить гибель нейронов, которая может также привести к гибели животных в эксперименте или пациентов в клинике.

В нашей работе в качестве теоретической базы была применена концепция циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала, а также, выводы, вытекающие из этой концепции. Согласно концепции, развиваемой нами на протяжении нескольких десятилетий, нарушение циклических регуляторных механизмов, обеспечивающих поддержание содержания активных форм азота и кислорода, может быть причиной многих заболеваний [5–15]. Большинство заболеваний протекают на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов и активации иммунных и аутоиммунных процессов. Именно при этих процессах происходит сбой в системах контролирующих уровень активных форм азота (NO/NO_2) и кислорода (O_2/O_2^-). Такими системами являются *циклы оксида азота и супероксидного анион-радикала*, интактность которых обеспечивает протекание нормальных физиологических процессов [5–8]. Однако нарушение этих циклов может приводить к появлению диоксида азота (NO_2), пероксинитритов, OH -радикалов, которые способны повреждать практически все биохимические компоненты, из которых состоят клетки живых организмов [9–15].

Цель работы. Анализ данных литературы и результатов собственных исследований для *поиска методов и способов предотвращения или уменьшения гибели нейронов, которая может привести к гибели животных в эксперименте и пациентов в клинике.* Теоретической базой, как указывалось выше, стали концепции *циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала*, а также следствия, вытекающие из них. Для чего это было сделано? Прежде всего, как указывалось выше, для формирования стратегии и тактики, направленных на защиту клеток и организма в целом от оксидативного и нитрозативного стресса, развивающихся в тех случаях, когда (в 5–30% случаев) наблюдается появление деструктивных изменений в перемещенном ганглии, приводящих к сосудистым осложнениям и повышению риску летальности. Также анализируются механизмы, способные защитить нервные клетки, предотвратить развитие в них деструктивных изменений и снизить риск летальности.

Строение и кровоснабжение каудального брыжеечного узла в норме и трансплантации. Исследования многообразия межнейрональных связей на примере каудального брыжеечного узла (КБУ), подтверждают данные морфологов и физиологов о сложности строения межнейрональных отношений в желудочно-кишечном тракте [5–12]. Выявлены одиночные и множественные синаптические структуры на эфферентных нейронах. Афферентные структуры ганглия представлены инкапсулированными и неинкапсулированными рецепторами, перикапсулярными сплетениями. Дендриты рецепторных нейронов оплетают группы двигательных нейронов. Период интенсивной дифференцировки нейронов КБУ совпадает с усиленным развитием внутриганглионарной сосудистой сети, при этом наблюдается значительное повышение активности кислой фосфатазы в нервных клетках и накопление субстанции Ниссля [12]. Созревание нейронов ганглия начинается, главным образом, на периферии узла. Вначале вступают в

дифференцировку клетки II типа Догеля. Эти клетки Догеля своими отростками окружают и оплетают эфферентные клетки. Наряду с преганглионарными волокнами они, по-видимому, оказывают индуцирующее влияние на созревание клеток I типа Догеля.

В исследованиях академика АН БССР Д.М. Голуба и его коллег (Л.А. Давыдовой) было установлено, что нейроны КБУ взрослой интактной собаки находятся в благоприятных условиях кровоснабжения [11, 12]. Капиллярные петли окружают от 1 до 8 нервных клеток, в 69% – 1–2 нейрона. На периферии узла кровоснабжение было более развито, чем в центре. Площадь поперечного сечения сосудов на 1 мм^2 на периферии составляло $10140 \pm 450 \text{ мк}^2$, а в центре – $7689 \pm 426 \text{ мк}^2$ (в среднем $9101 \pm 250 \text{ мк}^2$).

У щенков кровоснабжение КБУ значительно отличается от взрослых собак. В одной капиллярной петле у новорожденного щенка количество нервных клеток колеблется от 7 до 50. Площадь поперечного сечения сосудов быстро увеличивается и к концу первого месяца в 4 раза превышает показатели новорожденного. К шести месяцам поперечное сечение сосудов узла на 1 мм^2 равно $9539 \pm 811 \text{ мк}^2$ и соответствует примерно такому у взрослого животного.

При трансплантации КБУ в участках наибольшего сохранения нервно-клеточных элементов площадь поперечного сечения сосудов на 1 мм^2 через 10 месяцев после операции составляет 8061 мк^2 , а в интактном ганглии – $9101 \pm 250 \text{ мк}^2$. В центральных участках, где гибель клеток отмечается в большей степени, этот показатель ниже, среднее значение площади поперечного сечения сосудов снижается до $6738 \pm 391 \text{ мк}^2$. Кровоснабжение трансплантированного ганглия восстанавливается в результате возникновения коллатеральных сосудов по ходу подчревных нервов, а также благодаря прорастанию сосудов из большой поясничной мышцы. Соотношение нейронов и капилляров в трансплантированном узле сходно с соотношением их, наблюдаемым у взрослой интактной собаки. Среди сосудов пересаженного узла доля капилляров равна 90,1%. Она несколько выше, чем в интактном ганглии. Можно допустить, что на определенном этапе сращения ганглия с мышцей в нем возникают столь же благоприятные условия кровоснабжения, как и на первых этапах постэмбрионального периода жизни, когда происходит бурная дифференцировка нейронов.

Переживание большого количества нервных клеток при трансплантации связано с быстрым восстановлением кровоснабжения, сохранением связи эфферентных нейронов с преганглионарными волокнами, проходящими в составе подчревных нервов, а также с сохранением или восстановлением местных рефлекторных дуг. В соединительной ткани, развивающейся вокруг трансплантированного ганглия, выявляется большое количество новообразованных нервных волокон, проникающих в мышечную ткань. Пересаженный узел, по-видимому, оказывает влияние на рост нервных волокон органа-реципиента. Пересадка КБУ на поперечнополосатую мышцу с сохранением нервно-сосудистой «ножки» благоприятствует сохранению большого количества нейронов трансплантированного ганглия, восстановлению их нейрональных и сосудистых связей. Трансплантация, произведенная таким способом, заслуживает внимания как одна из моделей для изучения вопроса об образовании новых центров местной нервной регуляции внутренних органов [5, 11, 12].

При трансплантации КБУ на нервно-сосудистой «ножке» часть нейронов не изменяется. При этом их связи между собой и с центральной нервной системой по своему строению совпадают с интактным ганглием. Однако, *часть нейронов под влиянием ишемии, децентрализации и повреждения аксонов подвергается патологическим изменениям. При этом обнаруживается транснейрональная атрофия, ретроградная дегенерация, а также гибель нейронов* (Рис. 1 а, б). Количество случаев, в которых после операции наблюдаются летальные исходы, составляет от 5 до 30%.

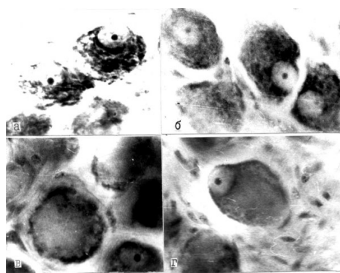


Рис. 1 а. Нейроны КБУ на 2 сутки после операции: нейроны в состоянии раздражения: смещение ядер на периферию, центральный, периферический и тотальный хроматолиз. Окраска по Нислю, ув. 400.

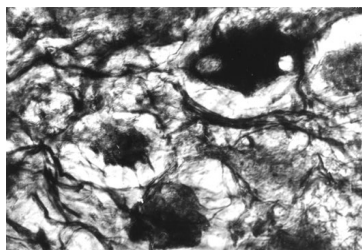


Рис. 1 б. Нервные клетки в состоянии перичеллюлярного отека. Срок наблюдения 7 дней, импрегнация по Рассказовой, ув.400.

Часть нейронов подвергается ретроградной дегенерации вследствие повреждения аксонов: набухание клеток, резкое смещение ядра на периферию, развитие центрального хроматолиза. Эти изменения могут быть обратимыми в случае нормального и благоприятного исхода (рис. 2 а, б). Максимально эти изменения выражены спустя 2 недели после операции трансплантации (период бифуркации). Затем они постепенно уменьшаются, и, к моменту восстановления аксона практически полностью исчезают (рис. 2 а, б).

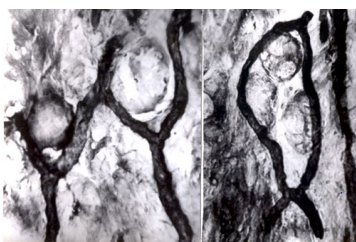


Рис. 2 а. Капиллярные петли, окружающие нейроны. Высокая активность щелочной фосфатазы. Срок набл. 1 мес., метод Гомори, ув.40.

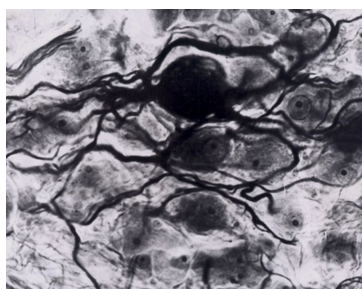


Рис. 2 б. Рецепторная клетка 2 типа Догеля, срок наблюдения 7 мес. Импрегнация серебром по Рассказовой, ув. 400.

Можно ли уменьшить вероятность гибели животных (в эксперименте на животных) или пациентов в клинике (при операциях, связанных с трансплантацией ганглия)? Какие факторы воздействуют на нейроны трансплантированного ганглия, и, как их можно модулировать (изменять, снижать) для уменьшения количества летальных исходов при операциях? Существует ли период времени после операции трансплантации, когда биологическая система в виде каудального брыжеечного узла, используемая как модель тканеинженерной конструкции, находится в состоянии бифуркации? Другими словами, существует ли тот момент времени, когда тканеинженерная конструкция, состоящая из нейронов и сосудов, может погибнуть вместе со своим хозяином, или, наоборот, может выжить и дать возможность жить пациенту с пересаженным ганглием? Анализ причин и выяснение механизмов, участвующих в повреждениях нейронов при трансплантации нервного ганглия, будет представлен в обсуждении этих данных.

Анализ причин и выяснение механизмов, участвующих в повреждениях нейронов при трансплантации нервного ганглия. Анализ причин и выяснение механизмов, участвующих в указанных выше процессах, привели нас к выводу о том, что практически все патологические процессы, протекающие на фоне гипоксии/ишемии, воспалительных процессов и активации иммунных/аутоиммунных реакций имеют общую составляющую [13–18]. Эта составляющая обусловлена возникновением *химического* или *свободно радикального резонанса* между активными формами азота ($\bullet\text{NO}$, $\bullet\text{NO}_2$) и активными формами кислорода ($\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$ -радикалы). Химический резонанс, когда $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{O}_2^-$, взаимодействуя друг с другом, создают весьма опасные пероксинитриты, $\bullet\text{NO}_2$ и $\bullet\text{OH}$ -радикалы *может стать реальной причиной атрофии, дегенерации и гибели нейронов*. В свою очередь такая гибель нейронов может привести, в конце концов, к гибели животных в эксперименте и людей в клинике [4, 5]. Что необходимо делать, чтобы не допустить развитие таких процессов?

Для этого необходимо: *а)* уменьшить гипоксию/ишемию (оксигенация крови); *б)* снизить интенсивность воспалительных процессов (противовоспалительные средства); *в)* ингибировать активность иммунных/аутоиммунных реакций (цитостатики, азатиоприн). Не допускать поступления с водой, пищей и лекарственными препаратами избытка экзогенных нитратов, нитритов и NO-генерирующих соединений на время активного послеоперационного периода. В этот период рекомендуется использовать слабощелочные минеральные воды, ингибирующие процессы восстановления ионов NO_2^- в NO (нитритредуктазную компоненту цикла оксида азота) (Рис. 3). Это обусловлено тем, что восстанавливать ионы NO_2^- в NO могут гемсодержащие белки, находящиеся в дезокси-форме. Изменение pH в кислую сторону переводит Hb-O₂ в T-конформацию, в которой связь между лигандом O₂ и железом гема ослаблена и пигмент крови относительно легко высвобождает молекулу O₂. В T-конформации гемсодержащие комплексы Hb-O₂ могут более активно восстанавливать ионы NO_2^- в NO (активация нитритредуктазной компоненты) цикла оксида азота. Сдвиг pH в щелочную сторону обеспечивает сохранение Hb-O₂ в R-конформации, которая хорошо удерживает молекулу O₂ в Hb-O₂ комплексе. В таком положении (R-конформеры Hb-O₂) нитритредуктазная компонента цикла оксида азота будет ингибироваться, а вместе с ней будет ингибироваться и производство NO, а также концентрация этих молекул.

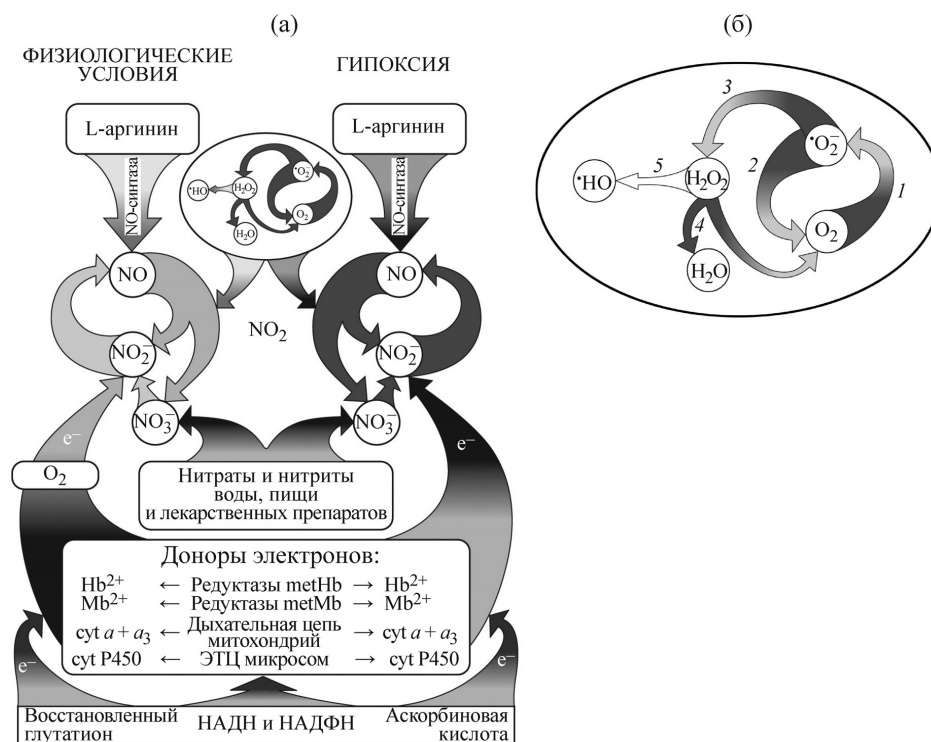


Рис. 3. Циклы оксида азота (NO) (а) и супероксидного анион-радикала (O_2^-) (б). В цикле NO можно выделить NO-синтазную компоненту «L-аргинин → NO», осуществляющую синтез NO в присутствии O₂, нитритредуктазную компоненту, активность которой резко возрастает в условиях дефицита O₂ (гипоксии/ишемии). Ионы NO₂⁻, образующиеся из L-аргинина, могут вновь при участии нитритредуктазных систем, включающих в себя гемоглобин (Hb), миоглобин (Mb) и цитохромы (cyt a + a₃ и cyt P450), замыкать в цикл цепочку «L-аргинин → NO → NO₂⁻ / NO₃⁻». Кислород, связываясь с гемом, ингибирует нитритредуктазную активность этих белков. При гипоксии и функциональной нагрузке, когда гемсодержащие белки переходят в дезокси-форму, ионы NO₂⁻ начинают активно восстанавливаться, акцептируя электроны с этих гемсодержащих белков. В цикле O_2^- происходят: 1 – восстановление O₂ и образование O_2^- ; 2 и 3 – реакции дисмутации O_2^- , катализируемые супероксиддисмутазой; 4 – разложение пероксида водорода (H₂O₂) на воду (H₂O) и молекулярный кислород (O₂), осуществляемое ферментом каталазой; 5 – пероксид водорода (H₂O₂) также разлагается с образованием двух молекул $^{\bullet}OH$ -радикала. Циклическая регуляция активных форм азота и кислорода обеспечивает превращение этих активных, высокореакционных соединений в менее активные вещества. При нарушении циклов NO и O_2^- появляются еще более активные молекулы $^{\bullet}NO_2$ и пероксинитритов, вновь распадающихся на $^{\bullet}NO_2$ и $^{\bullet}OH$ -радикалы, которые повреждают основные биохимические компоненты живых организмов [4].

Заключение. Авторы считают, что принципиально новыми являются предложенные меры, которые могут снизить вероятность образования NO₂ в местах трансплантации ганглиев, и, тем самым, обеспечить нормальную работу циклов NO и O_2^- , участвующих в поддержании концентрации активных форм азота и кислорода в пределах физиологической нормы.

Как указывалось выше, при трансплантации ганглиев часть нейронов под влиянием ишемии, децентрализации и повреждения аксонов подвергается патологическим изменениям вплоть до их гибели, которая может привести к гибели животных в эксперименте и пациентов в клинике. Для того, чтобы предотвратить или уменьшить гибель нейронов, необходимо: а) уменьшить гипоксию/ишемию (оксигенация крови); б) снизить интенсивность воспалительных процессов (наиболее адекватные противовоспалительные средства); в) ингибировать активность иммунных/аутоиммунных реакций (цитостатики, азатиоприн). Не допускать поступления с водой, пищей и лекарственными препаратами избытка экзогенных нитратов, нитритов и NO-генерирующих соединений на время активного послеоперационного периода. В этот период рекомендуется

использовать слабощелочные минеральные воды, ингибирующие процессы восстановления ионов NO_2^- в NO (нитритредуктазную компоненту цикла NO).

Литература.

1. Berthiaume F., Maguire T.J., Yarmush M.L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges // *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2011; 2: 403-30.
2. Orlando G., Wood K.J., Stratta R.J., Yoo J.J., Atala A., Soker S. Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future // *Transplantation.* 2011. V. 91(12): 1310-1317.
3. Turner N.J., Keane T.J., Badylak S.F. Lessons from developmental biology for regenerative medicine // *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2013. V.99(3):149-159.
4. Реутов В.П., Давыдова Л.А., Сорокина Е.Г. Тканеинженерные конструкции в биофизике, неврологии и других областях, отраслях и разделах медицины // *Биофизика.* 2022. Т.67: (5): 1009–1029.
5. Давыдова Л.А., Реутов В.П. Ганглиопексия: создание нового центра местной нейро-гуморальной регуляции, роль оксида азота и специфических факторов стимулирования ангиогенеза. Вклад эмбриолога-анатома академика Давида Моисеевича Голуба (1901–2001) в развитие метода ганглиопексии и современное состояние проблемы тканеинженерных конструкций (ТИК) // *Евразийское Научное Объединение.* 2018. №3-2 (37): 82–96.
6. Golub D.M. Development of the sympathetic trunk in human embryogenesis // *Arkh Anat Gistol Embriol.* 1963. V.45:3–16.
7. Golub D.M., Kheinman F.B., Novikov I.I., Archakova L.I., Danilenko R.V. Reinnervation of internal organs and vessels by the neuropexy technic // *Arkh Anat Gistol Embriol.* 1979. V.76(3): 5–16.
8. Golub D.M., Bronovitskaia G.M. Development of the human hip joint and its innervation // *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* 1981. V.80(5):47–56.
9. Golub D.M. Regularities in the intrauterine development of innervation connections of internal organs and formation of new nerve pathways and centers under experimental conditions // *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* 1969. V.57 (10): 3–12.
10. Golub D.M., Loyko R.M., Novikov I.I. Development of reflexogenic zone innervation of the human cardiovascular system // *Anat. Anz.* 1979. V.145 (5):474–492.
11. Golub D.M., Davydova L.A., Novikov I.I., Kheinman F.B. Formation of new centers of local nervous regulation of organs and tissues // *Arkh Anat Gistol Embriol.* 1973. V.64(5):5–16.
12. Давыдова Л.А. Строение и кровоснабжение каудального брыжеечного узла в норме и при трансплантации на большую поясничную мышцу. Автореферат ... канд. мед. наук. Минск: Институт физиологии АН БССР. 1972. 24 с.
13. Reutov V.P., Sorokina E.G. NO-synthase and nitrite reductase components of the nitric oxide cycle // *Biochemistry.* 1998. V. 63. (7): 1029–1040.
14. Reutov V.P. Biochemical predetermination of the NO synthase and nitrite reductase components of the nitric oxide cycle // *Biochemistry.* 1999. V. 64. (5): 528–542.
15. Reutov V.P. Nitric oxide cycle in mammals and the cyclicity principle // *Biochemistry.* 2002. V. 67 (3): 293–311.
16. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Швалева В.Н. Возможная роль диоксида азота, образующегося в местах бифуркации сосудов, в процессах их повреждения при геморрагических инсультах и образовании атеросклеротических бляшек // *Успехи физиологических наук.* 2012. Т.43 (4): 73–93.

17. Реутов В.П., Самосудова Н.В., Сорокина Е.Г. Модель глутаматной нейротоксичности и механизмы развития типового патологического процесса // *Биофизика*. 2019. Т. 64 (2): 316 – 336.

18. Reutov V.P., Sorokina E.G., Sukmansky O.I. Cycles of Nitric Oxide (NO), Superoxide Radical Anion (O_2^-) and Hydrogen Sulfur/Sulfur Dioxide (H_2S/SO_2) in Mammals // *Curr. Res. Biopolymers*. 2020. 2: 112–119.

Сведения об авторах

Валентин Палладиевич Реутов

докт. биол. наук, ведущий научный сотрудник

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН

Москва, Россия

Эл. почта: valentinreutov@mail.ru

Людмила Александровна Давыдова

канд. мед. наук, доцент

Белорусский государственный медицинский университет

Минск, Белоруссия

Эл. почта: la-davydova@yandex.by

Елена Геннадьевна Сорокина

канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник

Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России

Москва, Россия

Эл. почта: sorokelena@mail.ru

Information about author

Valentin Palladievich Reutov

Doctor of Biol. Science, Leading Researcher

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of

Russian Academy of Sciences, Moscow

Moscow, Russian Federation

E-mail: valentinreutov@mail.ru

Lyudmila Alexandrovna Davydova

Ph.D., Associate Professor

Belarusian State Medical University

Minsk, Belorussia

E-mail: la-davydova@yandex.by

Elena Gennad'evna Sorokina

PhD., Leading Researcher

National Medical Research Center for Children's Health of

the Ministry of health of the Russian Federation

Moscow, Russian Federation

E-mail: sorokelena@mail.ru

УДК 616-002.2

ГРНТИ 76.29

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.93-100

Е.Г. Сорокина¹, С.А. Афанасьева¹, Т.В. Радыгина¹,
С.В. Петричук¹, А.С. Потапов¹, Е.Л. Семикина¹,
В.П. Реутов²

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр
здоровья детей» Минздрава России,

²ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и
нейрофизиологии РАН

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ, МОДИФИЦИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА И 3-НИТРОТИРОЗИНА У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

В статье представлены данные содержания альбумина, модифицированного альбумина, белковых фракций и 3-нитротирозина (3-НТ) в сыворотке крови у детей с разной тяжестью воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК при ремиссии и обострении). Показано, что, чем тяжелее состояние, тем более выражено снижение альбумина. Напротив, содержание белков острой фазы, модифицированного альбумина и 3-нитротирозина увеличивается с ростом тяжести ВЗК.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, модифицированный альбумин, альбумин, белковые фракции, 3-нитротирозин

E.G. Sorokina¹, S.A. Afanasieva¹, T.V. Radygina¹, S.V. Petrichuk¹,
A.S. Potapov¹, E.L. Semikina¹, V.P. Reutov²

¹"National Medical Research Center for Children's Health" of the Ministry of
Health of Russia

²Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the
Russian Academy of Sciences

THE CONTENT OF SERUM PROTEINS, MODIFIED ALBUMIN AND 3-NITROTHYROSINE IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

The article presents data on the content of albumin, ischemia modified albumin, protein fractions and 3-nitrotyrosine in the blood serum of children with different severity of inflammatory bowel diseases (IBD in remission and exacerbation). It has been shown that the more severe the condition, the more pronounced the decrease in albumin. On the contrary, the content of acute phase proteins, modified albumin and 3-nitrotyrosine (NT) increases with increasing severity of IBD.

Keywords: *inflammatory bowel diseases, modified albumin, albumin, protein fractions, 3-nitrotyrosine*

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это хронические заболевания, характеризующиеся атакой иммунной системы на желудочно-кишечный тракт. ВЗК (болезнь Крона, БК или язвенный колит, ЯК) широко распространены в индустриально-развитых странах, где ими страдает каждый 20-й житель [1]. Для контроля за состоянием пациентов с ВЗК, наряду с инструментальными методами исследования, используются показатели С-реактивного белка (СРБ) и фекального кальпротектина. Однако, СРБ не является специфическим показателем ВЗК, а фекальный кальпротектин при ЯК недостаточно коррелирует с выраженностью клинических симптомов при умеренной и высокой активности заболевания [2]. Отсутствие надежных биомаркеров при ВЗК диктует необходимость поиска новых прогностических маркеров для оценки тяжести (ремиссии/обострения) БК, ЯК и эффективности проводимой терапии.

Нам не удалось найти в литературе исследований, в которых при ВЗК проводили оценку белкового профиля сыворотки, модификации белков и окислительного стресса. В то же время эти показатели могут иметь важное значение при аутоиммунных заболеваниях, к которым относятся ВЗК.

Цель работы.

Оценить диагностическую значимость определения белкового профиля (основного белка крови альбумина и глобулинов), количества окисленного и модифицированного альбумина вследствие ишемии (ИМА) и показателя нитрозативного стресса 3-нитротирозина (3-НТ) в сыворотке крови у детей с ВЗК разной степени тяжести.

Материалы и методы.

Для анализа использовали сыворотку детей (21) с ВЗК. На основании педиатрических индексов активности болезни PCDAI/PUCAI (значение индекса менее 10 соответствовало состоянию ремиссии, более 10 – обострению). Пациентов разделили на 3 группы: 0-5 баллов (ремиссия), 10-20 баллов (средне-тяжелая степень), 25-65 баллов (тяжелая стадия обострения ВЗК). До проведения анализа сыворотки хранились при температуре -70°C. Электрофоретическое разделение белков крови проводили на приборе Hydrases 2 scan focusing (Sebia) в 10 мкл сыворотки и выражали в %. ИМА оценивали с помощью микро-колориметрического метода, разработанного Var-Or и соавт. на основе измерения не связанного с белком кобальта после инкубации с сывороткой [3,

4]. Измерение оптической плотности проводили при 470 нм с помощью планшетного спектрофотометра Clariostar (BMG, Германия). Результаты представляли в единицах оптического поглощения (Е.О.П.) и считали верхней границей нормальных значений Е.О.П. = 0,25. Содержание 3-нитротирозина в сыворотке крови оценивали с помощью иммуоферментного метода (Hycult Biotech, USA). Полученные данные обработаны с использованием программы Prizm 8.1. Результаты представлены в $M \pm m$.

Полученные результаты. Во всех группах детей с ВЗК содержание альбумина оказывалось ниже нижней границы нормы (60%), при этом максимальное снижение основного сывороточного белка наблюдалось при тяжелом состоянии (25-65 баллов). Напротив, содержание ИМА при тяжелом обострении оказывалось максимальным (рисунк 1).

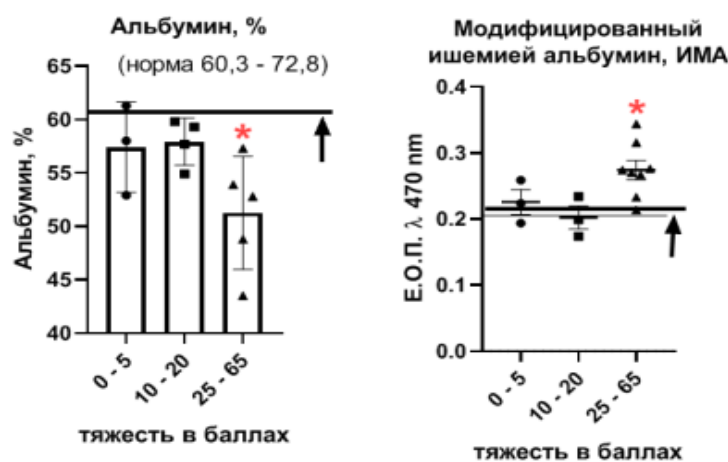


Рисунок 1. Содержание альбумина и ишемией модифицированного альбумина в сыворотке крови детей с различной тяжестью ВЗК: стрелка, направленная вверх, указывает на верхнюю границу нормы,

** $p < 0,05$ - достоверно с группами 0-5 и 10-20 баллов*

Наибольшие изменения в содержании глобулинов наблюдались во фракциях альфа-1 и альфа-2, представляющих собой белки острой фазы. В альфа-1 входят антитрипсин, блокирующий протеолитические ферменты, кислый гликопротеин, способствующий фибрилlogenезу, липопротеины, отвечающие за доставку липидов к другим клеткам, а также белки, способствующие транспорту гормонов кортизола и тироксина. Альфа-2 фракция представлена макроглобулином, активизирующим защитные процессы организма при инфекционных и воспалительных поражениях, гаптоглобином (соединяется с гемоглобином), церулоплазмином (связывает ионы меди, нейтрализует свободные радикалы и является окислительным ферментом для витамина С и адреналина), а также липопротеинами, обеспечивающими перемещение жиров (рисунк 2). В отличие от альфа 1,2-фракций, бета-1 и бета-2 фракции у большинства пациентов с ВЗК определялись ниже верхней границы нормы, что было особенно выражено для бета-2 фракции у детей с тяжелым состоянием ВЗК.

Бета-1 и бета-2 фракции включают трансферрин, обеспечивающий перемещение Fe, гемопексин, препятствующий потере Fe (связывает Hb, Mb, каталазу и доставляет их в печень, где происходит распад гема и связывание Fe с ферритином). Эти бета -1,2 фракции также включают комплемент, участвующий в иммунном ответе, бета-липопротеины, перемещающие фосфолипиды и холестерин, а также некоторые иммуноглобулины, обеспечивающие иммунную реакцию.

Таким образом, отсутствие компенсационного повышения бета-1 фракции глобулинов, связанной с обменом Fe, скорее всего, свидетельствует о наличии анемии и

Секция 4. ОКСИД АЗОТА И ПРОДУКТЫ ЕГО МЕТАБОЛИЗМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

необходимости терапии препаратами железа. Известно, что дети с ВЗК подвержены риску развития дефицита питательных веществ, особенно из-за снижения потребления, ограничительных диет, нарушения всасывания и чрезмерной потери питательных веществ. В исследованиях на детях и молодых людях до 17 лет с диагнозом ВЗК в период с 2012 по 2018 год было установлено наличие дефицита в крови уровня железа, ферритина, цинка, витамина D, витамина А, витамина Е, селена, меди, витамина В12 и фолиевой кислоты [5].

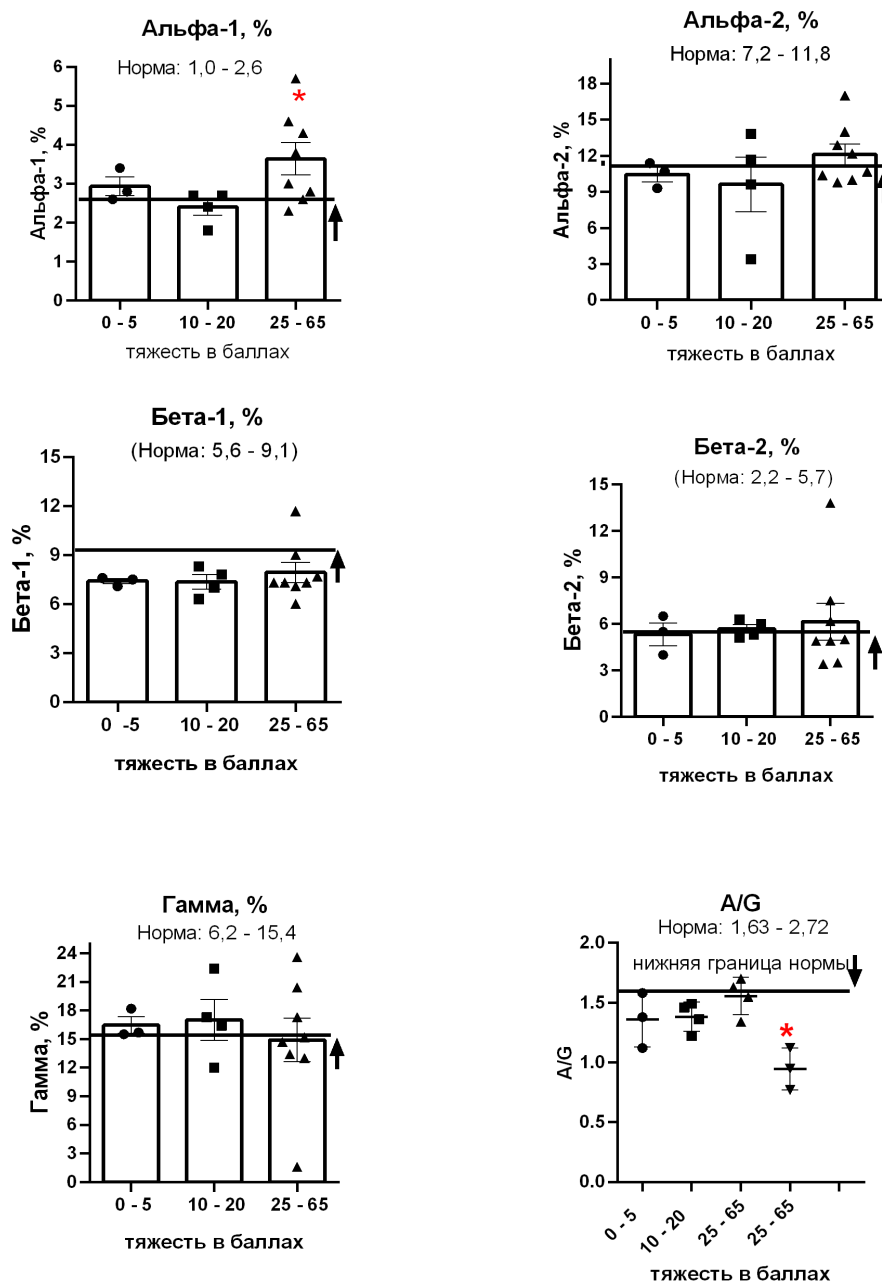


Рисунок 2. Содержание фракций глобулинов сыворотки крови в % и индекс Альбумин/Глобулины (A/G) в сыворотке крови детей с различной тяжестью ВЗК: стрелка вверх указывает на верхнюю границу нормы, стрелка вниз – на нижнюю границу нормы, * $p < 0,05$ с группами 0-5 и 10-20 баллов

Учитывая показанное в нашей работе снижение уровня альбумина, обладающего множеством функций (онкотическая, транспортная, антиоксидантная, способность связывать и переносить металлы, билирубин, липидные гормоны, антибиотики и др.) [6, 7], а также возрастание содержания модифицированного альбумина в стадии обострения ВЗК, указанный дефицит микроэлементов и витаминов может быть связан с потерей некоторых свойств альбумина вследствие его модификаций [8]. Как видно (рис. 2), индекс Альбумин/Глобулины оказывается сниженным практически у всех пациентов с ВЗК, но наиболее выражено снижение А/Г среди пациентов с тяжелой ВЗК (25-65 баллов). Повышение гамма-фракции, по всей вероятности, свидетельствует об образовании антител и может отражать аутоиммунный ответ.

Сывороточный 3-нитротирозин (3-НТ) является маркером окислительного и нитрозативного стресса. У здоровых людей 3-НТ в крови отсутствует. Обнаружение повышенного уровня 3-НТ в сыворотке крови рассматривается как результат воздействия пероксинитрита, мощного окислителя, и связано с риском развития опасных для жизни дегенеративных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, инсульт, почечная недостаточность и рак. Однако, в литературе сообщалось, что 3-НТ также является высокочувствительным маркером в ответ на кратковременное воздействие многих острых факторов риска воспаления, таких как нездоровое питание, загрязнение окружающей среды, токсичные вещества, наркотики и даже психосоциальный стресс [9 - 12]. Данные о содержании 3-НТ у больных с ВЗК в литературе отсутствуют. Найденное нами повышение 3-НТ в крови у больных с ВЗК свидетельствует о нитрозативном стрессе и окислении белков, наиболее выраженное в группе с тяжелым ВЗК (рисунок 3).

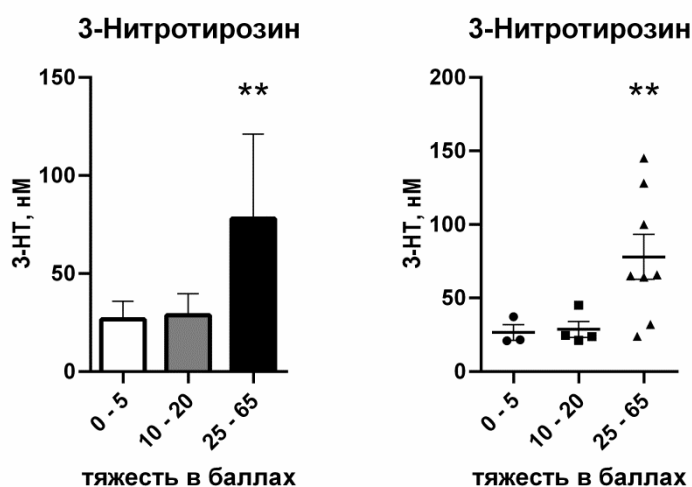


Рисунок 3. Содержание нитротирозина (3-НТ) в сыворотке крови детей с различной тяжестью ВЗК: ** - $p < 0,01$ с группами 0-5 и 10-20 баллов

Интересно, что ранее мы обнаружили появление 3-НТ у детей с черепно-мозговой травмой [8, 13], при этом повышение 3-НТ сопровождалось повышением содержания NO и уровня аутоантител к рецепторам глутамата (GluRc) [14].

Как известно, GluRc являются центральными рецепторами в головном мозге, при этом они обнаружены также в лимфоцитах [15]. В эксперименте по изучению влияния NO на уровень АТФ в лимфоцитах было показано, что в больших концентрациях NO приводит к снижению внутриклеточной и увеличению экстраклеточной АТФ [16]. Ранее нами было показано, что с увеличением тяжести ВЗК происходит снижение активности АТФ-азы в CD39 Т-лимфоцитах [17], что может снижать гидролиз АТФ и

приводить к токсическому воздействию внеклеточной АТФ. Нами также показано, что содержание АТФ в лимфоцитах и 3-НТ в крови имеет прямую корреляцию [18].

В настоящее время установлена взаимосвязь ВЗК с развитием нарушений в мозге [18, 19]. Показано развитие депрессивных состояний при ВЗК [20], а также нарушение когнитивных функций при повреждении ЖКТ [21]. Эти данные, наряду с полученными нами результатами об увеличении 3-НТ в крови у детей с ВЗК, дают нам основание для предположения о вовлечении в патогенез ВЗК рецепторов глутамата, которые обеспечивают взаимосвязь кишечник-мозг при этих аутоиммунных воспалительных заболеваниях.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: У детей с воспалительными заболеваниями кишечника впервые показано нарушение соотношения белковых фракций сыворотки крови со снижением индекса альбумин/глобулины. Одновременно со снижением уровня альбумина увеличивается содержание модифицированного альбумина и 3-нитротирозина – показателей кислородного и нитрозативного стресса. Именно такие показатели характерны для гипоксических состояний, при которых происходит гиперстимуляция глутаматных рецепторов лимфоцитов и нейронов. На основании ранее полученных нами данных выдвинуто предположение о значении показателей сыворотки у детей с ВЗК и их связи с возможным развитием нарушений в мозге через активацию глутаматных рецепторов.

Литература

1. *Wagatsuma K., Yokoyama Y., Nakase H. Role of Biomarkers in the Diagnosis and Treatment of Inflammatory Bowel Disease // Life (Basel). 2021. V.11(12):1375.*
2. *Singh S, Ananthakrishnan A.N., Nguyen N.H., Benjamin L Cohen et al. AGA Clinical Practice Guideline on the Role of Biomarkers for the Management of Ulcerative Colitis // Gastroenterology. 2023. V.164(3):344-372.*
3. *Bar-Or D., Lau E., Winkler, J. V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report // The Journal of emergency medicine. 2000. V.19(4): 311–315.*
4. *Lee E., Eom J.E., Jeon K.H., Kim T.H., Kim E, Jhon G.J., Kwon Y. Evaluation of albumin structural modifications through cobalt-albumin binding (CAB) assay // J Pharm Biomed Anal. 2014. V.91:17-23.*
5. *Rempel J., Grover K., E.I.-Matary W. Micronutrient Deficiencies and Anemia in Children with Inflammatory Bowel Disease // Nutrients. 2021. V.13(1):236.*
6. *Глумчер Ф.С. Возможности применения альбумина в терапии критических состояний: современное состояние проблемы // Медицина неотложных состояний. 2014. V.2(57): 65-73.*
7. *Shevtsova A., Gordiienko I., Tkachenko V., Ushakova G. Ischemia-Modified Albumin: Origins and Clinical Implications // Dis Markers. 2021. No. 2021. Article ID 9945424. 18P.*
8. *Сорокина Е.Г., Афанасьева С.А., Карасева О.В., Семенова Ж.Б., Глоба О.В., Рутлов В.П., Пинелис В.Г. Модифицированный альбумин как показатель оксидативного и нитрозативного стресса при ишемически-гипоксических повреждениях мозга и различных органов // В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. материалы Международной конференции NT + ME`22. Весенняя сессия. Москва, 2022 :301-310.*
9. *Sun Y.C., Chang P.Y., Tsao K.C., Wu T.L., Sun C.F., Wu L.L., Wu J.T. Establishment of a sandwich ELISA using commercial antibody for plasma or serum 3-nitrotyrosine (3NT). Elevation in inflammatory diseases and complementary between 3NT and myeloperoxidase // Clin Chim Acta. 2007. V.378(1-2):175-80.*
10. *Darwish RS, Amiridze N., Aarabi B. Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury // J Trauma. 2007. V.63(2):439-442.*

11. Wu L.L., Wu J.T. Serum 3-Nitrotyrosine May Be Elevated With the Exposure to Acute Inflammatory Risk Factors Such As Unhealthy Diet, Pollutant, Drug and Psychosocial Stress // *J Biomed Lab Sci*. 2007. V.19(4):113-116.
12. Felipe V., Urios A., Valero P., Sánchez, M. et al. Serum nitrotyrosine and psychometric tests as indicators of impaired fitness to drive in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy // *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2013. V.33(10): 1478–1489.
13. Sorokina E.G., Semenova Zh.B., Reutov V.P., Arsenieva E.N., Karaseva O.V., Fisenko A.P., Roshal L.M., Pinelis V.G. Brain biomarkers in children after mild and severe traumatic brain injury // *Acta Neurochirurgica*. 2021. Suppl. No. 131: 103-107.
14. Sorokina, E. G., Semenova, Zh.B., Bazarnaya, N. A., Meshcheryakov, S. V., Reutov, V. P., Goryunova, A. V., Pinelis V. G., Granstrem O. K., Roshal, L. M. Autoantibodies to glutamate receptors and products of nitric oxide metabolism in serum in children in the acute phase of craniocerebral trauma // *Neuroscience and behavioral physiology*. 2009. 39(4): 329–334.
15. Lombardi G., Dianzani C., Miglio G., Canonico P.L., Fantozzi R. Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes // *Br J Pharmacol*. 2001.133(6): 936-944.
16. Сорокина Е.Г., Черненко М.А., Реутов В.П., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Сурин А.М. Гиперстимуляция Glu рецепторов нейронов мозжечка: влияние NO на уровень АТФ // В сборнике: Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции. под редакцией Е. Л. Глориозова. 2016: 140-153.
17. Радыгина Т.В., Сорокина Е.Г., Петричук С.В., Купцова Д.Г., Курбатова О.В., Потапов А.С., Афанасьева С.А. Оценка функциональной активности эктонуклеотидазы CD39 в регуляторных Т-клетках у детей с воспалительными заболеваниями кишечника // *Медицинская иммунология*. 2023. Т. 25(2): 415-422.
18. Закиров Р.Ш., Сорокина Е.Г., Карасёва О.В., Семёнова Ж.А., Петричук С.В., Рошаль Л.М., Пинелис В.Г. Функциональное состояние митохондрий лимфоцитов периферической крови при черепно-мозговой травме у детей // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015. Т. 70 (6): 710-717.
19. Reutov V.P., Sorokina E.G. Causal Relationship between Physiological and Pathological Processes in the Brain and in the Gastrointestinal Tract: The Brain-Intestine Axis // *Biophysics (Oxf)*. 2022. V.67(6): 972-986.
20. Facanali, C. B. G., Sobrado J.C.W., Fraguas J.R., Facanali J.M.R., Boarini L.R., Sobrado, L.F., Cecconello I. The relationship of major depressive disorder with Crohn's disease activity // *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2023. No.78: 100188.
21. Clarke G., Kennedy P.J., Groeger J.A., et al. Impaired cognitive function in Crohn's disease: Relationship to disease activity // *Brain Behav Immun Health*. 2020. V.5:100093.

Сведения об авторах

Елена Геннадьевна Сорокина

к.б.н., ведущий научный сотрудник

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России

Москва, Россия

Эл. почта: sorokelena@mail.ru

Софья Анатольевна Афанасьева

лаборант-исследователь

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России

Москва, Россия

Эл.почта: afsonia11@yandex.ru

Information about author

Elena Gennadievna Sorokina

Ph.D., the leader researcher

"National Medical Research Center for Children's Health" of the Ministry of Health of Russia

Moscow, Russian Federation

E-mail: sorokelena@mail.ru

¹Sophia Anatolievna Afanasieva

research assistant

"National Medical Research Center for Children's Health" of the Ministry of Health of Russia

Moscow, Russian Federation

E-mail: afsonia11@yandex.ru

Татьяна Вячеславовна Радыгина
к.м.н., старший научный сотрудник
«Национальный медицинский исследова-
тельский центр здоровья детей» Мин-
здрава России
Москва, Россия
Эл. почта: tv.radigina@mail.ru

Светлана Валентиновна Петричук
д.б.н., профессор, главный научный сотруд-
ник
«Национальный медицинский исследова-
тельский центр здоровья детей» Мин-
здрава России
Москва, Россия
Эл. почта: cito@list.ru

Елена Леонидовна Семикина
Д.м.н., зав. Лаборатории клинической ла-
бораторной диагностики
«Национальный медицинский исследова-
тельский центр здоровья детей» Мин-
здрава России
Москва, Россия
Эл. почта: semikina@nczd.ru

Александр Сергеевич Потанов
д.м.н., профессор, заведующий
гастроэнтерологическим отделением с
гепатологической группой
«Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Минздрава России
Москва, Россия
E-mail: potapov@nczd.ru

Валентин Палладиевич Реутов
д. б. н., ведущий научный сотрудник
ФГБУН Институт высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии РАН
Москва, Россия
E-mail: valentinreutov@mail.ru

Tatiana Vyacheslavovna Radygina
Ph.D., senior researcher
"National Medical Research Center for Children's Health" of
the Ministry of Health of Russia
Moscow, Russian Federation
E-mail: tv.radigina@mail.ru

Svetlana Valentinovna Petrichuk
Ph.D., M.D., professor
Chief Scientific Researcher
"National Medical Research Center for Children's Health" of
the Ministry of Health of Russia
Moscow, Russian Federation
E-mail: cito@list.ru

Elena Leonidovna Semikina
Ph.D., M.D., Head of the Department of Clinical Laboratory
Diagnostics
"National Medical Research Center for Children's Health" of
the Ministry of Health of Russia
Moscow, Russian Federation
E-mail: semikina@nczd.ru

Alexander Sergeevich Potapov
M.D., professor, Head of gastroenterology department with
hepatological group;
"National Medical Research Center for Children's Health" of
the Ministry of Health of Russia
Moscow, Russian Federation
E-mail: potapov@nczd.ru

Valentin Palladievich Reutov
Doctor of Biol. Science, Leading Researcher
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of
Russian Academy of Sciences;
Moscow, Russian Federation
E-mail: valentinreutov@mail.ru

УДК 576.54
ГРНТИ 76.29
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.101-105

**Н.В. Бобкова, Д.Ю. Жданова, В.И. Ковалев,
А.В. Чаплыгина.**

Институт биофизики клетки Российской академии наук -
обособленное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследова-
тельский центр «Пушкинский научный центр биологиче-
ских исследований Российской академии наук»

БЛОКАДА АСЕ2-РЕЦЕПТОРА В КУЛЬТУРЕ ГИППОКАМПА МЫШЕЙ 5XFAD КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ SARS-COV-2 НА МОЗГ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА

В статье обсуждается использование прямого ингибитора АСЕ-2-рецепторов в качестве модели условий, происходящих в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера при заражении SARS-CoV-2. Представлены оригинальные экспериментальные данные по применению блокады АСЕ-2-рецептора в первичной клеточной культуре гиппокампа мышей 5xFAD.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, 5XFAD, COVID-19, ACE2, ренин-ангиотензиновая система

N.V. Bobkova, D.Y. Zhdanova, V.I. Kovalev, A.V. Chaplygina
Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

BLOCKADE OF THE ACE2-RECEPTOR IN THE HIPPOCAMPAL CULTURE OF 5XFAD MICE AS A POTENTIAL MODEL OF THE EFFECTS OF SARS-COV-2 ON THE BRAINS OF ALZHEIMER'S DISEASE PATIENTS

This article discusses the use of a direct ACE-2-receptor inhibitor as a model for the conditions that occur in the brains of Alzheimer's disease patients when infected with SARS-CoV-2. Original experimental data on the use of ACE-2-receptor blockade in primary hippocampal cell culture of 5xFAD mice are presented.

Keywords: Alzheimer's disease, 5xFAD, COVID-19, ACE2, renin-angiotensin system

Введение.

Пандемия COVID-19 коснулась пациентов с болезнью Альцгеймера (БА), поскольку они оказались в группе риска, наиболее подверженной тяжелому течению этого заболевания со смертельным исходом. Наряду с понятными трудностями соблюдения мер самозащиты и с наличием характерных коморбидных заболеваний (гипертония, диабет), стало ясно, что у людей, страдающих БА, существуют определенные молекулярные механизмы, предопределяющие высокий риск их смертности от COVID-19, что поставило новые задачи перед исследователями БА [1, с. 1-23; 2, e00917].

Предполагается, что одним из факторов тяжелого течения COVID-19 инфекции у пациентов с БА является снижение уровня ангиотензин конвертирующего энзима 2 (АСЕ2) – ключевого фактора для сохранения баланса двух ветвей ренин-ангиотензиновой системы, которое происходит в результате связывания вируса с этим рецептором [3, с. 270–273]. Вирус SARS-COV-2 для своего внедрения в клетку использует рецептор АСЕ2, вызывая его интернализацию внутрь клетки и дальнейшее снижение плотности АСЕ2. SARS-CoV-2 может проникать в мозг и взаимодействовать с АСЕ2-рецепторами, локализованными на мембранах астроцитов и микроглии [4, с. 582166].

Цель работы.

Наше исследование посвящено созданию в гиппокампальной культуре трансгенных 5XFAD мышей, известной модели БА, дефицит ACE2, моделируя условия, происходящие в мозге пациентов с БА при заражении SARS-CoV-2.

Материалы и методы.

Работа проводилась на первичной клеточной культуре гиппокампа трансгенных мышей линии 5XFAD. Трансгенные животные линии 5XFAD характеризуются ранним выраженным амилоидогенезом в головном мозге, поскольку в своем геноме несут шведскую (K670N/M671L), флоридскую (I716V) и лондонскую (V717I) мутации белка предшественника бета-амилоида APP человека APP (695), а также M146L и L286V мутации в гене пресенилина 1. После генотипирования и формирования групп 5XFAD животных для разведения, осуществляли генотипирование мышат (возрастом 0-1 день) для дальнейшего получения первичной культуры клеток гиппокампа трансгенных мышей стандартным методом.

Блокада ACE2-рецепторов осуществлялась с помощью специфического блокатора MLN-4760, который является эффективным ингибитором ACE-2-рецепторов клеток грызунов. Концентрация MLN-4760 на протяжении всего эксперимента в каждой отдельной лунке составляла 0,2 нмоль в соответствии с рекомендациями производителя. Инкубацию с MLN-4760 осуществляли в течение 2-х недель, при этом каждая замена среды сопровождалась внесением MLN-4760 для поддержания концентрации на постоянном уровне. По окончании экспериментов проводили оценку состояния культур с анализом астроглиальной и нейрональной плотностей.

По окончании экспериментов клеточные культуры фиксировали в течение 10 минут 4% параформальдегидом. Затем увеличивали проницаемость мембран с помощью 0,2% раствора Triton X-100 и в течение часа при комнатной температуре блокировали неспецифическое связывание с антигенами в растворе PBST (PBS+0.1% Tween 20) + 1% BSA с применением 10% сыворотки осла нормализованной (Abcam, ab7475) и 5% сыворотки козла нормализованной (Invitrogen, 31872). Культуры оставляли на ночь при 4°C для инкубирования с первичными антителами Anti-MAP2 antibody – маркерами нейронов (Abcam, ab32454, 1:100), и Anti-GFAP antibody - маркерами астроцитов (Abcam, ab4674, 1:1000). После инкубации окрашивали вторичными антителами с флуоресцентными метками: AlexaFluor 594 (Abcam, ab150076, 1:200), AlexaFluor 488 (Abcam, ab150169, 1:2000), в течение 2 часов при комнатной температуре.

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения Sigma Plot 12.5. Статистическая обработка данных проведена с оценкой достоверности по двухстороннему t- критерию Стьюдента.

Полученные результаты.

Мы проверили предположение о том, что нарушение баланса двух ветвей ренин-ангиотензиновой систем, регулятором которого является мембранный белок, выполняющий функцию ангиотензин конвертирующего фермента 2 (ACE2), может быть одной из причин высокой вероятности гибели пациентов с БА от коронавирусной инфекции. В нашем исследовании мы воспроизвели снижение активности этого рецептора с помощью специфического для мышинного ACE2 блокатора MLN в культуре трансгенных мышей. На рис. 1 представлены результаты блокады ACE2 на состояние астроцитов (зеленая флуоресценция) и нейронов (красная флуоресценция) в трансгенной культуре гиппокампа. На микрофотографиях культур до (А,Б) и после (В,Г) воздействия MLN видно не только драматическое снижение плотности астроцитов и нейронов в культуре гиппокампа трансгенных 5XFAD мышей, но и изменение структуры самих клеток с резким сокращением длины и плотности распределения нейритов, что, вне всякого сомнения, не может не отразиться на морфофункциональных характеристиках таких нейроглиальных комплексов.

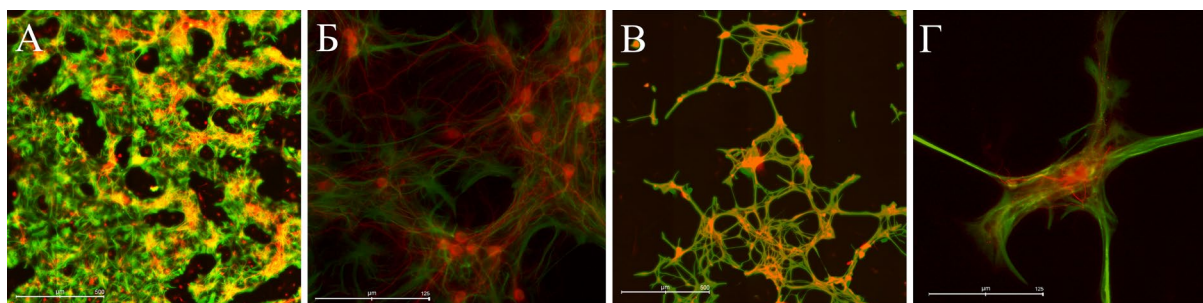


Рисунок 1. Нарушение структуры и разрушение аксонов в трансгенной культуре под воздействием ингибитора ACE2-рецептора MLN-4760.

А, Б – трансгенная культура в нативном состоянии

В, Г – трансгенная культура после введения MLN-4760

А, В – шкала – 500μт. Б, Г – Шкала – 125μт

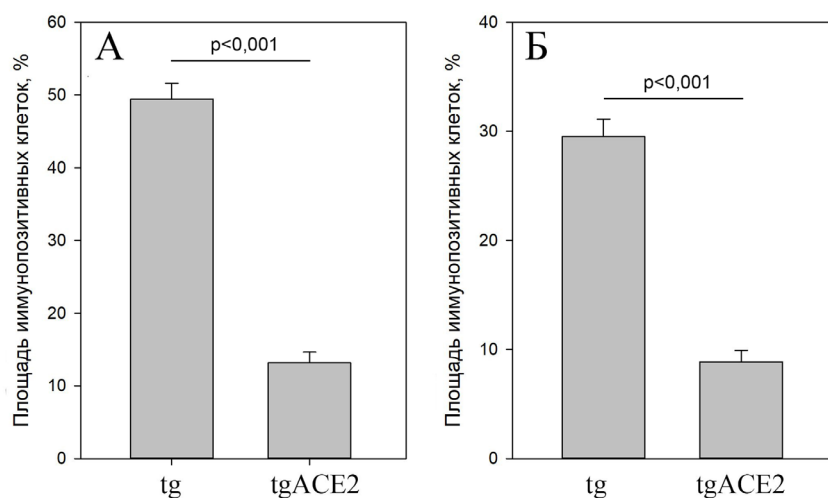


Рисунок 2. Влияние ингибитора ACE2-рецептора MLN-4760 на трансгенные культуры.

А – влияние ACE2-блокады на астроцитарную плотность ($p < 0,001$)

Б – влияние ACE2 блокады на нейрональную плотность ($p < 0,001$)

Драматическое снижение астроцитарной плотности под воздействием блокатора ACE2 (Рис.2 А) в 4,1 раза свидетельствует о важной роли ACE2 рецептора в жизнедеятельности астроцитов. Стоит отметить, что при этом нативная трансгенная культура даже на достаточно ранних сроках (14 дней в нашем опыте) характеризуется выраженным астроцитарным сдвигом, воспроизводя астроглиоз – аномальное увеличение количества астроцитов, наблюдаемое при БА. Опубликованные данные других исследований также свидетельствуют о нарушении функции астроглии, которое отмечено у нокаутных по гену ACE2 мышей, характеризующихся потерей памяти, снижением нейрогенеза, ухудшением морфофункционального состояния нейронов и глии вплоть до развития дегенерации [5, с. 582345]. По-видимому, использование MLN, позволяет моделировать условия в мозге пациентов с БА при заражении SARS-CoV-2. В отличие от существующих моделей COVID-19 на трансгенных мышах со встроенным геном ACE2 человека и использующих введение в глаз вирусных частиц, наша клеточная модель не требует специальных условий для работы с вирусами. Учитывая, что вирус SARS-CoV-2 для своего внедрения в клетку взаимодействует с ACE2 рецептором, вызывая его интернализацию и снижение плотности ACE2 на мембране, мы полагаем, что данная модель может быть использована для проведения тестирования препаратов, препятствующих развитию последствий блокады ACE2 рецепторов.

Выводы.

Блокада ACE2-рецептора приводит к снижению плотности астроцитов и нейронов в культуре гиппокампа трансгенных 5xFAD мышей и влияет на структуру как

отдельных клеток, так и на общую морфологию культуры. Использование MLN, позволяет моделировать условия в мозге пациентов с БА при заражении SARS-CoV-2.

Заключение

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

Впервые в качестве моделирования процессов, происходящих в мозге пациентов с БА была проведена блокада ACE2-рецептора его прямым ингибитором. Показано изменение астроцитарно-нейрональных плотностей культур, изменение структуры клеток и общей морфологии первичной культуры гиппокампа мышей 5xFAD, отражая процессы, происходящие в мозге больных БА при заражении вирусом SARS-CoV-2.

Исследование было поддержано Российским Научным Фондом (№ 18-15-00392).

Литература.

1. Golzari-Sorkheh M., Weaver D.F., Reed M.A. COVID-19 as a Risk Factor for Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis.* 2023. Vol. 91. № 1. P. 1-23.
2. Lumbers E.R., Head R., Smith G.R., Delforce S.J., Jarrott B., Martin J.H., Pringle K.G. The interacting physiology of COVID-19 and the renin-angiotensin-aldosterone system: Key agents for treatment // *Pharmacol. Res. Perspect.* 2022. Vol. 10, №. 1, P. e00917.
3. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.-R., Zhu Y. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // *Nature.* 2020. Vol. 579, № 7798. P. 270–273.
4. McMillan P., Dexheimer T., Neubig R.R., Uhal B.D. COVID-19 – A Theory of Autoimmunity Against ACE-2 Explained // *Front. Immunol.* 2021, Vol. 12. P. 582166.
5. Panariello F., Cellini L., Speciani M., De Ronchi D., Atti A.R. How Does SARS-CoV-2 Affect the Central Nervous System? A Working Hypothesis // *Front Psychiatry.* 2020 Vol. 11. P. 582345.

Сведения об авторах

Наталья Викторовна Бобкова

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пуцино, Россия

e-mail: nbobkova@mail.ru

Дарья Юрьевна Жданова

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пуцино, Россия

e-mail: ddzhdanova@mail.ru

Владимир Игоревич Ковалев

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пуцино, Россия

e-mail: ladiko@post.com

Information about author

Natalya Viktorovna Bobkova

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Pushchino, Russia

e-mail: nbobkova@mail.ru

Daria Yurievna Zhdanova

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Pushchino, Russia

e-mail: ddzhdanova@mail.ru

Vladimir Igorevich Kovalev

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

Pushchino, Russia

e-mail: ladiko@post.com

Алина Вадимовна Чаплыгина

*Институт биофизики клетки Российской академии наук
- обособленное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский
центр «Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»*

Пуцдино, Россия

e-mail: shadowhao@yandex.ru

Alina Vadimovna Chaplygina

*Institute of Cell Biophysics of the Russian
Academy of Sciences
Pushchino, Russia
e-mail: shadowhao@yandex.ru*

УДК 577.23

ГРНТИ 34.45.21

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.105-110

А.С. Дашкова

Биотехнологический факультет Московского государственного
университета им. М.В. Ломоносова

**В.И. Ковалев, А.В. Чаплыгина, Д.Ю. Жданова,
Н.В. Бобкова.**

*Институт биофизики клетки Российской академии наук -
обособленное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский
центр «Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»*

Российской академии наук»

СИНАПТОСОМАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ДОСТАВКИ МИТОХОНДРИЙ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦ- ЦГЕЙМЕРА

В статье обсуждается применение выделенных из головного мозга синапсом в качестве средства для доставки митохондрий и восстановления митохондриального биогенеза для терапии болезни Альцгеймера. Впервые представлены экспериментальные данные по применению препарата синапсом на мышах с моделью болезни Альцгеймера 5XFAD.

Ключевые слова: синапсомы, биогенез митохондрий, болезнь Альцгеймера, 5XFAD

A.S. Dashkova

Lomonosov Moscow State University Faculty of Biotechnology
V.I. Kovalev, A.V. Chaplygina, D.Y. Zhdanova, N.V. Bobkova
Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

SYNAPTOSOMAL PREPARATION FOR MITOCHONDRIAL DELIVERY AS A POTEN- TIAL AGENT FOR ALZHEIMER'S DISEASE THERAPY

In the article, the application of synaptosomes isolated from the brain as a means for mitochondrial delivery and restoration of mitobiogenesis for the therapy of Alzheimer's disease is discussed. Experimental data on the application of synaptosomes in mice with the 5XFAD model of Alzheimer's disease are presented for the first time.

Keywords: synaptosomes, mitochondrial biogenesis, Alzheimer's disease, 5XFAD

Введение.

Болезнь Альцгеймера (БА) является серьезным нейродегенеративным заболеванием с прогрессирующей деменцией и одной из наиболее распространенных причин снижения когнитивных способностей у пожилых людей. Согласно данным Всемирной

организации здравоохранения, ожидается, что число пациентов с БА увеличится в несколько раз в ближайшие десятилетия, что делает разработку эффективных терапевтических подходов важной задачей современной медицины.

Одним из ключевых аспектов патогенеза БА является нарушение функций синаптических митохондрий и ухудшение биогенеза митохондрий, что приводит к энергетическому дефициту и потере синаптических связей между нейронами. В связи с этим, разработка новых стратегий для доставки митохондрий в мозг с целью восстановления биогенеза митохондрий и улучшения синаптической передачи является перспективным направлением в контексте терапии БА.

Одной из самых новых и пока малоизученных стратегий является использование синаптосом в качестве мембранной структуры для доставки митохондрий [1, с. 1]. Синаптосомы – это сферические искусственно замкнутые в результате выделения синаптические окончания нейронов, размером

1-1,5 мкм, которые содержат митохондрии, аппарат для синтеза белка и везикулы с нейромедиаторами. Исследования синаптосом проводятся с 60-х годов прошлого века, однако они рассматривают синаптосомы пусть в качестве уникальной и удобной, позволяющей применять как биохимические так и физиологические подходы к изучению, но все же модели синаптической передачи между клетками в норме и патологии [2, с. 3]. На данный момент не существует работ по использованию препаратов синаптосом для терапии нейродегенеративных заболеваний на моделях *in vivo*.

В данной статье мы обсудим экспериментальные данные о применении синаптосомальных препаратов в качестве потенциального средства для терапии БА.

Цель работы.

Исследование посвящено применению препарата синаптосом для улучшения когнитивных функций у трансгенных 5XFAD мышей, наследственной модели БА.

Материалы и методы.

Животные. Мыши линии 5XFAD – широко используемая модель семейной формы БА, получены на смешанном фоне SJL/C57B16 путем коэкспрессии гена APP человека (APP695) со шведской (K670N/M671L), флоридской (I716V) и лондонской (V717I) мутациями, а также гена пресенилина человека с мутациями M146L и L286V под Thy1 промотором. Мыши 5XFAD были ранее приобретены у лаборатории JAX и содержались на смешанном фоне SJL/C57B16. Животные содержались в специализированном виварии со свободным доступом к воде и стандартизированному корму при температуре 22–24°C и естественной освещенности.

Исследования проводились в полном соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными и правилами надлежущей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г., № 199н). Все процедуры на животных были одобрены Комиссией по биобезопасности и биоэтике (Институт биофизики клетки – Пущинский научный центр биологических исследований РАН, разрешение № 3 от 12 июня 2020 г.) в соответствии с Директивой 2010/ 63/ЕС Европейского парламента.

Выделение препарата синаптосом. Синаптосомы выделяли из коры больших полушарий головного мозга мышей NMRI возрастом 3-7 дней методом дифференциального центрифугирования в градиенте фикола по методике [2, с. 264] с модификациями. Для этого декапитировали животное, извлекали мозг, выделяли кору больших полушарий мозга и помещали её в ледяную среду №1 (0,32 М сахароза, 10 mM HEPES, ингибиторы протеаз и фосфатаз, pH = 7,4) для последующей гомогенизации. Измельченную ткань центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, затем собирали надосадочную жидкость и снова подвергали центрифугированию при большей скорости (12000 g, 20 мин). Осадок ресуспендировали в среде №1 и наслаивали на заранее приготовленный градиент фикола (5/13 % фикола на среде №1, pH = 7,4) в соотношении 1 часть синаптосомальной суспензии к 4 частям фикола. Полученный градиент подвергали

центрифугированию (26500 g, 45 мин), по завершении которого отбирали срединную фракцию, соответствующую синапсосомам, и отмывали её в среде №1 (30000 g, 10 мин). Часть выделенных синапсосом дополнительно обрабатывалась ротеноном, блокирующим электрон-транспортную цепь, для получения синапсосом с нефункциональными митохондриями. Для этого суспензию синапсосом в растворе среды №1 обрабатывали ротеноном в конечной рабочей концентрации 2 мкМ в сочетании с дигитонином (50 мкМ), инкубировали в течение 10 мин и отмывали в среде №1 (30000 g, 10 мин). На последнем шаге и обработанные, и необработанные синапсосомы ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации белка 3,3 мкг/мл (концентрацию белка определяли по методу Бредфорда).

Интраназальные микроинъекции синапсосом in vivo. Свежеизолированные синапсосомы вводили трангенным мышам линии 5XFAD в объёме 3 мкл в каждую ноздрю (общий объём 6 мкл). Были сформированы 5 экспериментальных групп мышей: (1) контрольная группа мышей «NMRI+NaCl» (возраст – 6 месяцев, n=6), получавших физиологический раствор; (2) контрольная группа однопометных нетрансгенных мышей фона SJL/C57B16 «ntg+NaCl» (возраст – 5-7 месяцев, n=6), получавших физиологический раствор; (3) контрольная группа трансгенных мышей линии 5XFAD «tg+NaCl», получавших физиологический раствор (возраст – 5-7 месяцев, n=7); (4) группа трансгенных мышей линии 5XFAD «tg+Syn (+Rotenone)», получавших синапсосомы с нефункциональными митохондриями (возраст – 5-7 месяцев, n=7); (5) группа трансгенных мышей линии 5XFAD «tg+Syn», получавших синапсосомы с функциональными митохондриями (возраст – 5-7 месяцев, n=7). Интраназальное введение соответствующих растворов проводилось два раза в неделю в течение 3 недель (рис.1).

Поведенческий тест «водный лабиринт Морриса». Поведенческие тесты проводились спустя три недели после начала интраназального введения синапсосом. Выработка навигационного рефлекса в водном лабиринте Морриса проводилась по методике [3, с. 3] с модификациями. Со всеми пятью экспериментальными группами мышей было проведено четыре предтренировочных испытания для определения их латентного периода нахождения открытой (видимой) платформы, чтобы убедиться в отсутствии у животных двигательных и зрительных нарушений, которые могли бы повлиять на результаты теста. Период обучения длился 7 дней и включал четыре ежедневных тренировки с регистрацией латентных периодов нахождения невидимой платформы. По завершении обучения проводилось тестирование пространственной памяти, предполагающее отсутствие спасательной платформы в течение 1 мин. Память считалась хорошей, если мыши оставались достоверно дольше в целевом секторе или посещали его чаще, чем любой из индифферентных секторов. Состояние пространственной памяти оценивалось по времени, проведенному в секторах бассейна. Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения Statistica 12. Для определения достоверности нахождения целевого сектора использовали дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным сравнением по критерию Dunnett.

Секция 5. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ

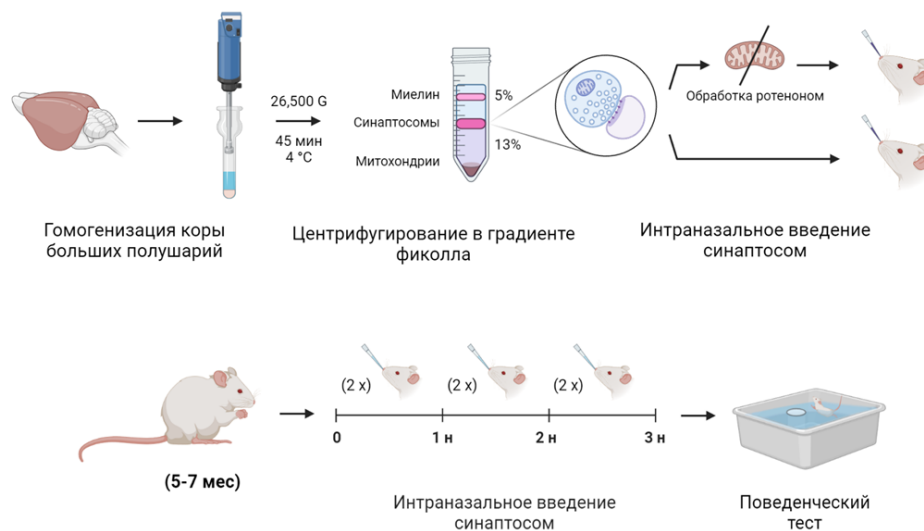


Рисунок 1. Схема эксперимента

Полученные результаты.

Мы провели первое экспериментальное исследование о возможности препарата синаптосом при интраназальном введении оказывать положительный эффект на пространственную память у мышей с моделью БА. Также проверили предположение о том, что синаптосомы имеющие богатый функциональный состав могут оказывать эффект не только в качестве средства по доставке митохондрий, но также являться самостоятельным препаратом. Из результатов поведенческого теста можно сделать вывод, что однозначно не справляются с выделением целевого сектора «больные» трансгенные животные, получавшие физиологический раствор. Здесь стоит отметить, что выбранный возраст животных 5-7 месяцев является значимым для развития серьезных патологий у данной модели животных и наше воздействие препаратом синаптосом может рассматриваться как средство лечения. Для группы трансгенных животных, получавших препарат синаптосом, обработанный «митохондриальным ядом» ротеноном с нефункциональными митохондриями характерно достоверное выделение целевого сектора только от двух других, свидетельствуя о несколько худшем уровне пространственной памяти, но при этом по времени пребывания в третьем секторе данная группа достоверно не отличается от контрольных «здоровых» животных, что говорит о том что синаптосомальный препарат имеет более комплексное действие нежели просто средство для доставки митохондрий. Группа трансгенных животных, получавших полноценный препарат синаптосом показал не отличимые от «здоровых» контрольных групп результаты (рис.2).

Несмотря на то, что экспериментальные исследования на животных и клеточных моделях АБ показали перспективные результаты, вопросы механизмов действия синаптосомальных препаратов остаются открытыми и требуют дальнейшего исследования.

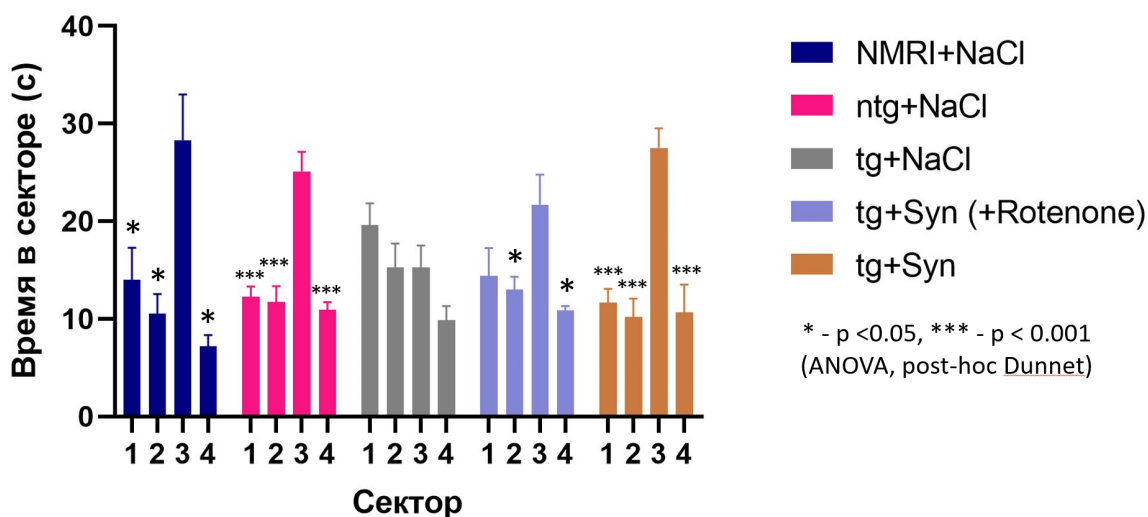


Рисунок 2. Результаты поведенческого теста «водный лабиринт Морриса»

Выводы.

Интраназальное введение синапсом улучшает пространственную память у мышей с наследственной формой болезни Альцгеймера.

Заключение

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

Впервые *in vivo* на модели мышей 5XFAD с наследственной формой болезни Альцгеймера продемонстрирован лечебный эффект препарата синапсом, выделенного из коры больших полушарий мозга на пространственную память животных.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00485.

Литература.

1. Picone P. et al. Synaptosomes: new vesicles for neuronal mitochondrial transplantation // *J. Nanobiotechnology. BioMed Central*, 2021. Vol. 19, № 1. P. 1–15.
2. Murphy K.M. Synaptosomes (*Neuromethods* 141). New York: Springer US, 2018. 3–311 p.
3. Bobkova N. V et al. Intranasal administration of mitochondria improves spatial memory in olfactory bulbectomized mice. // *Exp. Biol. Med. (Maywood). England*, 2022. Vol. 247, № 5. P. 416–425.

Сведения об авторах

Алла Сергеевна Дашкова

Биотехнологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова
Москва, Россия

e-mail: alladashkova@gmail.com

Владимир Игоревич Ковалев

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пушино, Россия

e-mail: ladiko@post.com

Information about author

Alla Sergeevna Dashkova

Lomonosov Moscow State University Faculty of Biotechnology
Moscow, Russia

e-mail: alladashkova@gmail.com

Vladimir Igorevich Kovalev

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russia

e-mail: ladiko@post.com

Секция 5. КЛИНИЧЕСКИЕ НЕЙРОНАУКИ

Алина Вадимовна Чаплыгина

*Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»
Пушино, Россия
e-mail: shadowhao@yandex.ru*

Дарья Юрьевна Жданова

*Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»
Пушино, Россия
e-mail: ddzhdanova@mail.ru*

Наталья Викторовна Бобкова

*Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»
Пушино, Россия
e-mail: nbobkova@mail.ru*

Alina Vadimovna Chaplygina

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russia
e-mail: shadowhao@yandex.ru*

Daria Yurievna Zhdanova

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russia
e-mail: ddzhdanova@mail.ru*

Natalya Viktorovna Bobkova

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russia
e-mail: nbobkova@mail.ru*

УДК 577.336; 57.01
ГРНТИ 34.45.21
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.111-115

Д.Ю. Жданова, В.И. Ковалев, А.В. Чаплыгина
Институт биофизики клетки Российской академии наук -
обособленное подразделение Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследователь-
ский центр «Пушкинский научный центр биологических иссле-
дований Российской академии наук»

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЛИПОФУСЦИНА В МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА С ВОЗРАСТОМ

В статье обсуждается изменение уровня липофусцина у 5xFAD мышей, модели болезни Альцгеймера (БА), а также у нетрансгенных животных в сердце в разных возрастных группах. Полученные результаты показали, что накопление бета-амилоида (1-42) в модели БА способствует увеличению содержания липофусцина в сердце, что может вызывать дальнейшее развитие осложнений и патологических процессов.

Ключевые слова: бета-амилоид, болезнь Альцгеймера, липофусцин, 5xFAD, старение

D.Yu. Zhdanova, V.I. Kovalev, A.V. Chaplygina
Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences

CHANGE IN LIPOFUSCIN LEVELS IN AN ALZHEIMER'S DISEASE MODEL WITH AGE

The article discusses the change in the level of lipofuscin in 5xFAD mice, a model of Alzheimer's disease (AD), as well as in non-transgenic animals in the heart in different age groups. The results obtained showed that the accumulation of beta-amyloid (1-42) in the AD model contributes to an increase in the content of lipofuscin in the heart, which can cause further development of complications and pathological processes.

Keywords: beta-amyloid, Alzheimer's disease, lipofuscin, 5xFAD, aging

Введение

В процессе старения происходит снижение физиологических функций, что может приводить к хроническим заболеваниям и повышенному риску смерти. По мере того, как в мире количество пожилых людей продолжает расти, распространенность множественных хронических заболеваний, включая сердечно-сосудистые заболевания, диабет, неврологическую дегенерацию и рак, также увеличивается, и, кроме того, увеличивается потребность в комплексном медикаментозном лечении [1, с. 1-2; 2, с. 2354-2360].

Накопление липофусцина рассматривают в качестве одного из возможных маркеров старения [3, с. 3]. Этот пигмент был впервые обнаружен в нервных клетках в 1842 году, и позже было обнаружено, что он увеличивается с возрастом. Липофусцин появляется в виде темных гранул в цитоплазме клеток и более распространен у пожилых людей и у людей с сердечной недостаточностью [3, с. 1,3; 4, с. 58-59; 5, с. 1-2]. Он состоит из окисленных липидов, ковалентно «сшитых» белков, олигосахаридов и переходных металлов [5, с. 1]. Липофусцин нерастворим и не расщепляется лизосомными ферментами или протеасомной системой, а его накопление связано с повреждением митохондрий и окислительным стрессом. Накопление липофусцина может уменьшить лизосомную деградацию, что приводит к дальнейшей аккумуляции и может способствовать гибели клеток [6, с. 1-2; 7, с.246]. Липофусцин особенно заметен в постмитотических клетках, таких как кардиомиоциты, клетки пигментного эпителия сетчатки, гепатоциты, нейроны и кератиноциты, где он считается признаком старения [3, с. 1,3].

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее значимым из возрастных заболеваний, и в возрасте 80 лет заболеваемость БА в 20 раз выше, чем в 60 лет [8, с. 69-70]. К тому же БА иногда ассоциируется с ускоренным старением [9, с. 841; 10, с. 163-175]. Полагают, что скорость накопления миокардиального липофусцина положительно

коррелирует с хронологическим старением [11, с. 1], в связи с чем, представляло интерес изучить взаимосвязь уровней липофусцина у мышей 5xFAD -модели БА, в разных возрастных группах в сравнении с нетрансгенными контрольными животными.

Цель работы.

В сравнительном плане исследовать уровни липофусцина в сердце у мышей 5xFAD, модели БА, и нетрансгенных животных в разных возрастных группах.

Материалы и методы.

Мыши линии 5xFAD - модель familialной формы БА, получены на смешанном фоне SJL/C57B16 путем коэкспрессии гена APP человека (APP695) со шведской (K670N/M671L), флоридской (I716V) и лондонской (V717I) мутациями, а также гена пресенилина человека с мутациями M146L и L286V под Thy1 промотором. Животные содержались в специализированном виварии со свободным доступом к воде и стандартизированному корму при температуре 22 - 24°C и естественной освещенности.

Трансгенных мышей генотипировали с помощью классической ПЦР. Наличие трансгенной кассеты выявляли с помощью праймеров 5'-AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG-3' и 5'-CGG GGG TCT AGT TCT GCA T-3', с последующим электрофоретическим визуализированием для выявления носителей трансгенной кассеты длиной 377 пар нуклеотидов. Исследования проводились в полном соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными и правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ от 01.04.2016 г., № 199н).

Для приготовления гомогената сердца использовали мышей возрастом 1 день, 4 месяца и 15 месяцев. Извлеченное сердце помещали в среду 250 мМ Сахарозы, 0,5 мМ EGTA, 10 мМ HEPES (pH 7.0), продавливая через пресс и далее гомогенизируя в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком до достижения почти полного разрушения тканей. Полученный гомогенат центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 с для удаления крупных неразрушенных частиц, которые быстро оседали. Гомогенат надосадочной жидкости расфасовывали в пробирки объемом 1 мл, замораживали и хранили в морозильной камере. После оттаивания образцы выравнивали по содержанию белка (0,3 мг/мл) с помощью УФ-экспресс-метода по оптической плотности в ультрафиолете при 286 нм. Синюю липофусциновую флуоресценцию выявляли в условиях растворения гомогенатов в детергенте додецилсульфате натрия, разрушающем мембраны и не-ковалентные белковые комплексы. Липофусцин не разрушался детергентом из-за прочных химических связей между денатурированными белками, флуоресцирующими в синей области. Липофусциновую флуоресценцию возбуждали – при 360 нм и выявляли в области - 460 нм. Определение содержания липофусцина в гомогенатах проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) в односантиметровых кюветах. Обработку данных проводили с помощью программы Sigma Plot 12.5. Значения на графиках являются усредненными по всем экспериментам. Проверка гипотезы о нормальном распределении осуществлялась с применением теста Шапиро-Уилка. Оценка различий между попарными выборками проведена с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Для сравнения различий между группами и определения статистической значимости использовались однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным сравнением групп по методу Бонферрони.

Полученные результаты.

В последнее время БА привлекает внимание в качестве системного заболевания, при котором не только головной мозг, но и другие органы и системы, в частности сердечно-сосудистая, подвергаются определенным осложнениям. С другой стороны, пациенты с сердечными аномалиями также подвержены более высокому риску ухудшения когнитивных функций и деменции, возможно, из-за снижения сердечного выброса и

хронической церебральной гипоперфузии. Тем не менее, корреляция между БА и сердечными аномалиями остается неясной [12, с. 2].

Как в сердце, так и в головном мозге пациентов с БА может обнаруживаться амилоидная и/или атеросклеротическая ангиопатия, вызывающая поражение этих органов. Можно предположить, что бета-амилоид ($A\beta$) может откладываться в дистальных органах, таких как скелетные мышцы, кожа, почки, легкие и кишечник, через кровоток, вызывая другие формы неврологической амилоидной патологии [13, с. 2].

$A\beta$ был обнаружен в митохондриях пациентов с БА, а повышенная агрегация $A\beta$ взаимосвязана с митохондриальной дисфункцией. Митохондриальная дисфункция также опосредует гибель эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга, индуцированную олигомерами $A\beta$ [14, с. 373]. Накопление дисфункциональных митохондрий приводит к повышенному образованию активных форм кислорода и, следовательно, может способствовать формированию липофусцина. В проведенном исследовании было изучено изменение с возрастом уровня липофусцина, регистрируемого по характерной флуоресценции в гомогенатах сердца у 5xFAD мышей – модели БА.

Липофусцин характеризуется интенсивной флуоресценцией в синей области спектра при возбуждении в ближней УФ-области. На рис. 1 представлены спектры излучения гомогенатов сердца мышей при возбуждении 360 нм. Максимумом для липофусциновой флуоресценции является длина волны 460 нм.

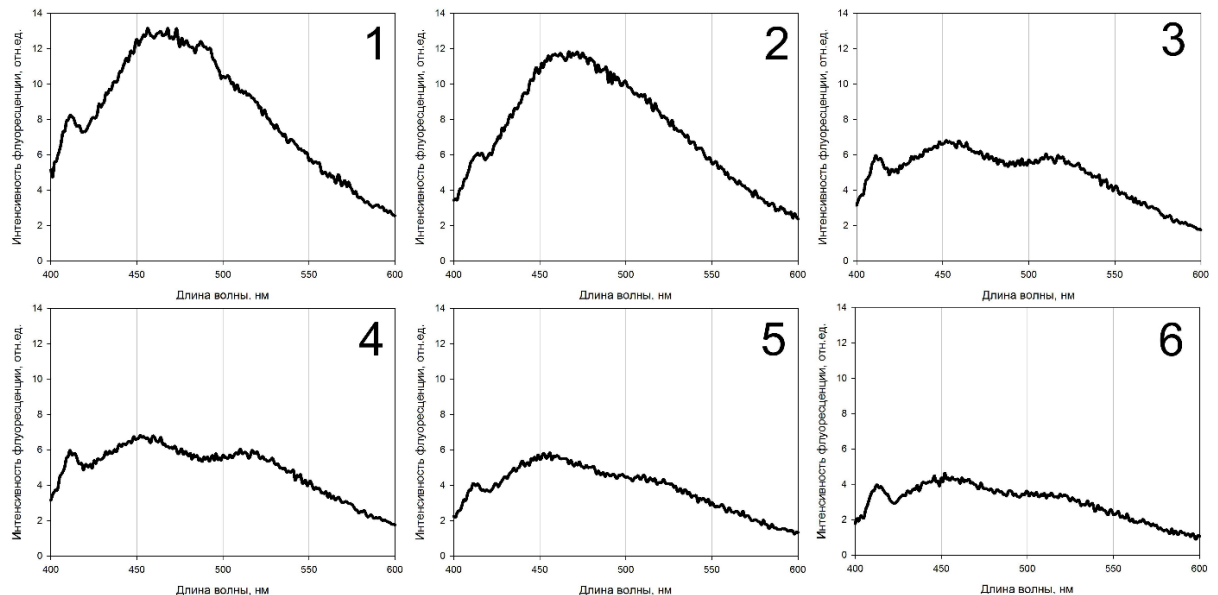


Рисунок 1. Спектры липофусциновой флуоресценции гомогенатов сердца трансгенных 5xFAD (Tg) и нетрансгенных (nTg) животных разных возрастов (длина волны возбуждения 360 нм / длина волны излучения 460 нм). По оси абсцисс – длина волны, нм; по оси ординат – интенсивность флуоресценции, отн.ед. 1 – Tg - 15 месяцев; 2 – Tg - 4 месяца; 3 – Tg - 1 день; 4 – nTg - 15 месяцев; 5 – nTg - 4 месяца; 6 – nTg - 1 день.

Считается [11, с. 1], что с возрастом уровень липофусцина в кардиомиоцитах возрастает; в наших экспериментах у контрольных нетрансгенных животных также было обнаружено достоверное ($p < 0.001$) увеличение уровня интенсивности липофусциновой флуоресценции в гомогенатах сердца. Так, в группе животных, возраст которых составлял 15 месяцев, интенсивность липофусциновой флуоресценции составила $6,482 \pm 0,221$ отн.ед., а в группах мышей возрастом 4 месяца и 1 день: $5,501 \pm 0,183$ и $4,209 \pm 0,125$ отн.ед. соответственно.

У трансгенных мышей 5xFAD уровень липофусциновой флуоресценции в возрасте 15 месяцев значительно превышал уровень, наблюдаемый у нетрансгенных животных аналогичного возраста, и составил $12,812 \pm 0,167$ отн.ед. Также уровень флуоресценции липофусцина у трансгенных мышей 5xFAD в возрасте 15 месяцев достоверно ($p < 0.001$) превышал уровень, наблюдаемый у 4-х месячных животных

(11,560±0,157 отн.ед.) и был значительно больше, чем у однодневных животных (6,482±0,221 отн.ед.). Известно, что у мышей 5xFAD наблюдается накопление внутринейронального Аβ (1-42) к 1,5 месяцам, отложение амилоида к 2 месяцам и дефицит памяти к 4-месячному возрасту [15, с. 1]. Таким образом, мы показали, что чрезмерное образование Аβ способствует накоплению нерастворимых липофусциновых гранул в сердце, что может провоцировать дальнейшие нарушения функционирования тканей и органов.

Выводы.

Полученные результаты показали, что Аβ в мышечной модели БА способствует накоплению липофусцина в сердце, что способно приводить к дальнейшему развитию осложнений и ухудшению состояния.

Заключение

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

Впервые в сравнительном плане было показано изменение уровней липофусцина в сердце у мышей 5xFAD, модели болезни Альцгеймера, а также нетрансгенных животных в разных возрастных группах.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00485.

Литература.

1. Ferrucci L., Gonzalez-Freire M., Fabbri E., Simonsick E., Tanaka T., Moore Z. Salimi S., Sierra F., de Cabo, R. *Measuring biological aging in humans: A quest // Aging cell. 2020. No. 19(2), P. 1-21.*
2. Cai Y., Song W., Li J., Jing Y., Liang C., Zhang L., Zhang W., Liu B., An Y., Li J., Tang B., Pei S., Wu X., Liu Y., Zhuang C., Ying Y., Dou X., Chen Y., Xiao F., Li D., Yang R., Zhao Y., Wang Y., Wang L., Li Y., Ma S., Wang S., Song X., Ren J., Zhang L., Wang J., Zhang W., Xie Z., Qu J., Wang J., Xiao Y., Tian Y., Wang G., Hu P., Ye J., Sun Y., Mao Z., Kong Q., Liu Q., Zou W., Tian X., Xiao Z., Liu Y., Liu J., Song M., Han J., Liu G. H. *The landscape of aging //Science China Life Sciences. 2022. V.65. P. 2354–2454.*
3. Tonolli P. N., Baptista M. S., Chiarelli-Neto O. *Melanin, lipofuscin and the effects of visible light in the skin //Journal of Photochemistry and Photobiology. 2021. V. 7. P. 1-5.*
4. Porta E. A. *Pigments in aging: an overview //Annals of the New York Academy of Sciences. 2002. No. 959(1). P. 57-65.*
5. Li W., Wang H. J., Tan Y. Z., Wang Y. L., Yu S. N., Li Z.H. *Reducing lipofuscin accumulation and cardiomyocytic senescence of aging heart by enhancing autophagy // Experimental Cell Research. 2021. No. 403(1). P. 1-11.*
6. Ковалев В. И., Жданова Д.Ю., Бобкова Н.В., Чаплыгина А.В. *Влияние веществ на образование термолипофусцина //Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. 2022. Т.30. С. 384-389.*
7. Reeg S., Grune T. *Protein oxidation in aging: does it play a role in aging progression? //Antioxidants & redox signaling. 2015. No. 23(3). P. 239-255.*
8. Katzman R. *Alzheimer's disease as an age-dependent disorder //Ciba Foundation Symposium 134-Research and the Ageing Population: Research and the Ageing Population: Ciba Foundation Symposium 134. – Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd., 2007. – P. 69-85.*
9. Dorninger F., Moser, A. B., Kou, J., Wiesinger, C., Forss-Petter, S., Gleiss, A., Hinterberger, M., Jungwirth, S., Fischer, P., Berger, J. *Alterations in the plasma levels of specific choline phospholipids in Alzheimer's disease mimic accelerated aging //Journal of Alzheimer's Disease. 2018. No. 62(2). – P. 841-854.*
10. Жданова, Д. Ю., Ковалев, В. И., Чаплыгина, А. В., Бобкова, Н. В., Полтавцева, Р. А.,

Сухих, Г. Т. Белок YB-1 предотвращает возрастное снижение уровня эстрадиола в плазме крови у трансгенных стареющих самок мышей 5xFAD // *Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова*. 2023. Т. 109. №. 2. С. 163–177.

11. Kakimoto Y., Okada, C., Kawabe, N., Sasaki, A., Tsukamoto, H., Nagao, R., Osawa, M. Myocardial lipofuscin accumulation in ageing and sudden cardiac death // *Scientific reports*. 2019. No. 9(1). P. 1-8.

12. Yang M. Li, C., Zhang, Y., Ren, J. Interrelationship between Alzheimer's disease and cardiac dysfunction: the brain–heart continuum? // *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2020. No. 52(1). P. 1-8.

13. Tini G., Scagliola R., Monacelli F., La Malfa G., Porto I., Brunelli C., Rosa G. M. Alzheimer's disease and cardiovascular disease: a particular association // *Cardiology research and practice*. 2020. V. 2020. Article ID 2617970. P. 1-10.

14. Jang S., Chapa-Dubocq X. R., Parodi-Rullán R. M., Fossati S., Javadov S. Beta-amyloid instigates dysfunction of mitochondria in cardiac cells // *Cells*. 2022. No. 11(3). P. 373.

15. Eimer W. A., Vassar R. Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation // *Molecular neurodegeneration*. 2013. No. 8(1). P. 1-12.

Сведения об авторах

Жданова Дарья Юрьевна

научный сотрудник

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пушино, Россия

Эл. почта: ddzhdanova@mail.ru

Ковалев Владимир Игоревич

научный сотрудник

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пушино, Россия

Эл. почта: ladiko@post.com

Чаплыгина Алина Вадимовна

научный сотрудник

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пушино, Россия

Эл. почта: shadowhao@yandex.ru

Information about author

Zhdanova Daria Yurievna

Scientific collaborator

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russian Federation
E-mail: ddzhdanova@mail.ru

Kovalev Vladimir Igorevich

Scientific collaborator

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russian Federation
E-mail: ladiko@post.com

Chaplygina Alina Vadimovna

Scientific collaborator

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russian Federation
E-mail: shadowhao@yandex.ru

УДК 93/94:[57/61+53/52]
ГРНТИ 34.01
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.116-121

А.Ф. Топунов, О.В. Космачевская
Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

ПАРАЛЛЕЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ БИОЛОГИИ И ФИЗИКИ В ИСТОРИИ НАУКИ

При рассмотрении истории биологии и физики можно заметить временную параллельность в основных этапах их развития. Поэтому можно оспорить распространенное мнение, что на протяжении развития естествознания физика занимает лидирующую позицию. Интересно, что ранние этапы развития биологии часто предварялись соответствующими этапами развития медицины, а этапы физики – астрономии.

Ключевые слова: биология, медицина, физика, астрономия, параллельность развития.

A.F. Topunov, O.V. Kosmachevskaya
Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences

PARALLEL DEVELOPMENT OF BIOLOGY AND PHYSICS IN SCIENCE HISTORY

When considering the history of biology and physics, one can see parallelism in the main stages of their development, up to the proximity of dates of the most important discoveries. Therefore, the widespread opinion that almost all the time it was physics that was the science leader is not entirely true. Interestingly, the early stages of biology development were often preceded by corresponding stages of medicine, and the stages of physics – by astronomy.

Keywords: biology, medicine, physics, astronomy, parallel development.

Введение

Распространенным является мнение, что именно физика в течение длительного времени являлась лидером в развитии естествознания, и поэтому наша цивилизация преимущественно физико-техническая, а не биолого-медицинская. Но так ли это? Внимательное рассмотрение этих двух направлений науки на всем протяжении их развития показывает, что это не совсем верно. В данной работе мы постарались показать, что развитие биологии и физики на всем протяжении истории науки шло параллельно, а часто и практически одновременно.

Цель работы.

Выявить и описать временную параллельность в развитии биологии и физики на всем протяжении истории естествознания.

Материалы и методы.

На основании данных по истории науки проводилось сравнение времени осуществления важнейших этапов развития биологии и физики, а также «спутниковых» наук – медицины и астрономии. Поскольку очень часто схожие мысли и идеи возникали у нескольких исследователей одновременно, то авторы в этом случае по субъективным критериям выбирали, кого упомянуть в данной работе, за что они приносят свои извинения читателям. То же касается и выбора самих научных работ. Упоминать все работы, как и всех ученых, которые их выполняли, просто невозможно, мы постарались выбрать наиболее характерные и те, которые в наилучшей степени иллюстрируют предлагаемую концепцию.

Полученные результаты.

Начнем рассмотрение данного вопроса со времени античности. Правда, тогда деления наук на ее различные отрасли в современном понимании не существовало и сейчас мы делаем это задним числом, порой достаточно искусственно. Большинство ученых в то время работали в разных областях знания одновременно, то есть были, как сейчас принято говорить, полиматами. Не редко они также занимались и философией.

Отметим, что первые достаточно развитые теории возникали не в биологии и физике, а в медицине и астрономии, что было связано с практическими запросами людей того времени. Иногда это происходило и в более позднее время, о чем будет сказано ниже. Перечислим попарно важнейшие этапы в развитии физико-астрономического и биолого-медицинского блоков.

Первые цельные концепции были созданы, как отмечалось выше, в астрономии и медицине. Первая модель движения небесных тел (геоцентрическая система) — Эвдокс Книдский (1-я половина IV века до н.э.; первая развитая медицинская система — «Гипократовский корпус» (после 430 г. до н.э.).

Затем следует выделить аристотелевский период (середина – конец IV века до н.э.). Аристотель был одним из величайших философов в истории, но, кроме того, он оставил труды по физике («Физика», 347-322 гг. до н.э.) и биологии («О частях животных», ~350; «История животных», ~330 гг. до н.э.), ставшие обобщением знаний на тот период. Поскольку эти работы были выполнены одним человеком, то вопрос об их одновременности не стоит.

Ну и, наконец, в эллинистический период античности появляются обобщающие труды снова по «сателлитным» наукам: Клавдий Птолемей дает завершенное изложение геоцентрической системы мира («Альмагест», ~140 г. н.э.), а Гален выполняет аналогичную работу по медицине («О назначении частей человеческого тела», 175 г.).

Затем центром развития науки становится мусульманский мир — это арабо-персидский период в истории естествознания. В это время выполняются работы, которые на несколько веков становятся основополагающими как для «восточной», так и для «западной» науки, причем снова в первую очередь в медицине и астрономии. Улугбек составляет самый точный на тот период звездный каталог («Новые Гурагановы астрономические таблицы», 1444 г.), а Ибн Сина (Авиценна) — наиболее полное описание медицинских знаний («Канон врачебной науки», ~1023 г.). Следует назвать и современника Ибн Сины – аль-Бируни, которого по охвату различных областей знания можно сравнить с Аристотелем. Он оставил труды практически во всех областях современной ему науки (~1000–1030 гг.). Владея санскритом, Бируни сделал общим достоянием и научные труды, выполненные до него индийскими учеными («Индия, или Книга, содержащая разъяснение принадлежащих индийцам учений, приемлемых разумом или отвергаемых», ~1030 г.).

Затем научное лидерство снова переходит к Европе, начинается наука Нового времени, предвестница современной науки, а в XVI в. происходят события, в корне изменившие естествознание. В 1543 г. одновременно выходят две книги, ознаменовавшие собой принципиально новые этапы в астрономии и медицине, имеющие даже схожие названия. Это — «Об обращении небесных сфер» Николая Коперника и «О строении человеческого тела» Андрея Везалия. Первая из упомянутых книг даже дала название так называемой коперникианской революции в естествознании. Это действительно классическая научная революция, в которой прошла смена парадигмы: гелиоцентрическая система мира заменила господствовавшую со времен античности геоцентрическую. Одновременность выхода этих книг, вполне естественно, была замечена историками науки.

В то же время концепции, описанные в этих книгах, не отвечали на все стоявшие перед наукой вопросы, что потребовало их последующей корректировки. Система Коперника, хотя и передвинула центр Вселенной от Земли, сам этот центр сохранила. Теперь им стало Солнце. Кроме того, координаты звезд и планет не стали точнее, чем

раньше, что было связано с тем, что Коперник сохранил круговые орбиты у планет, поскольку круг по традиции считался совершенной фигурой. А у Везалия в описании организма отсутствовал малый круг кровообращения.

Но уже достаточно скоро появляются работы, исправляющие отмеченные выше недостатки. В 1584 г. Джордано Бруно пишет о безграничности Вселенной и убирает центр Вселенной вообще («О бесконечности, вселенной и мирах»), а чуть раньше Мигель Сервет описывает малый круг кровообращения («Восстановление христианства», 1553 г.). К сожалению, и тот, и другой плохо кончили, оба были сожжены инквизицией. Тоже параллельность, но уже печальная.

Следует обратить внимание, что многие из упомянутых выше ученых не были первыми, кто высказывал подобные воззрения. Коперник не был первым, кто заявил, что Земля вертится вокруг Солнца, Аристарх Самосский сделал это еще в III в. до н.э. А арабский врач Ибн-аль-Нафиз описал малый круг кровообращения в XII в. Однако именно после работ ученых XVI в. эти воззрения прочно вошли в арсенал науки.

В начале XVII в. выполняются уже вполне современные обобщающие работы (опять же по астрономии и медицине), использующие предыдущие достижения и становящиеся основой для развития «основных» наук — биологии и физики. Кеплер формулирует законы, описывающие вращение планет вокруг Солнца по эллиптическим, а не круговым орбитам («Гармония мира», 1619; «Рудольфовы таблицы», 1627 г.), а Гарвей описывает анатомию сердечно-сосудистой системы, включающую малый круг кровообращения («Анатомическое исследование о движении сердца и крови у животных», 1628 г.).

Если в этих книгах описываются объекты «глобальные» (Вселенная, организм в целом), то несколько позже начинается изучение уже микрообъектов, иными словами, происходит движение вглубь. Гассенди в 1649 г. издает «Свод философии Эпикура», где возрождает атомизм в период Нового Времени. Гук в 1665 г. описывает клетки, а Левенгук в 1676 г. — микроорганизмы.

И, наконец, в конце XVII – первой половине XVIII в. выходят книги, знаменующие собой вершину классической науки: «Математические начала натуральной философии» Исаака Ньютона (1687 г.) и «Система природы» Карла Линнея (1735 г.). Природа создана Творцом, вечна и неизменна. Движение происходит по раз и навсегда заданным орбитам и законам, и, зная существующее положение той или иной частицы или планеты, можно предсказать ее поведение на века вперед.

Однако уже в начале XIX в. появляются «эволюционные» работы, в которых обсуждается изменение и развитие как Вселенной, так и живой природы. Это многотомный труд Лапласа «Небесная механика» (1798–1825 гг.), где приводится космогоническая теория, описывающая происхождение Солнечной системы, и книга Ламарка «Философия зоологии» (1809 г.), в которой описана эволюционная теория, названная «ламаркизмом». Оба ученых трудились в наполеоновскую эпоху, оба были награждены орденом Почетного Легиона и оба преподнесли Наполеону свои труды. Именно тогда произошла известная история, когда Наполеон, просмотрев труд Лапласа, спросил у последнего, почему там не упомянут Бог, на что Лаплас ответил исторической фразой: «Государь, я в этой гипотезе не нуждаюсь».

Практически одновременно были сделаны работы, развившие упомянутые выше исследования, пошедшие в глубь микромира. Развитием идей Гассенди стала работа Дальтона «Новый курс химической философии» (1808 г.), где была сформулирована атомистическая теория, говорящая, что все состоит из атомов, а по следам Гука, открывшего клетки, Шлейден и Шванн в 1838-1839 гг. формулируют клеточную теорию о том, что все организмы состоят из клеток.

Еще более глубокое погружение в микромир в «главных» науках произошло в конце XIX в. В 1897 г. Джозеф Томсон сообщает об открытии первой элементарной частицы — электрона, а в 1892 г. Дмитрий Ивановский описывает более мелкий, чем бактерии, инфекционный возбудитель — вирусы («О двух болезнях табака»).

В 1900 г. и в физике, и в биологии происходят события, ознаменовавшие новую эпоху и составившие новую революцию, по значимости сравнимую с коперниканской. В этом году Макс Планк формулирует идею о квантах энергии и квантах действия, показывая тем самым, что энергия квантуется. В том же году де Фриз, Корренс и Чермак переоткрывают законы Менделя. Сам Мендель докладывал об открытых им закономерностях в 1865 г., хотя и не формулировал их как законы. С этого начинается развитие генетики, а гены многие называют «квантами биологии». Вот это совпадение в датах вплоть до года явно свидетельствует о том, что схожие идеи часто возникают одновременно не только у разных ученых, но и в различных областях науки.

Почти одновременно с этими событиями возникают идеи об изменчивости, но уже в несколько другом ключе. В физике показано, что атом не является стабильным объектом. Беккерель в 1896 г. открывает явление радиоактивности, а Резерфорд в 1903 г. формулирует закон радиоактивного распада. Аналогичные события происходят и в биологии. В 1899-1903 гг. Сергей Коржинский и Гуго де Фриз формулируют мутационную теорию, по которой наследственность организмов может меняться, причем де Фриз как один из переоткрывателей законов генетики уже пишет об изменчивости генов.

В развитие идей, высказанных в 1900 г. о существовании квантов и генов, появляются и обобщающие теории: квантовая механика (1925-1927 гг.) и хромосомная теория наследственности (1915 г.). Главные участники этих работ – Шредингер с Гейзенбергом и Морган получают нобелевские премии за создание квантовой механики и хромосомной теории, соответственно. Шредингер впоследствии окажет очень сильное влияние и на развитие современной биологии, хотя и не напрямую.

Когда говорят о революции в физике начала XX в., то, наряду с открытием квантов Планком, обычно еще называют теорию относительности Эйнштейна, изменившую то, что часто называют «основаниями физики» – классическую механику и закон всемирного тяготения Ньютона (специальная теория относительности была сформулирована Эйнштейном в 1905 г., а общая — в 1915 г.). А можно ли что-то поставить в один ряд с этими работами в биологии? Несомненно, это должна быть работа, изменившая классическую биологию и ставшая родоначальницей новой эпохи в этой науке.

Такой может быть только одна работа — книга Чарлза Дарвина «Происхождение видов путем естественного отбора» (1859 г.) и связанные с ней публикации. Несмотря на достаточно большой интервал между работами Дарвина и Эйнштейна, их роль соответственно для биологии и физики одинаково важна. Значение работ Дарвина для биологии настолько велико, что все направление последовавших за ним эволюционных исследований получило название дарвинизма. Конечно, Дарвин тоже не был первым, кто говорил об изменчивости живых организмов, можно вспомнить упомянутого выше Ламарка, но именно Дарвин назвал главный фактор эволюции — естественный отбор. Значимость идей Дарвина с последующим развитием биологии только увеличивалась. Генетика и молекулярная биология дали объяснения причин дарвиновской эволюции. Мутационная теория стала основой для создания синтетической теории эволюции (СТЭ), объединившей дарвинизм с генетикой, а молекулярная биология объяснила эту теорию уже на молекулярном уровне.

А затем наступила очередь исследований, в которых космогонические и эволюционные теории перешли на уровень изучения возникновения самой Вселенной и жизни в целом. Эдвин Хаббл в 1925 г. доказывает существование других галактик, а в 1929 г. формулирует закон Хаббла, описывающий расширение Вселенной и приведший в дальнейшем к теории Большого Взрыва. В это же время Александр Опарин издает книгу «Происхождение жизни» (1924 г.), где формулирует первую научную теорию происхождения жизни. На Западе эту теорию часто называют теорией Опарина–Холдейна, поскольку считается, что Джон Холдейн в 1929 г. сформулировал похожую теорию независимо от Опарина, хотя впоследствии и признал его приоритет.

Примерно в это же время или чуть позже начались работы, объединившие идеи биологии и физики — исследования в области радиационной генетики. В 1926 г. в

работе «Проблемы генетической модификации» Герман Мёллер приводит доказательство мутагенности рентгеновских лучей в экспериментах на дрожжиде, хотя впервые данное явление в 1925 г. описали Георгий Надсон и Григорий Филиппов в опытах на дрожжах. Однако до Нобелевской премии, которую Мёллер получил в 1946 г., они оба не дожили. А в 1935 г. Николай Тимофеев-Ресовский формулирует законы радиационной генетики. Он вводит термины: теория мишени, эффект дозы, принцип усилителя и достаточно точно определяет размер гена. Интересно, что все работы по генетике, которые здесь упоминались, были выполнены в то время, когда материальный носитель наследственности — ДНК еще не был определен. Это схоже с исследованиями ферментативной кинетики в начале XX века, когда были выяснены многие закономерности ферментативного катализа, но не было известно, что ферменты, это — белки.

Хотя развитие и биологии, и физики активно продолжалось и после, дальнейшее изложение хронологического параллелизма мы здесь решили не давать. Дело в том, что развитие этих наук с середины XX века настолько резко ускорилось и сильно специализировалось, что решить без участия профессиональных физиков, что является аналогом достижений современной биологии в физике, мы вряд ли сможем, хотя это, конечно, входит в наши планы. Для каких же работ в биологии хотелось бы найти аналогии? Это открытие того факта, что именно ДНК является носителем наследственности, определение структуры ДНК, выяснение механизмов биосинтеза белка, расшифровка генетического кода, революция 1980-х годов (открытие экзон-интронной структуры генов, рибозимов, прионов) и т.д.

Еще один вопрос, который уместно поставить в контексте наших рассуждений. А нельзя подобные аналогии обнаружить и в других областях знания? На ум сразу приходит математика — наука, тоже имеющая долгую историю, в отличие от химии — науки значительно более молодой. А, может быть, и какие-то другие области человеческой деятельности могут быть рассмотрены с этой точки зрения? Например, по мнению музыковедов, нечто подобное есть и в истории развития музыки. А почему бы и нет? Простор для рассуждений и обдумываний — есть!

Выводы.

При внимательном рассмотрении истории биологических и физических наук можно наблюдать параллелизм в основных этапах их развитии, вплоть до близости дат важнейших открытий. В связи с этим распространенное представление о том, что именно физика являлась лидером естествознания почти на всем протяжении существования науки в человеческой цивилизации является не совсем верным. Интересно, что основные этапы развития биологии предварялись или сопровождались соответствующими этапами в развитии медицины, а этапы физики — этапами астрономии, соответственно.

Заключение

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

Наблюдается параллелизм в основных этапах развитии биологии и физики с древнейших времен, вплоть до близости дат важнейших открытий;

Многие этапы развития биологии предварялись соответствующими этапами в развитии медицины, а этапы физики — этапами астрономии, соответственно;

Следует задуматься о возможных аналогиях и в развитии других областей знания, например, математики.

Сведения об авторах

Алексей Федорович Топунов

д-р биол. наук, профессор,

зав. лабораторией

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: aftopunov@yandex.ru

Information about authors

Alexey Fedorovich Topunov

Doctor of Science (Biol.), Professor,

Head of Laboratory,

Federal Research Center of Biotechnology,

Moscow, Russian Federation

E-mail: aftopunov@yandex.ru

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

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

УДК 546.172.6:577.112.385.4
ГРНТИ 31.17
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.121-126

**Э.И. Насыбуллина, О.В. Космачевская,
К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов**
Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследова-
тельский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН

ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ ОКСИДА АЗОТА И НИТРОКСИЛА НА РЕАКЦИЮ МЕТИЛГЛИОКСАЛЯ С ЛИЗИНОМ И ЛИЗИН-БОГАТЫМ БЕЛКОМ – ЛЕГОГЛОБИНОМ

В реакции между лизином и метилглиоксалем образуются органические свободные радикалы. S-нитрозоглутатион (GSNO) стимулирует образование свободных радикалов, тогда как ДНКЖ и HNO, напротив, снижают их уровень. GSNO на поздних стадиях реакции ингибирует образование КПП, связанных с леогоглобином.

Ключевые слова: метилглиоксаль, лизин, леогоглобин, оксид азота, S-нитрозоглутатион, динитрозильные комплексы железа, нитроксил

**E.I. Nasybullina, O.V. Kosmachevskaya,
K.B. Shumaev, A.F. Topunov**
Federal Research Center of Biotechnology

INFLUENCE OF NITROGEN OXIDE AND NITROXIL DONORS ON THE REACTION OF METHYLGLYOXAL WITH LYSINE AND LYSINE-RICH PROTEIN – LEGHEMOGLOBIN

In the reaction between lysine and methylglyoxal, organic free radicals are formed. S-nitrosoglutathione (GSNO) stimulates the formation of free radicals, while DNIC and HNO, on the contrary, decreased their level. GSNO in the late stages of the reaction inhibits the formation of AGEs associated with leghemoglobin.

Keywords: methylglyoxal, lysine, leghemoglobin, nitric oxide, S-nitrosoglutathione, dinitrosyl iron complexes, nitroxyl

Введение

В ситуации, когда повышается концентрация сахаров (глюкозы, дезоксиглюкозы, фруктозы, рибозы и триозофосфатов) и активных дикарбонильных соединений, в организмах развивается карбонильный стресс. Основное реакционноспособное дикарбонильное соединение, обнаруживаемое в биологических образцах, - метилглиоксаль (MG). Токсичное действие MG обусловлено его способностью вступать в реакции с амино- и SH-группами аминокислотных остатков белков, формируя ковалентно связанные конечные продукты гликирования (КПП) [1]. Неферментативное гликирование свободных аминокислот и белков получило название реакции Майяра [2-4].

Как известно, одной из основных мишеней MG являются остатки лизина в белковых молекулах [2-4]. С участием остатков лизина формируются флуоресцирующие перекрестно-сшитые КПП (пентозидин, пентодилизин, весперлизин А, весперлизин С) [5].

Основными структурами этих КПП являются перекрестные связи метилглиоксаль-лизинового димера (MOLD), которые образуются в результате реакции между двумя лизиновыми остатками и двумя молекулами МГ. При взаимодействии аргинина и МГ в реакции Майяра образуется флуоресцирующий аргпиримидин. Благодаря способности к автофлуоресценции некоторых КПП, о процессе гликирования белка можно судить по увеличению интенсивности флуоресценции при определенных длинах волн [6]. Модификация остатков лизина может приводить к образованию и нефлуоресцирующих КПП (карбоксиметиллизин, карбоксиэтиллизин, пирралин и андимидазолон).

Ранее нами было обнаружено, что доноры оксида азота (NO) S-нитрозоглутатион и NO_2^- ингибируют накопление флуоресцирующих продуктов гликирования метгемоглобина (metHb) метилглиоксальем [7]. В литературе имеются данные о взаимодействии NO с продуктами неферментативного гликирования [8-10]. В работе [9] показано, что различные доноры NO (NOC18 и SNAP) ингибировали образование пентозидинов. Ингибирующий эффект обусловлен молекулой NO, которая способна удалять гидроксильные и углеродсодержащие радикалы и карбонильные соединения. Еще более сильным антиоксидантом является нитроксил – продукт одноэлектронного восстановления и протонирования NO [10]. Антигликирующее действие нитроксильного аниона было также показано по отношению к Hb [11], цитохрому и клеткам *E. coli*, инкубируемым с МГ [12]. Поэтому мы решили исследовать влияние доноров NO и HNO на неферментативное гликирование метилглиоксальем лизина и левоглобина (Lb).

Легоглобин – миоглобинподобный белок, присутствующий в корневых клубеньках бобовых растений, где он выполняет функцию буфера и переносчика кислорода к азотфиксирующим бактериоидам [13,14]. Этот белок был выбран в качестве объекта исследования потому, что он содержит большое количество остатков лизина. Анализ аминокислотных последовательностей различных Lb показал, что лизины составляют примерно 9% всех аминокислот молекулы белка. Следует отметить, что анализ протеома клубеньков фасоли (*Phaseolus vulgaris*) выявил, что аминокислотой, наиболее подверженной гликированию и карбонилированию, является лизин [15].

Цель работы.

Изучить действие доноров оксида азота и нитроксила на реакцию метилглиоксала с лизином и левоглобином.

Материалы и методы.

S-нитрозоглутатион и S-нитрозоцистеин получали смешивая эквимольные концентрации тиолов и нитрита натрия в кислой среде. Концентрацию нитрозотиолов определяли спектрофотометрически по оптическому поглощению при 338 нм для GSNO ($\epsilon_{338} = 930 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) и 335 нм для CysNO ($\epsilon_{335} = 922 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). ДНКЖ с фосфатными лигандами получали пропусканием газообразного NO в сосуде Тунберга через раствор FeSO_4 (5,5 мМ) в 100 мМ K,Na-фосфатном буфере (pH 6,8). Для получения ДНКЖ, содержащих глутатион и цистеин, к фосфатным комплексам добавляли соответствующие тиолы в молярном соотношении 1:2,25. Концентрацию ДНКЖ рассчитывали по интегральной интенсивности сигнала ЭПР этих комплексов, используя в качестве стандарта спиновую метку 4-гидрокси-ТЕМРО. ДНКЖ хранили при -70°C .

Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре E-109E "Varian" (США) при комнатной температуре. Для поддержания постоянного газового состава реакционную смесь вводили в газопроницаемый PTFE Sub-Lite-Wall капилляр (внутренний диаметр 0,635 мм, толщина стенки 0,051 мм), который складывался вдвое и вводился в кварцевую трубку, открытую с обоих концов. Во время регистрации спектра через кварцевую трубку, помещенную в резонатор ЭПР-спектрометра, продувался газовый поток варьируемого состава. В ряде экспериментов для регистрации супероксидного радикала использовали спиновую ловушку DEPMPO (5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин-N-оксид).

Легоглобин выделяли из корневых клубеньков бобов (*Vicia faba* L., синоним — *Faba bona* Medik.) сорта «Русские черные». Клубеньки, отделенные от растений, заливали холодным 0,1 М К-фосфатным буфером (рН 7,2), содержащим 0,2 М аскорбат натрия, 1% высокомолекулярный поливинилпирролидон, 50 мкМ фенилметилсульфонилфторид и 0,001 М $MgCl_2$. Клубеньки растирали, после чего гомогенат фильтровали. Фильтрат центрифугировали для удаления из экстракта загрязнений и крупных частиц растительной ткани. Легоглобинсодержащую фракцию получали высаливанием белков супернатанта сульфатом аммония в диапазоне насыщения 40-80 %. Осадок, содержащий Lb, растворяли в минимальном количестве К-фосфатного буфера и наносили на колонку с носителем Toyopearl HW-50 Fine. Последующую очистку Lb проводили на анионообменной колонке Servacel DEAE GS. Концентрацию Lb определяли, используя коэффициент миллимолярной экстинкции $\varepsilon_{525} = 9,52 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

В эксперименте по изучению влияния метаболитов оксида азота на гликирование Lb реакционная среда содержала 0,1 мМ окисленного Lb в 25 мМ PBS (рН 7,4), 8 мМ метилглиоксаля и 2 мМ метаболитов оксида азота (GSNO, ДНКЖ- PO_4^- , $NaNO_2^-$), которые вносили через 20 минут инкубации с MG. Флаконы продували азотом в течение 15 минут. Инкубацию осуществляли при 37 °С в течение 48 часов. КПП, связанные с Lb, измеряли по автофлуоресценции при длине волны возбуждения 335 нм. Измерение проводили на спектрофотометре Shimadzu RF-5302 PC (Япония) в 0,5 мл микрокювете при средней скорости сканирования, высокой чувствительности (по маркировке прибора), ширине щели возбуждающего света 5 нм и испускаемого света 10 нм.

Полученные результаты.

С помощью спектроскопии ЭПР установлено, что в реакции между L-лизином или N α -ацетиллизином и MG образуются органические свободные радикалы (катион-радикал основания Шиффа и анион-радикал метилглиоксаля). В условиях аэрации также продуцируется супероксидный анион радикал. Показано, что доноры NO (S-нитрозоглутатион, S-нитрозоцистеин, PAPA NONOate) существенно увеличивают выход органических свободнорадикальных интермедиатов реакции Майяра. Вместе с тем, другие метаболиты NO – нитроксильный анион и динитрозильные комплексы железа с тиольными лигандами (GS-ДНКЖ) снижают уровень органических свободных радикалов, регистрируемых ЭПР. Можно предположить, что NO и S-нитрозотиолы реагируют с продуктами реакции Майяра, что приводит к усилению продукции свободных радикалов основания Шиффа и метилглиоксаля. В этой модельной системе в нитроксильный анион и GS-ДНКЖ выступают в качестве антиоксидантов и антигликирующих агентов.

Также было изучено влияние метаболитов NO на образование флуоресцирующих КПП в реакции легоглобина с MG. Реакция протекала в анаэробных условиях, что позволяло исключить образование пероксинитрита. Добавление физиологических доноров оксида азота (GSNO, ДНКЖ- PO_4^- , NO_2^-) сказывалось на спектрах флуоресценции КПП, связанных с Lb. Наименьшее влияние оказывали ДНКЖ с фосфатными лигандами (ДНКЖ- PO_4^-), в то время как GSNO и NO_2^- ингибировали формирование КПП. Причем GSNO снижал интенсивность флуоресценции на 40%, а NO_2^- на 25%. Деструкция гемовой группы Lb в этих экспериментах не наблюдалась.

В экспериментах с Lb антигликирующий эффект, вероятно, обусловлен действием NO, образующимся при распаде GSNO или восстановлении NO_2^- . Следует отметить, что антигликирующее действие GSNO оказывает на поздней стадии реакции Майяра, когда формируются КПП, в то время как на ранней стадии, когда формируются основания Шиффа, GSNO увеличивает выход органических свободных радикалов, образующихся в реакции MG с L-лизином.

Однако ДНКЖ- PO_4^- , являются не только донорами NO, но и Fe^{2+} , который, как известно, катализируют гликоокисление и образование КПП [16]. Также нельзя исключить, что ДНКЖ- PO_4^- , являясь донором Fe-(NO) $_2$, участвуют в формировании

связанных с Lb ДНКЖ. Формирование Lb-ДНКЖ было показано в работе [17]. Поскольку Lb не содержит цистеины, то, вероятно, лигандами ДНКЖ являются остатки гистидина.

Таким образом, полученные результаты показывают, что доноры NO и нитроксила влияют на ход реакций неферментативного гликирования белков. При этом может происходить как замедление реакции, так и изменение набора продуктов, появление нитро- и нитрозо-производных продуктов реакции неферментативного гликирования.

Пока нет работ, свидетельствующих о неферментативном гликировании Lb в клубеньках. Ранее нам удалось выделить гликированный Lb из клеток *E. coli*, содержащих плазмиду с геном Lba сои, при выращивании их в микроаэрофильных условиях [18]. Модификация гликированием затрагивает не только поверхность белка, но и гемовый карман, что видно по изменению абсорбционных характеристик Lb, появлению гемохромного типа спектров [18]. Это может быть связано с еще одной особенностью в строении Lb – наличием лизина в гемовом кармане. Этот лизин расположен в паре с глутаминовой кислотой и, возможно, участвует в формировании КПП, образующих шестую координационную связь с железом гема.

Выводы.

Метаболиты NO могут регулировать неферментативную генерацию свободных радикалов, возникающих в реакции метилглиоксаля с лизином, причем GSNO стимулирует образование органических свободных радикалов, тогда как ДНКЖ и HNO, напротив, снижают их уровень. Мы полагаем, что в зависимости от образования тех или иных метаболитов оксида азота при карбонильном стрессе может меняться как концентрация свободнорадикальных интермедиатов реакции Майяра, так и количество и химический состав КПП. В частности, NO и GSNO замедляют образование флуоресцирующих КПП левоглобина. Обнаруженные нами эффекты доноров NO и HNO могут наблюдаться, не только в живых системах, но и продуктах питания, в которых также происходят реакции неферментативного гликирования.

Заключение

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

Доноры NO (S-нитрозоглутатион и PAPA NONOate) существенно увеличивают выход органических свободнорадикальных интермедиатов (катион-радикал основания Шиффа и анион-радикал метилглиоксаля) на ранних стадиях реакции между L-лизином или N α -ацетиллизином и MG.

Нитроксильный анион и динитрозильные комплексы железа с тиольными лигандами снижают уровень органических свободных радикалов, регистрируемых ЭПР.

GSNO на поздних стадиях реакции Майяра ингибирует образование флуоресцирующих КПП в реакции левоглобина с метилглиоксалем.

Литература.

1. Thornalley P.J. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1043. P. 111-117.
2. Goldin A., Beckman J.A., Schmidt A.M., Creager M.A. Advanced glycation end products sparking the development of diabetic vascular injury. // *Circulation.* 2006. V. 114. P. 597-605.
3. Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. // *Physiol. Res.* 2010. V. 59. P. 147-156.
4. Vistoli G., De Maddis D., Cipak A., Zarkovic N., Carini M., Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. // *Free Radic. Res.* 2013. V. 47. Suppl 1, 3-27.
5. Perrone A., Giovino A., Benny J., Martinelli F. Advanced glycation end products

- (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020. V. 3. P. 1-18.
6. Villa M., Parravano M., Micheli A., Gaddini L., Matteucci A., Mallozzi C., Facchiano F., Malchiodi-Albedi F., Pricci F.A. A quick, simple method for detecting circulating fluorescent advanced glycation end-products: correlation with in vitro and in vivo non-enzymatic glycation. // *Metabolism*. 2017. V. 71. P. 64-69.
 7. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction. // *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*. 2014. V. 52. P. 161-168.
 8. Massari J., Tokikawa R., Zanolli L., Tavares M.F.M., Assunção N.A., Bechara E.J.H. Acetyl radical production by the methylglyoxal-peroxynitrite system: a possible route for L-lysine acetylation. // *Chem. Res. Toxicol.* 2010. V. 23. P. 1762-1770.
 9. Asahi K., Ichimori K., Nakazawa H., Izuhara Y., Inagi R., Watanabe T., Miyata T., Kurokawa K. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products. // *Kidney International*. 2000. V. 58. P. 1780-1787.
 10. Bucala R., Tracey K.J., Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 87. P. 432-438.
 11. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Pugachenko I.S., Novikova N.N., Topunov A.F. Antiglycation and antioxidant effect of nitroxyl towards hemoglobin. // *Antioxidants*. 2022. V. 11. N 10. e2007.
 12. Насыбуллина Э.И., Пугаченко И.С., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Влияние нитроксила на клетки *Escherichia coli*, выращенные в условиях карбонильного стресса. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2022. Т. 58. № 5. С. 1-8.
 13. Топунов А.Ф. Легоглобин и его роль в регуляции кислородного режима в азотфиксирующих клубеньках бобовых. // *Биохимия*. 1995. Т.60. № 1. С.66-74
 14. Singh S., Varma A. Structure, function, and estimation of leghemoglobin. / *Rhizobium Biology and Biotechnology*. 2017. pp 309-330. Part of the Soil Biology book series (SOILBIOL, volume 50).
 15. Matamoros M.A., Kim A., Peñuelas M., Ihling C., Griesser E., Hoffmann R., Fedorova M., Frolov A., Becana M. Protein carbonylation and glycation in legume nodules. // *Plant Physiol*. 2018. V. 177. P. 1510-1528.
 16. Yim H.S., Kang S.O., Hah Y.C., Chock P.B., Yim M.B. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 28228-28233.
 17. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Topunov A.F. Expressed soybean leghemoglobin: effect on *Escherichia coli* at oxidative and nitrosative stress. // *Molecules*. 2021. V. 26. e7207.
 18. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Образование гликированного рекомбинантного легоглобина в клетках *Escherichia coli*. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2010. Т. 46. № 3. С. 324-330.

Сведения об авторах**Эльвира Ильгизовна Насыбуллина**

канд. биол. наук, науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: lvirus198709@rambler.ru

Ольга Владимировна Космачевская

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: rizobium@yandex.ru

Information about authors**Elvira Ilgizovna Nasybullina**

PhD (Biol.), Research Scientist,

Federal Research Center of Biotechnology,

Moscow, Russian Federation

E-mail: lvirus198709@rambler.ru

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya

PhD (Biol.), Senior Research Scientist

Federal Research Center of Biotechnology

Moscow, Russian Federation

E-mail: rizobium@yandex.ru

Константин Борисович Шумаев

д-р биол. наук., ст. науч. сотр.
ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва, Россия
Эл. почта: tomorov@mail.ru

Konstantin Borisovich Shumaev

Doctor of Science (Biol.),
Senior Research Scientist,
Federal Research Center of Biotechnology,
Moscow, Russian Federation
E-mail: tomorov@mail.ru

Алексей Федорович Топунов

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

Alexey Fedorovich Topunov

Doctor of Science (Biol.), Professor,
Head of Laboratory,
Federal Research Center of Biotechnology,
Moscow, Russian Federation
E-mail: aftopunov@yandex.ru

УДК 661.98:547.963.4
ГРНТИ 31.17
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.126-131

**О.В. Космачевская¹, Э.И. Насыбуллина¹,
И.С. Пугаченко¹, К.Б. Шумаев¹,
Н.Н. Новикова², А.Ф. Топунов¹**

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные
основы биотехнологии»
РАН

²НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия

ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛУТАТИОНОВЫХ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В ГЕМОГЛОБИН-СОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМАХ

Глутатионовые динитрозильные комплексы железа (GS-ДНКЖ) защищали гемоглобин от окислительной модификации. Они препятствовали образованию карбонильных производных, окислению триптофановых и тирозиновых остатков, деградации гемовой группы, а также образованию межбелковых сшивок. Также эти комплексы ингибировали лизис эритроцитов, индуцированный HOCl.

Ключевые слова: гемоглобин, динитрозильные комплексы железа, оксид азота, пероксинитрит, гидропероксид трет-бутила, глутатион, окислительная модификация

**O.V. Kosmachevskaya¹, E.I. Nasybullina¹,
I.S. Pugachenko¹, K.B. Shumaev¹,
N.N. Novikova², A.F. Topunov¹**

¹Federal Research Center of Biotechnology Moscow, Russian Federation

²Kurchatov Institute Moscow, Russian Federation

PROTECTIVE ACTION OF GLUTATHIONE DINITROSYL IRON COMPLEXES IN HEMOGLOBIN-CONTAINING SYSTEMS

Glutathione dinitrosyl iron complexes (GS-DNICs) effectively protected hemoglobin from oxidative modification. They prevented the formation of carbonyl derivatives, oxidation of tryptophan and tyrosine residues, degradation of heme group, as well as the formation of protein crosslinking. GS-DNICs inhibited erythrocyte lysis induced by HOCl.

Key words: hemoglobin, erythrocytes, dinitrosyl iron complexes, nitric oxide, peroxyxynitrite, tert-butyl hydroperoxide, glutathione, oxidative modification

Введение

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) являются одной из физиологических форм оксида азота (NO) в организме. Они осуществляют депонирование и перенос NO от места образования к биологическим мишеням [1-4]. Образование этих комплексов было зарегистрировано у животных (в том числе, у человека), растений и бактерий.

Низкомолекулярные ДНКЖ в живых системах в качестве лигандов обычно содержат цистеин и глутатион [3, 4]. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (GS-ДНКЖ) образуются в организме человека в качестве стабильных доноров NO. GS-ДНКЖ всегда существуют в равновесии с белок-связанными ДНКЖ, которые, как правило, формируются при участии белковых тиолов. GS-ДНКЖ обладают широким спектром биологических активностей. Они оказывают гипотензивное и сосудорасширяющее действие, уменьшают зону инфаркта в изолированном сердце, ингибируют агрегацию тромбоцитов, ускоряют заживление кожных ран, подавляют эндометриоз и апоптоз в культивируемых клетках животных.

Ранее нами было показано, что помимо участия в метаболизме NO, ДНКЖ могут функционировать как антиоксиданты. В частности, антиоксидантное действие GS-ДНКЖ было продемонстрировано по отношению к гемоглобину (Hb) и миоглобину [5-7]. ДНКЖ защищали входящие в их состав тиоловые группы белков от окисления [5, 6], восстанавливали оксоферрильную форму Hb до нетоксичной метформы [7].

Поскольку в эритроцитах имеется пул лабильного железа и много глутатиона, то высока вероятность образование ДНКЖ, связанных с SH-группой глутатиона и Cys-93β гемоглобина [5, 6]. Как известно, эритроциты часто подвержены действию окислителей, продуцируемых как внутри клетки, так и вне, клетками иммунной системы.

Цель работы.

Целью работы было изучение влияния ДНКЖ с глутатионовыми лигандами на окислительную модификацию гемоглобина и эритроцитов.

Материалы и методы.

ДНКЖ с фосфатными лигандами синтезировали в сосуде Тунберга, пропуская газообразный NO через смесь, содержащую FeSO₄ и 100 mM Na,K-фосфатный буфер (pH 6,8) в качестве источника фосфатного лиганда. GS-ДНКЖ получали добавлением восстановленного глутатиона (GSH) к менее стабильным ДНКЖ с фосфатом в молярном соотношении 2 : 1. Препараты ДНКЖ хранили при температуре жидкого азота.

Способность GS-ДНКЖ перехватывать пероксинитрит изучали в реакции окисления дигидрородамина пероксинитритом, образующимся при распаде 3-морфолиносиндонимина (SIN-1). При окислении дигидрородамина образуется родамин с максимумом поглощения при 500 нм. Количественную оценку карбонильных производных Hb проводили по методу [8], суть которого заключается в формировании ковалентных аддуктов с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), которые регистрируются спектрофотометрически. Концентрацию гема в растворе Hb определяли с помощью пиридингемохромного метода [9]. Состояние остатков триптофана и тирозина изучали с помощью флуоресцентной спектроскопии. Для селективного возбуждения автофлуоресценции триптофана использовали длину волны 295 нм. Флуоресценцию регистрировали при 330 нм. Спектрофотометрическую детекцию 3,3'-дитирозинов осуществляли при длине волны возбуждения 325 нм и испускания 400 нм. Появление оксоферрил-формы Hb (Hb-Fe^{IV}=O) определяли по снижению оптического поглощения при 630 нм и возрастанию при 530 и 560 нм. SDS-электрофорез проводили в блоках 12% ПААГ размером 15×15×1 мм.

Эритроциты человека выделяли из донорской крови, стабилизированной цитратом натрия, и промывали двукратным центрифугированием при 350 g в Na,K-фосфатный буфере, содержащем 10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 137 mM NaCl и 2,7 mM KCl (pH 7,4).

За лизисом эритроцитов следили по изменению оптической плотности суспензий при 670 нм. Лизис инициировали добавлением к суспензиям эритроцитов 0,1–1 мМ HOCl или H_2O_2 , после их 2-минутной преинкубации с миелопероксидазой (50 нМ). Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) регистрировали при 25°C на ЭПР-спектрометре X-диапазона E-109E (Varian, США).

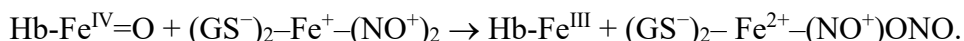
Полученные результаты.

ДНКЖ, содержащие фосфатные ионы (ДНКЖ-PO_4^-) и глутатион (GS-ДНКЖ) в качестве лигандов, в равной степени ингибировали восстановление дигидрородамина пероксинитритом, образуемым в ходе декомпозиции SIN-1. GS-ДНКЖ и ДНКЖ , связанные с Hb (Hb-ДНКЖ), оказывали выраженное ингибирующее действие на окислительную модификацию Hb пероксинитритом. Hb-ДНКЖ защищали белок в широком диапазоне концентраций ONOO^- (от 0,38 до 4,20 мМ). При концентрации ONOO^- 1 мМ карбонильных производных в случае Hb-ДНКЖ было на 80% меньше, чем в белке, содержащем свободные SH-группы. Еще более выраженное защитное действие на белок оказывали GS-ДНКЖ . Зависимость образования карбонильных производных от концентрации окислителя, в присутствии ДНКЖ имела двухфазный характер: при низких концентрациях ONOO^- образование карбонильных производных происходило медленно, начиная с концентрации 1,6 мМ – интенсивно. Вероятно, этот эффект связан с высвобождением из распавшихся ДНКЖ железа, которое участвует в генерации свободных радикалов в ходе реакции Фентона. С помощью спектроскопии ЭПР было показано, что при концентрации ONOO^- 1,6 мМ большая доля комплексов распадается.

ДНКЖ , как связанные с белком, так и низкомолекулярные, препятствовали разрушению гемовой группы Hb . В контрольных образцах доля разрушенного гема находилась в прямой зависимости от концентрации окислителя. При концентрации ONOO^- 4,2 мМ разрушалось 50% гемов, в то время как в присутствии ДНКЖ – только 25%.

Разрыву порфиринового кольца предшествует стадия образования оксоферрилформы гемоглобина ($\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$). В образовании оксоферрил Hb ключевую роль играет гемовое железо, катализирующее разрыв O-O связи в комплексе $\text{Hb-Fe}^{\text{III}}-\text{ONOO}^-$ [10].

Защитное действие ДНКЖ можно объяснить несколькими возможными механизмами. Во-первых, ДНКЖ выступают донорами NO , который может вступать в реакцию с $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ с образованием комплекса $\text{Hb-Fe}^{\text{III}}-\text{ONO}$, распадающегося далее до нитрита и ферри-формы Hb [11]: $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O} + \text{NO} \rightarrow \text{Hb-Fe}^{\text{III}}-\text{ONO} \rightarrow \text{Hb-Fe}^{\text{III}} + \text{NO}_2$. В работе [7] нами был предложен аналогичный механизм для взаимодействия ДНКЖ-GS с $\text{Hb-Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$:



Интермедиат $\text{Hb-Fe}^{\text{III}}-\text{ONO}$ в присутствии низкомолекулярных тиолов вновь восстанавливается до ДНКЖ . Таким образом, ДНКЖ выступают как катализаторы восстановления оксоферрилгема тиолами. Во-вторых, включение ионов железа, высвободившихся при распаде гема, в состав ДНКЖ , препятствует их участию в катализе гомолитического расщепления пероксинитрита с образованием свободнорадикальных продуктов. В-третьих, ДНКЖ могут непосредственно взаимодействовать с органическими свободными радикалами [7]. Это сопровождается необратимой деструкцией комплексов и образованию интермедиатов – нитроорганических соединений.

Оксоферрильная форма гема является очень сильным окислителем, модифицирующим белковую цепь гемопротеидов [12]. Поэтому было проведено спектрофлуориметрическое исследование окисления тирозиновых и триптофановых остатков пероксинитритом. В контрольном варианте и в Hb-ДНКЖ с увеличением концентрации ONOO^- возрастала флуоресценция при 400 нм, что свидетельствует об образовании 3,3'-дитирозина. Однако начиная с концентрации 1,6 мМ происходило снижение флуоресценции Hb-ДНКЖ , что может быть связано с образованием 3-нитротирозина. В экспериментах с GS-ДНКЖ результаты были другими. Флуоресценция возрастала только начиная с 1,6 мМ ONOO^- . Этот лаг-период в окислении тирозиновых остатков можно

объяснить действием в образцах GS-ДНКЖ примесного глутатиона, который является эффективным перехватчиком NO_2^\bullet ($k = 5,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [12]. К тому же глутатион может непосредственно восстанавливать пероксинитрит по двухэлектронному механизму.

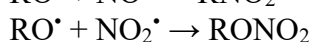
Мишенью атаки ONOO^- в Hb являются остатки триптофана [13]. В контрольном варианте интенсивность флуоресценции при 327 нм линейно уменьшалась, что свидетельствует об окислении/нитровании триптофановых остатков. В Hb-ДНКЖ при низких концентрациях окислителя флуоресценция возрастала и только начиная с концентрации 1,6 мМ начинала снижаться.

Восстановление феррильного интермедиата в результате реакции с близкорасположенными аминокислотами может привести к образованию радикалов аминокислотных остатков, которые способствуют возникновению межмолекулярных поперечных связей и формированию агрегатов белка [10]. Образование агрегатов белка под действием ONOO^- регистрировали с помощью SDS электрофореза в ПААГ. В контрольном варианте во всем диапазоне концентраций ONOO^- происходило дозозависимое образование димеров и высокомолекулярных агрегатов Hb. В случае, если SH-группы были включены как лиганды в ДНКЖ, агрегация белка наблюдалась только при концентрации ONOO^- 2,6 мМ и 4,2 мМ и в меньшей степени, чем в контрольном образце. В эксперименте с GS-ДНКЖ степень сшивания белка была практически такой же, как в Hb-ДНКЖ.

Эритроциты человека широко используются в качестве модели для изучения общих механизмов повреждения клеток в условиях фагоцитарно-индуцированного окислительного стресса. Протекторное действие GS-ДНКЖ исследовали на отмытых эритроцитах человека, выделенных из донорской крови. Лизис эритроцитов вызывали либо обработкой суспензии эритроцитов HOCl , либо добавлением к суспензии эритроцитов миелопероксидазы, синтезирующей HOCl , в присутствии ее субстратов H_2O_2 и хлорида. После обработки эритроцитов GS-ДНКЖ их устойчивость к HOCl значительно возрастала, в то время как скорость индуцированного HOCl лизиса снижалась с увеличением концентрации GS-ДНКЖ, что приводило к полному ингибированию лизиса при 50 мкМ комплексов. При 2,5 мкМ GS-ДНКЖ (что соответствует 5 мкМ GSH) скорость лизиса эритроцитов, индуцированного HOCl , снижалась более чем в 20 раз. Миелопероксидаза также индуцировала лизис эритроцитов. Добавление 0,5 мкМ GS-ДНКЖ в инкубационную среду ингибировало этот процесс, а при 2,5 мкМ ДНКЖ практически полностью его предотвращало. Эти данные свидетельствуют о том, что GS-ДНКЖ в условиях моделируемого окислительно-галогенирующего стресса проявляют выраженный цитопротекторный эффект.

Одной из наиболее частых причин повреждения эритроцитов гипогалогеновыми кислотами является активация свободнорадикального перекисного окисления липидов. Ранее было установлено, что при взаимодействии HOCl с органическими гидропероксидами (*трет*-бутилгидропероксид, гидропероксид линолевой кислоты) образуются алкилпероксильные и алкоксильные радикалы [14].

В результате взаимодействия спиновой ловушки DEPMPO со свободнорадикальными интермедиатами реакции *t*-BOOH с HOCl образовывались аддукты, которые детектировали с помощью ЭПР-спектроскопии. Добавление GS-ДНКЖ в реакционную среду приводило к исчезновению спиновых аддуктов DEPMPO, причем антирадикальное действие GS-ДНКЖ было значительно более выраженным, чем в случае свободного GSH. Этот эффект можно объяснить взаимодействием алкилпероксильных и алкоксильных радикалов с оксидом азота, образующимся из ДНКЖ:



Эти диффузно-контролируемые реакции (константа скорости $k = 1-3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) приводят к полному ингибированию цепных реакций свободнорадикального окисления [15].

Выводы.

ДНКЖ, как связанные с гемоглобином, так и низкомолекулярные (GS-ДНКЖ) эффективно защищают гемоглобин от окислительных модификаций, вызванных пероксинитритом и гидропероксидом *трет*-бутила. GS-ДНКЖ в условиях моделируемого окислительно-галогенирующего стресса проявляют выраженный цитопротекторный эффект.

Заключение

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

Низкомолекулярные и связанные с белком ДНКЖ снижают выход свободнорадикальных продуктов в реакции с пероксинитритом. При этом пероксинитрит дозозависимо разрушает ДНКЖ, связанные с гемоглобином (Нб-ДНКЖ).

ДНКЖ защищают гемоглобин от окислительной модификации: препятствуют образованию карбонильных производных, окислению триптофановых остатков, деградации гемовой группы, образованию межбелковых сшивок.

Обнаруженные эффекты могут быть связаны с восстановлением и нитрозилированием оксоферрильной формы гема, а также со способностью трансформировать пероксинитрит в нерадикальные продукты.

ДНКЖ-GS в микромолярных концентрациях эффективно ингибируют лизис эритроцитов, индуцированный NOCl, а также удаляют алкоксильные и алкилпероксильные радикалы, образующиеся в реакции NOCl с гидропероксидом *трет*-бутила.

Литература.

1. Tsai M.-L., Tsou C.-C., Liaw W.-F. Dinitrosyl iron complexes (DNICs): from biomimetic synthesis and spectroscopic characterization toward unveiling the biological and catalytic roles of DNICs. // *Acc. Chem. Res.* 2015. V. 48. No. 4. P. 1184-1193.
2. Hsiao H.Y., Chung C.W., Santos J.H., Villaflores O.B., Lu T.T. Fe in biosynthesis, translocation, and signal transduction of NO: toward bioinorganic engineering of dinitrosyl iron complexes into NO-delivery scaffolds for tissue engineering. // *Dalton Trans.* 2019. Apr 16. doi: 10.1039/c9dt00777f.
3. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a «working form» of endogenous nitric oxide. // *Nitric Oxide.* 2016. V. 54. P. 15-29.
4. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes as a “working form” of nitric oxide in living. / Cambridge Scholars Publishing. 2019. 265 P.
5. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhnikov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with albumin – and hemoglobin bound dinitrosyl iron complexes. // *Nitric Oxide.* 2008. V. 18. P. 37-46.
6. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. Dinitrosyl iron complexes bound with haemoglobin as markers of oxidative stress. // *Methods in Enzymology.* 2008. V. 436. P. 445-461.
7. 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. V. 69. № 5. P. 699-705.
8. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. Окислительная модификация белков и активность катепсина и тимоцитов крыс в условиях *in vitro* модулирования синтеза оксида азота (II). // *Казанский медицинский журнал.* 2014. Т. 95. № 4. С. 553-557.
9. Riggs A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. // *Methods in Enzymology.* 1981. 76. 5-29.
10. Herold S., Rehmann F.-J. K. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. // *Free Rad.Biol.Med.* 2003. V. 34. P. 531-545.
11. Romero N., Radi R., Linares E., Augusto O., Detweiler C.D., Mason R.P., Denicola A.

- Reaction of human hemoglobin with peroxyxynitrite. // J. Biol.Chem. 2003. V. 278. No. 45. P. 44049-44057.*
12. Ford E., Hughes M.N., Wardman P. Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 32. 1314-1323.
13. Pietraforte D., Minetti M. One-electron oxidation pathway of peroxyxynitrite decomposition in human blood plasma: evidence for the formation of protein tryptophan-centred radicals. // *Biochem J.* 1997. V. 321. P. 734-750.
14. Osipov A.N., Panasenko O.M., Chekanov A.V., Arnhold J. Interaction of tert-butyl hydroperoxide with hypochlorous acid. A spin trapping and chemiluminescence study. // *Free Radical Research.* 2002. V. 36. No. 7. P. 749-754.
15. O'Donnell V.B., Chumley P.H., Hogg N., Bloodsworth A., Darley-Usmar V.M., Freeman B.A. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with α -tocopherol. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. No. 49. P. 15216-15223.

Сведения об авторах

Ольга Владимировна Космачевская

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: rizobium@yandex.ru

Эльвира Ильгизовна Насыбуллина

канд. биол. наук, науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: lvirus198709@rambler.ru

Игорь Сергеевич Пугаченко

мл. науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: gewalthaber-igor@mail.ru

Константин Борисович Шумаев

д-р биол. наук., ст. науч. сотр.

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: tomorov@mail.ru

Наталья Николаевна Новикова

д-р физ.-мат. наук.

вед. науч. сотр.

НИЦ "Курчатовский институт",

Москва, Россия

Эл. почта: nn_novikova@crys.ras.ru

Алексей Федорович Топунов

д-р биол. наук, профессор,

зав. лабораторией

ФИЦ Биотехнологии РАН,

Москва, Россия

Эл. почта: aftopunov@yandex.ru

Information about authors

Olga Vladimirovna Kosmachevskaya

PhD (Biol.), Senior Research Scientist

Federal Research Center of Biotechnology

Moscow, Russian Federation

E-mail: rizobium@yandex.ru

Elvira Igizovna Nasybullina

PhD (Biol.), Research Scientist,

Federal Research Center of Biotechnology,

Moscow, Russian Federation

E-mail: lvirus198709@rambler.ru

Igor Sergeevich Pugachenko

Junior Research Scientist,

Federal Research Center of Biotechnology

Moscow, Russian Federation

E-mail: gewalthaber-igor@mail.ru

Konstantin Borisovich Shumaev

Doctor of Science (Biol.),

Senior Research Scientist,

Federal Research Center of Biotechnology,

Moscow, Russian Federation

E-mail: tomorov@mail.ru

Natalia Nikolaevna Novikova

Doctor of Science (Phys.-Math.),

Main Research Scientist,

National Research Center "Kurchatov Institute",

Moscow, Russian Federation

E-mail: nn_novikova@crys.ras.ru

Alexey Fedorovich Topunov

Doctor of Science (Biol.), Professor,

Head of Laboratory,

Federal Research Center of Biotechnology,

Moscow, Russian Federation

E-mail: aftopunov@yandex.ru

УДК 57.043
 ГРНТИ 34.17.09
 DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.132-136

О.И. Баум, А.К. Дмитриев, О.А. Тифлова
 ИФТ ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН

ФОТОБИОМОДУЛЯЦИЯ ХОНДРОЦИТОВ: СОПРЯЖЕННАЯ С ЦИТОГЛОБИНОМ СИГНАЛЬНАЯ СЕТЬ

Сравнение фотобиомодуляции (лазер, 670 или 1560нм) синтеза коллагена хондроцитами выявило участие цитоглобина в восприятии лазерного сигнала. Предполагается, что сигнальная сеть запускается за счет лазерной индукции сопряжения цитоглобина с 2-оксоглутаратзависимыми диоксигеназами: пролилгидроксилазным доменом HIF, деметилазами гистонов и пролилгидроксилазой коллагена.

Ключевые слова: фотобиомодуляция, хондроциты, цитоглобин, сигнальная сеть, пролилгидроксилаза коллагена, 2-оксоглутаратзависимые диоксигеназы.

	O.I. Baum, A.K. Dmitriev, O.A. Tiflova FRC "Crystallography and Photonics" Russian Academy of Sciences
--	--

PHOTOBIO-MODULATION OF CHONDROCYTES: GLOBINCOUPLED SIGNAL NETWORK

The comparison between the photobiomodulation (laser, 670 or 1560nm) of collagen synthesis by chondrocytes revealed the participation of cytoglobin in the reception of laser signal. It is assumed that signal network has been triggered via laser induced coupling of cytoglobin with 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases: prolyl hydroxylase domain of HIF, histone demethylases and prolyl-hydroxylase of collagen.

Keywords: photobiomodulation, chondrocytes, signal network, cytoglobin, prolyl hydroxylase of collagen, 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases.

Введение.

Цитоглобин, один из белков семейства глобинов, активно экспрессируется в условиях гипоксии [1-3]. Известно, что при физиологической гипоксии хондроцитов аваскулярной хрящевой ткани [4] цитоглобин способен осуществлять доставку кислорода к диоксигеназам, участвующим в синтезе коллагена [5], регулируя, таким образом, синтез внеклеточного матрикса [6]. Спектральные характеристики цитоглобина [7] позволяют предположить возможность его участия в фотобиомодуляции хондроцитов [8], находящей все большее применение в терапии остеоартрита [9]. Ранее нами показана возможность лазерной индукции сигнальной сети сопряженной с цитоглобином при фотобиомодуляции модельной опухоли [10]. Диагностика таких сетей может стать перспективным подходом к выбору параметров лазерного излучения для эффективного и безопасного применения фотобиомодуляции в терапии социально значимых заболеваний.

Цель работы.

Целью настоящей работы является диагностика лазерно-индуцируемой, сопряженной с цитоглобином фотобиомодуляционной сети в хондроцитах с помощью лазерного излучения с длинами волн, лежащими в полосах поглощения глобинов, а также других гемсодержащих белков.

Материалы и методы.

В экспериментах использовали хондроциты человека из назального хряща, оставшегося после стандартного хирургического вмешательства [7]. За день до эксперимента клеточная культура 0-го пассажа была рассажена в два 96-луночных планшета в плотности $2,5 \cdot 10^4$ кл./лунка (в каждом по 30 лунок). На следующий день клетки подвергались лазерному воздействию. Непосредственно перед обработкой в планшетах сливали ростовую среду и добавляли в каждую лунку по 36 мкл ростовой среды, чтобы уровень жидкости в лунке составлял 1 мм. Сначала обрабатывалась половина одного планшета, затем половина другого, потом оставшиеся лунки. Обработка половины лунок каждого планшета составляла ~ 30 минут.

Лазерное воздействие на клеточные культуры осуществляли с помощью эрбиевого волоконного лазера с длиной волны 1560 нм (IPG Photonics, USA) или диодного лазера с длиной волны 670 нм («Мустанг», РФ). Плотность мощности составляла $0,3 \text{ Вт/см}^2$, время экспозиции 60 с.

После окончания воздействия к клеткам добавлялось по 164 мкл ростовой среды и один планшет ставился в инкубатор со стандартными условиями нормоксии (37°C , 5% CO_2 , 20% O_2), а второй в инкубатор с пониженным содержанием кислорода, в условия гипоксии (37°C , 5% CO_2 , 5% O_2). Клетки культивировались в течение двух недель. Каждый день производилась смена ростовой среды. Через 14 дней инкубации синтетическая активность культуры клеток хондроцитов определялась иммунофлуоресцентным методом с помощью антител к коллагену II типа. Каждая точка является средней из, по крайней мере, двух экспериментов. Интенсивность флуоресценции в контрольных (необлученных, инкубированных в условиях гипоксии) образцах, нормализованная на число клеток, оцениваемое по уровню ДНК измеряемому иммунофлуоресцентным методом, составляла $0,42 \pm 0,06$ у. е. В таблице представлены данные, отражающие отношение количества коллагена II типа, накопленного в опытных образцах к таковому в контрольных (необлученных, инкубированных в условиях гипоксии) образцах.

Полученные результаты.

Дизайн наших экспериментов заключался в облучении культуры клеток нулевого пассажа низкоинтенсивным лазерным излучением в течение 60с. В дальнейшем образцы делились на две серии, одна инкубировалась в условиях гипоксии, а другая в условиях нормоксии в течение 14 дней (Таблица)

Таблица. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на накопление коллагена II типа хондроцитами человека нулевого пассажа

Условия культивирования после облучения	Контроль	670нм	1560нм
гипоксия	1	$0,97 \pm 0,2$	$1,52 \pm 0,2$
нормоксия	$0,79 \pm 0,1$	$0,73 \pm 0,3$	$1,09 \pm 0,2$

Результаты экспериментов показали, что уровень накопления коллагена II типа в контрольных (необлученных) образцах, инкубированных в условиях нормоксии, снижен на 20-30% по сравнению с показателями контрольных образцов, инкубированных в условиях гипоксии. Облучение монослоя хондроцитов красным лазерным излучением с длиной волны 670 нм не приводит в наших условиях к изменению показателей по сравнению с контролем во всех вариантах эксперимента. После облучения монослоя хондроцитов ближним инфракрасным излучением с длиной волны 1560 нм наблюдается существенная стимуляция синтеза хондроцитспецифичного коллагена. Уровень накопления коллагена в облученных таким излучением образцах, инкубированных затем в условиях гипоксии, превышает соответствующие контрольные показатели на 50-60%. Если после облучения ближним инфракрасным излучением хондроциты инкубировались в условиях нормоксии, уровень коллагена в них приближался к таковому для контрольных хондроцитов, стимулированным гипоксией. Выявленная в наших экспериментах

существенная фотобиомодуляция синтеза коллагена II типа хондроцитами под действием низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 1560нм, лежащего в полосе поглощения глобинов [7], позволяет предположить участие цитоглобина в восприятии и процессинге лазерного сигнала. После короткого, длительностью 60секунд, лазерного сигнала эффект стимуляции накопления коллагена сохраняется в течение, по крайней мере, 14 дней (Таблица), что указывает на лазерную индукцию сигнальной сети, которая, по-видимому, может быть сопряжена с цитоглобином.

Цитоглобин, как известно, способен интенсифицировать синтез коллагена, обеспечивая доставку кислорода к 2-оксоглутаратзависимой диоксигеназе – пролилгидроксилазе коллагена [5]. Можно предположить, что митохондриальная цитохромоксидаза, регулирующая в клетках уровень 2-оксоглутарата [11], также может быть компонентом узла лазерно-индуцируемой сигнальной сети. Однако, сравнение фотобиомодуляции синтеза коллагена под действием ближнего ИК излучения с длиной волны 1560нм, поглощаемого глобинами и красного излучения с длиной волны 670нм, лежащего в полосах поглощения большинства гемсодержащих белков, в том числе митохондриальной цитохромоксидазы [7], показало неэффективность красного света в наших условиях (Таблица). В наших экспериментах подготовленный к облучению монослой клеток находится в условиях физиологической гипоксии, о чем свидетельствует слабое отличие показателей для контрольных (необлученных) образцов, культивируемых в дальнейшем в условиях нормоксии или гипоксии (Таблица). Известно, что в таких хондроцитах, сформировавшихся в гипоскических условиях аваскулярной хрящевой ткани, на момент облучения практически отсутствуют митохондрии и, соответственно, цитохромоксидаза – акцептор красного света [12]. Можно также предположить, что выявленная в наших экспериментах функциональная митохондриальная недостаточность может быть обусловлена, в том числе, происхождением нашей первичной культуры хондроцитов из патологического хряща [13].

По всей видимости, в наших условиях незначительного вклада цитохромоксидазы в лазерную индукцию синтеза коллагена, геномметаболическая сигнальная сеть может формироваться за счет пересечения цепей передачи сигнала рецептора – цитоглобина, сопряженного с несколькими 2-оксоглутаратзависимыми диоксигеназами. На рисунке представлен лазерно-индуцируемый фрагмент сигнальной сети, обеспечивающей фотобиомодуляцию формирования внеклеточного матрикса (Рис1.).

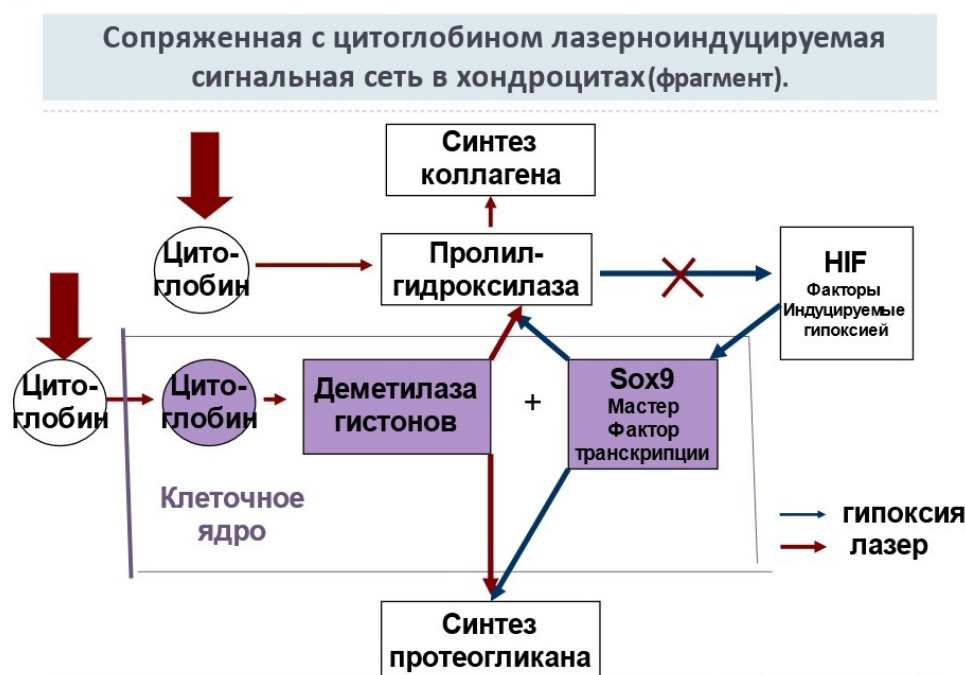


Рис.1

Одним из первичных этапов фотобиомодуляции может быть лазерная индукция перехода цитоглобина, поглощающего красное и ближнее инфракрасное излучение в окисленном состоянии, в восстановленную форму, способную взаимодействовать с кислородом [10]. Фотоиндуцированная доставка кислорода к 2-оксоглутаратзависимым диоксигеназам, а также пролилгидроксилазному домену HIF [2] способна запускать цепи передачи лазерного сигнала, образующие узел на уровне пролилгидроксилазы коллагена.

Допускаемая в рамках нашей гипотезы, возможность облегчения для фотоактивированного цитоглобина

преодоления ядерной мембраны [10] позволяет подключаться к этому узлу также и 2-оксоглутаратзависимым деметилазам, играющих важную роль в гомеостазе хрящевой ткани [14]. Результаты наших экспериментов указывают также на возможность замещения с помощью фотобиомодуляции хондроцитов (Таблица) стандартного способа активации синтеза внеклеточного матрикса, через факторы индуцируемые гипоксией (Рис.). Такой подход может быть востребован в тканевой инженерии [8].

Выводы.

Эффективность лазерной фотобиомодуляции зависит от соответствия параметров лазерного излучения набору рецепторов, присутствующих в клетках в данных конкретных условиях метаболизма.

Поглощаемое цитоглобином излучение стимулирует синтез коллагена II типа хондроцитами при пострадиационной инкубации, как в условиях гипоксии, так и нормоксии, что важно при фотобиомодуляции 3D культур.

Устойчивость эффекта в течение, по крайней мере, двух недель после минутного лазерного сигнала обусловлена лазерной индукцией сопряженной с цитоглобином информационной сети.

Заключение Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые построена сигнальная генно-метаболическая сеть, управляющая синтезом компонентов внеклеточного матрикса хондроцитами, *запускаемая за счет лазерной индукции сопряжения цитоглобина с 2-оксоглутаратзависимыми диоксигеназами: пролилгидроксилазным доменом HIF, деметилазами гистонов и пролилгидроксилазой коллагена.*

Работа выполнена при поддержке Министерства науки в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

Литература.

1. Liu X., El-Mahdy M.A., Boslett J., Varadharaj S., Hemann C., Abdelghany T.M., Ismail R.S., Little S.C., Zhou D., Thuy L.T., Kawada N., Zweier J.L. Cytoglobin regulates blood pressure and vascular tone through nitric oxide metabolism in the vascular wall// *Nat Commun.* 2017 Apr 10;8:14807. doi: 10.1038/ncomms14807.
2. Ningsih S.S., Hardiany N.S., Sadikin M. Role of Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha (HIF-1 α) in Cytoglobin Expression and Fibroblast Proliferation of Keloids// *Kobe J Med Sci.* 2019. V.65(1). P. E10-E18.
3. Reuss S., Balmaceda D., Elgurt M., Riemann R. Neuronal Cytoglobin in the Auditory Brainstem of Rat and Mouse: Distribution, Cochlear Projection, and Nitric Oxide Production// *Brain Sci.* 2023. V. 13(1):107. doi: 10.3390/brainsci13010107.
4. Li H, Li X, Jing X, Li M, Ren Y, Chen J, Yang C, Wu H, Guo F. Hypoxia promotes maintenance of the chondrogenic phenotype in rat growth plate chondrocytes through the HIF-1 α /YAP signaling pathway// *Int J Mol Med.* 2018. V. 42(6). P. 3181-3192.
5. Burmester T., Hankeln T. Function and evolution of vertebrate globins// *Acta Physiol.* 2014. V. 211. P. 501–514.

6. Wei H., Lin L., Zhang X., Feng Z., Wang Y., You Y., Xiaodan Wang X., Hou Y. Effect of cytoglobin overexpression on extracellular matrix component synthesis in human tenon fibroblasts// *Biol Res* 2019. V.52. 23. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0229-4>.
7. Alexandrovskaya Yu. M., Baum O.I., Shekhter A. B., Petersen E. V., Tiflova O. A., Dmitriev A. K., Ulyanov V. A., Svistushkin V. M., Selezneva L. V., Sobol E. N. Mechanisms of laser activation of chondrocytes in osteoarthritis healing // *Laser Physics Letters*. 2018. V. 15. No 8. P. 085601-1 - 085601-8.
8. Shaikh-Kader A., Houreld N.N. Photobiomodulation, Cells of Connective Tissue and Repair Processes: A Look at In Vivo and In Vitro Studies on Bone, Cartilage and Tendon Cells// *Photonics*. 2022. V. 9(9). P. 618-627.
9. Balbinot G., Schuch C.P., Nascimento P.S.D., Lanferdini F.J., Casanova M., Baroni B.M., Vaz M.A. Photobiomodulation Therapy Partially Restores Cartilage Integrity and Reduces Chronic Pain Behavior in a Rat Model of Osteoarthritis: Involvement of Spinal Glial Modulation// *Cartilage*. 2021 V. 13(2_suppl). P.1309S-1321S.
10. Tiflova O. A. Laser Induction of Signal Networks in Adaptation and Regeneration: Investigation of the Contribution of Endogenous Photoreceptors and Thermoreceptors // *Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*. 2020. V. 14. №2. P. 316-317.
11. Liu T., O'Rourke B. Regulation of mitochondrial Ca²⁺ and its effects on energetics and redox balance in normal and failing heart // *J Bioenerg Biomembr*. 2009. V. 41. №2. P. 127–132.
12. Boubriak O.A., Brooks J. T.S., Urban J. P. G. Cytochromecoxidase levels in chondrocytes monolayer expansion and after return to three dimensional culture // *Osteoarthritis and Cartilage* 2009. V. 17. P. 1084-1092.
13. Kan S., Duan M., Liu Y., Wang C., Xie J. Role of Mitochondriain Physiology of Chondrocytes and Diseases of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis// *Cartilage*. 2021 V. 13(2 Suppl). P. 1102S–1121S.
14. Wan C., Zhang F., Yao H., Li H., Tuan R.S. Histone Modifications and Chondrocyte Fate: Regulation and Therapeutic Implications. // *Front Cell Dev Biol*. 2021 Apr 16;9:626708. doi: 10.3389/fcell.2021.626708.

Сведения об авторах**Ольга Игоревна Баум**

доктор ф.-м. наук, зав. Лаб биофотоники ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН

Москва, Россия

Эл. почта: baumolga@gmail.com

Александр Константинович Дмитриев, н.с. ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН

Москва, Россия

Эл. почта: dmitriev_a62@mail.ru

Ольга Антоновна Тифлова

к.б.н., с.н.с.,

ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН

Москва, Россия

Эл. почта: olantp@gmail.com

Information about author**Olga Igorevna Baum**

Doctor of Science. Head of Biophotonics Laboratory FRC "Crystallography and Photonics"

Russian Academy of Sciences

Moscow, Russian Federation

E-mail: baumolga@gmail.com

Alexander Konstantinovich Dmitriev, researcher, IPT FRC “Crystallography and Photonics” RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: dmitriev_a62@mail.ru

Olga Antonovna Tiflova

PhD (Biol/), Senior Scientist,

FRC "Crystallography and Photonics"

Russian Academy of Sciences

Moscow, Russian Federation

E-mail: olantp@gmail.com

УДК 597.556.331.9 : 577.115
 ГРНТИ 69.09
 DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.137-142

С.Н. Хуртина¹, В.П. Воронин¹,
 А.М. Орлов^{2,3}, С.А. Мурзина¹

¹Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук"

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт океанологии им. П.П. Ширшова Российской академии наук

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова Российской академии наук

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА РЫБ АНТАРКТИЧЕСКОЙ СЕРЕБРЯНКИ *PLEURAGRAMMA ANTARCTICUM*

*В статье представлены данные по липидному составу некоторых органов и тканей *Pleuragramma antarcticum* из Антарктического пролива (атлантический сектор Антарктики). Обсуждаются полученные результаты по тканеспецифичности липидов и биохимическим адаптациям на уровне липидов у этого вида рыб, которые способствуют устойчивости организма к воздействию экстремальных факторов среды.*

Ключевые слова: липиды, антарктическая серебрянка, *Pleuragramma antarcticum*, биохимические адаптации, стресс, Антарктида.

	<p>S.N. Khurtina¹, V.P. Voronin¹, A.M. Orlov^{2,3}, S.A. Murzina¹</p> <p>¹Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS)</p> <p>²Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences (IO RAS)</p> <p>³A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences (IPEE RAS)</p>
--	--

TISSUE SPECIFICITY OF THE LIPID CONTENT OF THE ENDEMIC FISH SPECIES ANTARCTIC SILVERFISH *PLEURAGRAMMA ANTARCTICUM*

*The paper presents data on the lipid content of certain organs and tissues of *Pleuragramma antarcticum* from the Antarctic Strait (Atlantic sector of Antarctica). The obtained results on the tissue specificity of lipids and biochemical adaptations at the lipid level in this fish species, which contribute to the tolerance of the organism to influence of the extreme environmental factors of Antarctic ecosystems, are discussed.*

Key words: lipids, Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*, biochemical adaptations, stress, Antarctica.

Введение

Устойчивость и чувствительность организма к обитанию в экстремальных условиях, в том числе в условиях стресса, обеспечивается особенностями метаболизма. Накопление липидов и поддержание определенного баланса в соотношении их структурных и запасных классов, а также жирнокислотных компонентов является необходимым условием нормального роста, развития и функционирования водных организмов в экстремальных условиях, в том числе при низких температурах низкоширотных регионов.

Антарктическая серебрянка *Pleuragramma antarcticum* (Boulenger 1902) является представителем рыб из семейства Нототениевые, 97% которых являются эндемиками Южного океана (Антарктида) (Andriashev, 1965). Липиды во многом определяют

способность серебрянки успешно адаптироваться в условиях низких температур (при температуре около $-1,9^{\circ}\text{C}$) в пелагиали и занимать доминирующее положение, как по численности, так и по биомассе в шельфовой зоне антарктических морей (DeWitt, 1970). Они играют важную роль в организме серебрянки не только для поддержания плавучести рыбы, но могут быть источниками энергии (Hagen, Kattner, 2017). Липидный состав антарктической серебрянки в период эмбрионального и особенно раннего постэмбрионального развития хорошо изучен (Hagen, Kattner, 2017; Giraldo et al., 2013; Mayzaud et al., 2011). Накопление липидов в организме серебрянки происходит в процессе длительного раннего постэмбрионального развития (7–9 лет) (Faleyeva, 1990; Hagen, Kattner, 2017), достигая максимального содержания у взрослых особей (30–57% сухой массы) (Faleyeva, 1990; Hagen, Kattner, 2017). Имеются лишь отдельные исследования содержания некоторых классов липидов в органах и тканях, в основном в мышцах и печени, у взрослых нототениевых рыб, большинство из которых представлены в сравнительном аспекте с другими видами антарктических рыб (Phleger et al., 1999; Hagen et al., 2000; Kamler et al., 2001).

Цель данной работы – исследовать тканеспецифичность содержания липидов разных классов в ключевых функциональных органах тела – мозг, сердце, печень, жабры, мышцы, желчный пузырь и половые железы (гонады), и оценить их роль в биохимических адаптациях у антарктической серебрянки *Pleuragramma antarcticum*, обитающей в Антарктическом проливе Атлантического сектора Антарктики.

Материалы и методы

Сбор материала для исследования производился в ходе научной экспедиции на НИС «Академик Мстислав Келдыш» в январе 2022 г. Взрослые особи (половозрелые самки) антарктической серебрянки, *Pleuragramma antarcticum* ($n=4$) были выловлены в Антарктическом проливе (атлантический сектор Антарктики), отделяющем острова арх. Жуанвиль от северо-восточной части Антарктического полуострова ($63^{\circ}28,6'$ ю.ш.; $56^{\circ}31,2'$ з.д.), с использованием разноглубинного трала Айзекса-Кидда в модификации Самышева и Асеева (Kobyliansky et al., 2010). Глубина вылова соответствовала глубине обитания (от 300 до 500 м) данного вида рыб (Parker et al., 2015). Видовая идентификация проводилась согласно работе (Gon, Heemstra, 1990). Перед вскрытием рыб измеряли их стандартную длину ($15,43 \pm 0,48$ см; диапазон 14,1–16,4 см) и массу ($40,95 \pm 2,81$ г; диапазон 36,1–48,9 г). Образцы органов и тканей (мышцы, печень, сердце, гонады, головной мозг, жабры и желчный пузырь) фиксировали при -80°C в морозильной камере Eppendorf CryoCube (Эппендорф, Великобритания). Для анализа отбирали белые мышцы из задней дорсальной части тела, мозг и сердце фиксировали целиком.

Общие липиды экстрагировали смесью хлороформ/метанол (2:1 по объему) по методу Folch et al. (1957) с использованием роторного испарителя Hei-VAP Advantage ML/G3 (Heidolph Instruments, Германия). Оценку липидного профиля проводили по содержанию общих липидов (ОЛ) и их отдельных классов (структурных липидов – фосфолипидов (ФЛ), холестерина (ХС), энергетических липидов – триацилглицеринов (ТАГ), эфиров холестерина (ЭХС) и восков, а также по содержанию моноацилглицеринов (МАГ), диацилглицеринов (ДАГ) и неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК). Для анализа использовали комплекс для высокоэффективной тонкослойной хроматографии САМАГ (Швейцария) с применением пластин НРТLC Silica gel 60 F254 Premium Purity plates (Merck, Германия). Описание аналитических процедур представлены ранее в наших работах (Воронин и др., 2021). Биохимический анализ выполнен в лаборатории экологической биохимии с использованием оборудования Центра коллективного пользования Карельского научного центра РАН. Статистическая обработка результатов проводилась в открытой среде программирования «R» с использованием базовых пакетов. Достоверность различий по содержанию липидов в разных органах/тканях анализировали с помощью непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Наибольшее содержание ОЛ установлено в печени (62,32% сухой массы) и мышцах (56,61%) взрослых особей антарктической серебрянки в основном за счет запасных липидов - ТАГ. Содержание ОЛ в других органах варьировало от 19 до 30%. Наиболее высокое содержание ТАГ показано в мышцах (36,86% сухой массы), тогда как в других органах их содержание не превышало 8% за исключением печени (18%) и жабр (11%). Известно, что *Pleuragramma antarcticum* имеет адаптивные образования в виде подкожных (0,2–1,5 мм) и крупных межмышечных (диаметром 0,5–3,0 мм) липидных мешков уникального строения, стенка которых состоит из нескольких белых адипоцитов, расположенных вокруг крупной липидной капли (Eastman, DeVries, 1989). ТАГ являются доминирующим классом липидов этих образований (Hagen, Kattner, 2017). Следует отметить, что ТАГ были основным по количественному содержанию липидным классом во всех исследованных тканях (тушка (мышцы), внутренности, нейрокраниум мозга, центры позвонков) у антарктических нототениевых рыб *Trematomus* spp., выловленных в восточной части Антарктики (Phleger et al., 1999) и у других представителей нототеноидных антарктических рыб (Hagen et al., 2000).

ЭХС, как другой класс запасных липидов, у антарктической серебрянки доминировал по количественному содержанию в головном мозге (8,08% сухой массы), сердце (7,93%) и желчном пузыре (8,54%). ЭХС и ТАГ преобладали в гонадах серебрянки, а их уровень был сходным (5,58% vs 5,22%). ЭХС, наряду с ТАГ, являются важным источником энергии в организме, при этом его структурные элементы могут использоваться для синтеза биологически активных веществ в клетке (Nelson, Cox, 2008).

В печени антарктической серебрянки кроме более высокого содержания ТАГ также отмечено преобладание их промежуточных продуктов метаболизма – МАГ (1,46%) и ДАГ (6,44%), а также НЭЖК (15,47%) и восков (5,99%), по сравнению с другими тканями, что отражает функциональное значение этого органа в метаболизме липидов в организме рыб. Содержание НЭЖК в других тканях не превышало 5,3%. Установлено, что содержание структурных липидов, а именно ХС в печени было в 2 раза выше (5,21%), чем в других тканях органов (от 1,63 до 2,47% сухой массы). При этом уровень ФЛ составлял - 4,83%, а в мышцах - 4,18%, тогда как в других органах он был не выше 2,5%. Значение соотношения ХС/ФЛ в разных органах достоверно не отличалось (0,57-1,35), за исключением мозга (1,63). Это может указывать на важную роль структурных липидов в стабилизации жидкостности и работы биомембран организма антарктической серебрянки в холодных шельфовых водах Антарктики.

По значению показателя соотношения основных классов структурных и энергетических липидов - ТАГ/ФЛ достоверно наиболее высоким значением по сравнению выделялись мышцы (8,81), а также жабры (4,86). Ранее нами показано (Pekkoeva et al., 2022), что жабры и мышцы, как органы рыбы, «непосредственно взаимодействующие» с окружающей средой, характеризовались наиболее высоким содержанием насыщенных жирных кислот, входящих в состав как структурных, так и энергетических липидов, участвующих в приспособлении *Pleurogramma antarcticum* к жизни в шельфовой ледяной зоне Антарктики.

Заключение

Таким образом, исследован липидный состав семи органов, а именно головного мозга, жабр, сердца, мышц, печени, половых желез (гонад) и желчного пузыря антарктической серебрянки, выловленной в акватории пролива Антарктик (атлантический сектор Антарктики).

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

1. Наибольшее содержание ОЛ установлено в печени (62,32% сухой массы) и мышцах (56,61%) взрослых особей антарктической серебрянки;
2. ТАГ преобладали по количественному содержанию в исследованных органах и тканях серебрянки;
3. Мышцы серебрянки отличались существенно более высоким уровнем ТАГ по сравнению с другими органами, что связано с наличием у этого вида рыбы крупных межмышечных липидных мешков;
4. ЭХС, как универсальные молекулы, у антарктической серебрянки доминировали в головном мозге, сердце и желчном пузыре;
5. В печени серебрянки установлен высокий уровень ХС и промежуточных продуктов метаболизма липидов по сравнению с другими исследованными органами и тканями, что характеризует ее роль в метаболизме липидов в организме;
6. Более высокое соотношение ТАГ/ФЛ в мышцах и жабрах серебрянки отражает биохимические адаптивные изменения на уровне соотношения основных классов структурных и энергетических липидов в ответ на воздействие низких температур шельфовой зоны антарктических экосистем.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о различиях в содержании липидных классов в исследованных органах и тканях антарктической серебрянки, что отражает тканеспецифичность липидного состава и роль липидов в организме, а также биохимических адаптациях этого вида рыбы к обитанию в условиях холодных вод Антарктики. Результаты исследования позволяют лучше понять роль липидов в организме рыб и механизмы адаптации к обитанию в водах полярных экосистем.

Работа выполнена в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006, а также государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № FMWE-2022-0001.

Благодарности: Авторы выражают глубочайшую благодарность административному корпусу рейса АМК-87, а также экипажу НИС «Академик Мстислав Келдыш» за всестороннюю помощь и поддержку в ходе выполнения экспедиционных работ и исследований. Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам ИО РАН А.В. Мишину, К.В. Минину и В.Л. Семину за профессиональное проведение траловых работ.

Литература:

1. Andriashev A.P. A general review of the Antarctic fish fauna. In *Biogeography and Ecology in Antarctica; Part of the Monographiae Biologicae book series; van Mieghem, J., van Oye, P., Eds.; Springer Science: Dordrecht, The Netherlands, 1965. V. 15. P. 491-550. https://doi.org/10.1007/978-94-015-7204-0_15.*
2. DeWitt H.H. Coastal and deep-water fishes of the Antarctic. In *Antarctic Map Folio Series, Folio 15; Bushnell V.C., Ed.; American Geophysical Society: New York, NY, USA, 1971. P. 1-18.*
3. Eastman J.T., DeVries A.L. Ultrastructure of the lipid sac wall in the Antarctic notothenioid fish *Pleuragramma antarcticum* // *Polar Biol.* 1989. V. 9. P. 333-335.
4. Faleyeva T.I.; Gerasimchuk V.V. Features of reproduction in the Antarctic sidestripe, *Pleuragramma antarcticum* Nototheniidae // *J. Ichthyol.* 1990. No. 30. P. 67-79.
5. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids animal tissue (for brain, liver and muscle) // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. P. 497-509. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5).
6. Giraldo C., Mayzaud P., Tavernier E., Irisson J.O., Penot F., Becciu J., Chartier A., Boutoute M., Koubbi P. Lipid components as a measure of nutritional condition in fish larvae

- (*Pleuragramma antarcticum*) in East Antarctic // *Mar. Biol.* 2013. V. 160. P. 877–887. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2141-0>.
7. Gon O., Heemstra P.C. (Eds.) *Fishes of the Southern Ocean*; JBL Smith Institute of Ichthyology: Grahamstown, South Africa, 1990.
 8. Hagen W., Kattner G. The role of lipids in the life history of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarctica*. In *The Antarctic Silverfish: A Keystone Species in a Changing Ecosystem*; Springer: Cham, Switzerland, 2017. P. 131–148.
 9. Hagen W., Kattner G., Friedrich C. The lipid compositions of high-Antarctic notothenioid fish species with different life strategies // *Polar Biology*. 2000. V. 23. P. 785–791.
 10. Kamler E., Krasicka B., Rakusa-Suszczewski S. Comparison of lipid content and fatty acid composition in muscle and liver of two notothenioid fishes from Admiralty Bay (Antarctica): An eco-physiological perspective // *Polar Biol.* 2001. V. 24. P. 735–743.
 11. Kobylansky S.G., Orlov A.M., Gordeeva N.V. Composition of deepsea pelagic ichthyocenes of the Southern Atlantic, from waters of the range of the Mid-Atlantic and Walvis Ridges // *J. Ichthyol.* 2010, V. 50. P. 932–949.
 12. Mayzaud P., Chevallier J., Tavernier E., Moteki M., Koubbi P. Lipid composition of the Antarctic fish *Pleuragramma antarcticum*. Influence of age class // *Polar Sci.* 2011. V. 5. P. 264–271.
 13. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed.; W.H. Freeman & Company: New York, NY, USA, 2008. 1294 p.
 14. Parker M.L., Fraser W.R., Ashford J., Patarnello T., Zane L., Torres J.J. Assemblages of micronektonic fishes and invertebrates in a gradient of regional warming along the Western Antarctic Peninsula // *Journal of Marine Systems*. 2015. V. 152. P. 18–41.
 15. Pekkoeva S.N., Voronin V.P., Mishin A.V., Orlov A.M., Murzina S.A. Living in the Extreme: Fatty Acid Profiles and Their Specificity in Certain Tissues of Dominant Antarctic Silverfish, *Pleuragramma antarcticum*, from the Antarctic Sound (Southern Ocean) Collected during the Austral Summer // *Diversity*. 2022. V. 14(10), 817.
 16. Phleger C.F., Nichols P.D., Erb E., Williams R. Lipids of the notothenioid fishes *Trematomus* spp. and *Pagothenia borchgrevinki* from East Antarctica // *Polar Biol.* 1999. V. 22. P. 241–247.
 17. Воронин В.П., Мурзина С.А., Нефедова З.А., Пеккоева С.Н., Руоколайнен Т.Р., Ручьев М.А., Немова Н.Н. Сравнительно-видовая характеристика липидов и их динамика в процессе эмбрионального и раннего постэмбрионального развития атлантического лосося (*Salmo salar* L.) и кумжи (*Salmo trutta* L.) // *Онтогенез*. 2021. Т. 52, № 2. С. 108–119. <https://doi.org/10.31857/S0475145021020099>

Сведения об авторах**Хуртина Светлана Николаевна**

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории
экологической биохимии Института биологии
КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия
Эл. почта: pek-svetlana@mail.ru

Воронин Виктор Петрович

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории
экологической биохимии Института биологии
КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, Россия
Эл. почта: voronen-viktor@mail.ru

Орлов Алексей Маркович

Доктор биологических наук, руководитель
лаборатории океанической ихтиофауны
Института океанологии им. П.П. Ширшова
РАН г. Москва, Россия
Эл. почта: orlov@vniro.ru

Information about author**Khurtina Svetlana Nikolaevna**

Candidate of biological sciences (Ph.D.),
Senior Researcher, Environmental Biochemistry Laboratory
of Institute of Biology, KarRC RAS, Petrozavodsk, Russia
E-mail: pek-svetlana@mail.ru

Voronin Viktor Petrovitch

Junior Research Fellow, Environmental Biochemistry Laboratory
of Institute of Biology, KarRC RAS, Petrozavodsk,
Russia
E-mail: voronen-viktor@mail.ru

Orlov Alexey Markovich

Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of
Oceanic Ichthyofauna of the Shirshov Institute of Oceanology
of the Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia
Email mail: orlov@vniro.ru

Мурзина Светлана Александровна
Доктор биологических наук, заведующий
лабораторией экологической биохимии Ин-
ститута биологии КарНЦ РАН, г. Петро-
заводск, Россия
Эл. почта: murzina.svetlana@gmail.com

Murzina Svetlana Alexandrovna
Doctor of Biological Sciences, Ph.D.,
Head of Environmental Biochemistry Laboratory of Insti-
tute of Biology, KarRC RAS, Petrozavodsk, Russia
E-mail: murzina.svetlana@gmail.com

УДК 577.115:597.553.1/.554.5(261.1)
ГРНТИ 69.09
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.142-147

**В.П. Воронин, Д.В. Артеменков,
А.М. Орлов, С.А. Мурзина**
Институт биологии – обособленное подразделение
Федерального исследовательского центра
«Карельский научный центр Российской академии наук»
(КарНЦ РАН)
Всероссийский научно-исследовательский институт
рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)
Институт океанологии им. П.П. Ширшова (ИО РАН)

ГЛУБОКОВОДНЫЕ РЫБЫ СЕМЕЙСТВА СТОМИЕВЫЕ (STOMIIDAE) МОРЯ ИРМИНГЕРА: ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ С УЧАСТИЕМ ЛИПИДОВ К ОБИТАНИЮ В ГРАДИЕНТЕ ГЛУБИН

Проведено липидное и жирнокислотное профилирование отдельных представителей мезопелагических видов рыб семейства Stomiidae, обитающих в градиенте глубин моря Ирмингера (Северная Атлантика) и являющихся основными хищниками «сумеречной» зоны. Впервые установлены изменения качественного и количественного состава липидов, фосфолипидов и жирных кислот в мышечной ткани, определяющие специфику стратегии адаптационного ответа при обитании на глубине.

Ключевые слова: липиды, жирные кислоты, мезопелагические рыбы, Stomiidae, море Ирмингера, Северная Атлантика.

**V.P. Voronin, D.V. Artemenkov,
A.M. Orlov, S.A. Murzina**
Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian
Academy of Sciences
Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography
Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences

DEEP-SEA FISH OF THE STOMIIDAE FAMILY OF THE IRMINGER SEA: ECOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ADAPTATION WITH THE PARTICIPATION OF LIPID TO DEPTH

Lipid and fatty acid profiling of some representatives of mesopelagic fish species of the Stomiidae family, inhabiting the depth gradient of the Irminger Sea (North Atlantic) and being the main predators of the "twilight" zone, was carried out. For the first time, changes in the qualitative and quantitative composition of lipids, phospholipids and fatty acids in muscle tissue have been established, which determine the specifics of the adaptive response strategy when living at depth.

Keywords: lipids, fatty acids, mesopelagic fish, Stomiidae, Irminger Sea, North Atlantic.

Введение

Глубоководные рыбы семейства Стомиевые (Stomiidae) одни из самых разнообразных, распространенных и встречающихся на глубинах в диапазоне 200–1000 метров

рыб, отличающиеся небольшими размерами и высокой биомассой в отдельных районах океана [1,2]. Известно, что большинство видов данного семейства совершают обширные восходящие миграции в эпипелагическую зону в ночное время с последующей миграцией вниз на сотни метров днём [3]. Такие перемещения сопровождаются сильными компрессионными и температурными воздействиями, однако мезопелагические гидробионты (в том числе рыбы) успешно адаптировались к подобным условиям обитания, в частности, за счёт широкого спектра компенсаторных механизмов биохимических реакций, в которых особую роль выполняют липиды и жирные кислоты (ЖК) [4].

Липиды являются многофункциональными и лабильными веществами, принимающими участие во многих адаптивных реакциях организма, которые направлены на поддержание гомеостаза метаболических процессов, в том числе при воздействии экстремальных факторов. Изучение липидного профиля мезопелагических видов рыб, как одних из наиболее разнообразных и распространённых гидробионтов Мирового океана, представляет огромный фундаментальный интерес, а также практическую значимость, например в качестве потенциальных источников биологически активных веществ [1,5,6].

Цель работы

В настоящей работе проводилось изучение липидного и жирнокислотного (ЖК) состава мышечной ткани 4-х наиболее распространённых представителей семейства Стомиевых (*Chauliodus sloani*, *Stomias boa*, *Malacosteus niger* и *Borostomias antarcticus*), отловленных на разных глубинах моря Ирмингера.

Материалы и методы

Сбор образцов мышечной ткани мезопелагических видов рыб (*Chauliodus sloani*, *Stomias boa*, *Malacosteus niger*, *Borostomias antarcticus*) осуществлялся в рамках научно-исследовательских работ в море Ирмингера (Северо-Восточная Атлантика: 59°60'–64°60' с.ш., 26°20'–41°50' з.д.) в летний период (июнь–июль) на борту НИС «Атлантида». Отбор биоматериала проводился путём тралений на глубинах 250, 325, 375, 400, 650 и 700 метров в 3-х районах: районе регулирования НЕАФК, рыболовной зоне Гренландии и исключительной экономической зоне Исландии [7].

Экстракцию общих липидов (ОЛ) из мышечной ткани проводили по методу Фолча [8]. Методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) в системе гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (32:8:0,8 мл об/об) было проведено качественное и количественное фракционирование индивидуальных липидных классов – общих фосфолипидов (ФЛ), моноацилглицеринов (МАГ), диацилглицеринов (ДАГ), триацилглицеринов (ТАГ), холестерина (ХС), эфиров холестерина (ЭХС), свободных жирных кислот (СЖК) и восков. В качестве оборудования применялся комплекс для ВЭТСХ САМАГ (Швейцария), состоящий из полуавтоматического аппликатора Linomat 5, хроматографической камеры для элюирования ADC2, денситометра TLC Scanner 4 и дериватизатора [9]. Окраску липидных пятен осуществляли подкисленным раствором ортофосфорной кислоты (H₃PO₄), с последующим проявлением окрашенных пятен путём нагревания пластины до 160°C в течение 15 мин. Качественная идентификация липидов проводилась по стандартам соответствующих компонентов (Sigma-Aldrich, США) с учётом значений R_f.

Качественное и количественное определение индивидуальных фосфолипидных фракций – фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилсерина (ФС), фосфатидилинозитола (ФИ), лизофосфатидилхолина (ЛФХ), сфингомиелина (СФМ) – осуществляли с использованием жидкостного хроматографа «Стайер» (ООО «Аквилон, Россия»). Фракционирование общих ФЛ проводили на колонке размером 250 × 4 мм, наполненной сорбентом Нуклеосил 100-7 («Элсико», Россия), и с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил–метанол–гексан–85%-ная фосфорная кислота (918,0 : 30,0 : 30,0 : 17,5 по объёму) при скорости потока 1

мл/мин. Детектирование анализируемых ФЛ отдельных классов осуществляли на спектрофотометре методом поглощения света в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 206 нм [10].

Качественный и количественный анализ жирных кислот ОЛ (ЖК) осуществляли методом газовой хроматографии (ГХ) с масс-селективным детектором (МСД) и пламенно-ионизационным детектором (ПИД), предварительно подвергнув смесь ОЛ кислотному метилированию [11]. Для определения качественного состава полученной смеси метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) проводили их разделение на ГХ с моно-квадрупольным масс-селективным детектором «Маэстро-αМС» (Сайтегра, Россия). Фракционирование осуществлялось в течение 32 минут при градиентном термостатировании ($t_{\text{нач}} = 140^{\circ}\text{C}$ – удержание 5 мин; увеличение t со 140°C до 240°C со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; $t_{\text{кон}} = 240^{\circ}\text{C}$ – удержание 2 мин) на капиллярной колонке HP-88 60m*0.25mm*0.20mm (Agilent Technologies, USA) с использованием гелия в качестве подвижной фазы. Детектирование МЭЖК осуществлялось в режиме SIM/SCAN: режим SIM – для регистрации ЖК, входящих в состав аналитических стандартов – Supelco 37, Bacterial Acid Methyl Ester (BAME) Mix и PUFA №1 Marine source (все Sigma-Aldrich, США); режим SCAN – для поиска и идентификации уникальных жирнокислотных компонентов в диапазоне 50–400 m/z. Полученные данные были проанализированы с использованием ПО «Маэстро Аналитик v. 1.025» и библиотекой NIST. Далее, после качественной идентификации на ГХ-МС, количественный анализ проводили на ГХ-ПИД «Хроматэк-Кристалл-5000.2» (Хроматэк, Йошкар-Ола, Россия). Фракционирование осуществлялось в течение 32 минут при градиентном термостатировании ($t_{\text{нач}} = 140^{\circ}\text{C}$ – удержание 5 мин; увеличение t до 240°C со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; $t_{\text{кон}} = 240^{\circ}\text{C}$ – удержание 2 мин) на капиллярной колонке HP-88 60m*0.25mm*0.20mm (Agilent Technologies, USA) с использованием азота в качестве подвижной фазы. Процедура обработки полученных результатов в ПО «Хроматэк-Аналитик v. 3.0.298.1» описана в статье [42] (Murzina et al., 2020). Количественный расчёт ЖК проводили методом добавления внутреннего стандарта в пробу (22:0). Все параметры были идентичными между ГХ-МС и ГХ-ПИД, за исключением подвижной фазы (гелий и азот, соответственно).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием языка программирования R (версия 4.2.2) в среде разработки «RStudio» с применением дополнительных пакетов. Для каждого исследованного вида была рассчитана описательная статистика (среднее арифметическое и ошибка среднего арифметического - $m \pm se$). Достоверность различий между группами оценивали при помощи непараметрического теста ранговых сумм Вилкоксона-Манна-Уитни [12]. Статистический анализ сходства между исследованными видами осуществляли с использованием алгоритма ANOSIM, а анализ процентного сходства – с использованием статистического анализа SIMPER.

Полученные результаты

Установлено, что содержание ОЛ в мышцах исследованных видов рыб носит видоспецифичный характер, что обусловлено различиями в жизненных циклах, способностью к осуществлению вертикальных миграций, пищевой специализацией, а также выбором подходящих компенсаторных реакций на действие факторов среды (гидростатическое давление, температура, солёность и др.) [13,14]. Отмечено накопление восков у *B. antarcticus*, что, как известно, является характерным признаком для вертикально-мигрирующих видов [14,15]. Для остальных видов выявлено превалирование «быстро-реагирующих» ТАГ – основной формы запасания энергии для хищных видов рыб – указывающее на иную стратегию компенсаторного ответа в ходе суточных вертикальных миграций [16]. Установлено, что исследованные виды стомиевых различались по содержанию ХС – одного из важнейших липидных компонентов биомембран. Выявленная видоспецифичность липидного профиля рыб может указывать на эволюционно-детерминированные механизмы компенсаторной реакции на изменяющиеся факторы среды.

Установлен низкий процент сходства (до 40%) по общим ФЛ, а также по индивидуальным ФЛ классам (ФХ, ФЭА, ФС, ФИ, ЛФХ, СФМ) – структурообразующие компоненты биомембран – между исследованными видами. Полученный результат также свидетельствует в пользу видоспецифичности биохимических механизмов адаптаций, в частности тех, что направлены на поддержание целостности клеточных мембран, с участием ФЛ, при воздействии абиотических факторов среды, таких как давление, температура и др. [17,18]. Отмечено, что у двух относительно схожих по накоплению нейтральных липидов видов рыб – *Ch. sloani* и *S. boa* – отмечены различия динамики структурных липидов с глубиной.

Анализ ЖК-состава позволил установить доминирование мононенасыщенных ЖК (МНЖК – до 60% от суммы ЖК) в мышцах у всех 4-х исследованных видов, что определяется преимущественно питанием [19,20]. Отмечено, высокое содержание *cis20:1(n-9)* и *cis22:1(n-11)* ЖК – трофические биомаркеры копепод, накопление которых у исследованных хищных рыб отражает опосредованное поступление за счет питания другой мелкой рыбой, для которых зоопланктон является основным объектом питания, чем обеспечивается в том числе взаимосвязь мезопелагиали и пелагиали в океане. Интересно, что по соотношению этих биомаркерных кислот установлен трофический «след» *C. glacialis* у *B. antarcticus* и *C. hyperboreus* у остальных трех видов рыб – *Ch. sloani*, *S. boa* и *M. niger* [6,21]. Стоит отметить значительное содержание длинноцепочечных спиртов у *B. antarcticus*, которые, вероятнее всего, передаются по трофической сети от богатых восками и жирными спиртами веслоногих ракообразных [22]. Установлено, что трофическое положение исследованных видов составляет не ниже консументов II уровня, при этом *B. antarcticus* занимает более высокое трофическое положение по сравнению с другими исследованными видами [23]. На основании анализа ЖК-состава также выявлен механизм участия ЖК, наряду с ФЛ, в поддержании физико-химического состояния мембраны при изменении глубины у *Ch. sloani*, *B. antarcticus* и *S. boa*, *M. niger*, который осуществляется за счёт увеличения отдельных *n-6* и *n-3* полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) в ФЛ биомембран: *cis20:5(n-3)*, *cis22:6(n-3)* и *cis20:4(n-6)* ЖК, соответственно [18]. При этом у всех исследованных видов отмечено накопление насыщенных ЖК (НЖК) в ФЛ на сравнительно небольших глубинах. Установлены различия ЖК состава у эфиров холестерина (ЭХС) и восков у *B. antarcticus* и *S. boa*, при этом таковые не отмечены для *Ch. sloani*, что может указывать на различия механизмов поддержания надлежащей плавучести у этих вертикально-мигрирующих видов.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: исследование качественного и количественного липидного и жирнокислотного состава мышечной ткани малоизученных мезопелагических видов рыб семейства Стомиевые (Stomiidae) позволило установить видоспецифичность накопления отдельных липидных компонентов, а также выявить сходства и различия в стратегиях адаптации исследуемых видов к глубоководным условиям обитания на уровне липидного метаболизма.

Работа выполнена в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

Литература

1. Irigoien X., Klevjer T.A., Røstad A., Martinez U., Boyra G., Acuña J. L., ... Kaartvedt S. Large mesopelagic fishes biomass and trophic efficiency in the open ocean // *Nature communications*. – 2014. – Vol. 5, N. 1. – P. 1-10.
2. Hidalgo M., Browman H.I. Developing the knowledge base needed to sustainably manage mesopelagic resources // *ICES Journal of Marine Science*. – 2019. – Vol. 76, N. 3. – P. 609-615.
3. Salvanes A.G.V., Kristoffersen J.B. *Mesopelagic fishes*. Academic Press, 2001. –

1711-1717 pp.

4. Arts M.T., Kohler C.C. Health and conditions in fish: The influence of lipids on membrane competency and immune response. In *Lipids in Aquatic Ecosystems*; Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J., Eds.; Springer: NY, USA, 2009. – 237–257 pp.
5. McGinnis R.F. Biogeography of the lantern fishes (Myctophidae) south of 30°S // *Antarctic Res Ser.* – 1982. – Vol. 35. – P. 110.
6. Eduardo L.N., Lucena-Frédou F., Mincarone M.M., Soares A., Loc'h L., Frédou T., Ménard F., Bertrand A. Trophic ecology, habitat, and migratory behaviour of the viperfish *Chauliodus sloani* reveal a key mesopelagic player // *Scientific report.* – 2020. – Vol. 10, N. 1. – P. 20996.
7. Voronin V.P., Artemenkov D.V., Orlov A.M., Murzina S.A. Fatty acid spectra in mesopelagic fishes of the Myctophidae and Stomiidae families collected in the North East Atlantic // *Diversity.* – 2023. – Vol. 15, N. 2. – Article ID. 166.
8. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues // *J. Biol. Chem.* – 1957. – V. 226, N. 5. – P. 497-509.
9. Hellwig J. Defining parameters for a reproducible TLC-separation of phospholipids using ADC // *Diploma thesis. Germany.* 17.06.2008.
10. Arduini A., Pescechera A., Dottori S., Sciarroni A.F., Serafini F., Calvani M. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies // *J. Lipid Res.* – Vol. 37. – P. 684–689.
11. Цыганов Э.П. Метод прямого метилирования липидов после ТСХ без элюирования с силикагеля // *Лабор. дело.* – 1971. - № 8. – С. 490-493.
12. Кабаков Р.И. R в действии. Анализ и визуализация данных на языке R / пре. с англ. Волковой П.А. ДМК Пресс, 2016. – 588 с.
13. Connan M., Mayzaud P., Duhamel G., Bonnevie B.T., Chérel Y. Fatty acid signature analysis documents the diet of five myctophid fish from the Southern Ocean // *Marine biology.* – Vol. 157, № 10. – P. 2303-2316.
14. Ozdemir N.S., Parrish C.C., Parzanini C., Mercier A. Neutral and polar lipid fatty acids in five families of demersal and pelagic fish from the deep Northwest Atlantic // *ICES Journal of Marine Science.* – Vol. 76, № 6. – P. 1807-1815.
15. Nevezel J.C. Occurrence, function and biosynthesis of wax esters in marine organisms // *Lipids.* – Vol. 5, № 3. – P. 308-319.
16. Sweetman C.J., Sutton T.T., Vecchione M., Latour R.J. Diet composition of *Bathylagus euryops* (Osmeriformes: Bathylagidae) along the northern Mid-Atlantic Ridge // *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers.* – Vol. 92. – P. 107-114.
17. Hochachka P.W., Somero G.N. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution.* N.Y.: Oxford University Press, 466 p.
18. Macdonald A. *Life at high pressure.* Switzerland: Springer International Publishing, 445 p.
19. Lea M.A., Nichols P.D., Wilson G. Fatty acid composition of lipid-rich myctophids and mackerel icefish (*Champsocephalus gunnari*) – Southern Ocean food-web implications // *Polar Biology.* – Vol. 25, № 11. – P. 843–854.
20. Dalsgaard J., St. John M., Kattner G., Muller-Navarra D., Hagen W. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment // *Advances in Marine Biology.* – 2003. – Vol. 46. – P. 225–340.
21. Munschy C., Spitz J., Bely N., Héas-Moisan K., Olivier N., Pollono C., Chauvelon T. A large diversity of organohalogen contaminants reach the meso- and bathypelagic organisms in the Bay of Biscay (northeast Atlantic) // *Marine Pollution Bulletin.* – 2022. – Vol. 184. – Article ID. 114180.
22. Falk-Petersen S., Mayzaud P., Kattner G., Sargent J.R. Lipids and life strategy of Arctic *Calanus* // *Marine Biology Research.* – 2009. – Vol. 5, N. 1. – P. 18-39.
23. Bode M., Hagen W., Schukat A., Teuber L., Fonseca-Batista D., Dehairs F., Auel H.

Feeding strategies of tropical and subtropical calanoid copepods throughout the eastern Atlantic Ocean—Latitudinal and bathymetric aspects // Progress in Oceanography. – 2015. – Vol. 138. – P. 268-282.

Сведения об авторах

Воронин Виктор Петрович

аспирант, м.н.с. лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, Петрозаводск, Россия

Эл. почта: voronen-viktor@mail.ru

Артеменков Дмитрий Владимирович

к.с.-х.н., с.н.с. отдела промысловых беспозвоночных и водорослей ФГБНУ «ВНИРО» Москва, Россия

Эл. почта: artemenkov@vniro.ru

Орлов Алексей Маркович

д.б.н., руководитель лаборатории океанической ихтиофауны ИО РАН, Москва, Россия

Эл. почта: orlov@vniro.ru

Мурзина Светлана Александровна

д.б.н., заведующая лабораторией экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, Москва, Россия

Эл. почта: murzina.svetlana@gmail.com

Information about author

Voronin Viktor

PhD student, Junior researcher of the Ecological Biochemistry Laboratory of the IB of the KarRC RAS, Petrozavodsk, Russian Federation

E-mail: voronen-viktor@mail.ru

Artemenkov Dmitrii

PhD, Senior researcher department of commercial invertebrates and algae of the VNIRO, Moscow, Russian Federation

E-mail: artemenkov@vniro.ru

Orlov Alexei

Doctor of Biological Sciences, head of the laboratory of oceanic ichthyofauna of the IO RAS, Moscow, Russian Federation

E-mail: orlov@vniro.ru

Murzina Svetlana

Doctor of Biological Sciences, head of the Ecological Biochemistry Laboratory of the IB of the KarRC RAS, Petrozavodsk, Russian Federation

E-mail: murzina.svetlana@gmail.com

УДК 577.322
ГРНТИ 31.15
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.147-151

М.А. Семенова¹, Ж.В. Бочкова^{1,2}, О.М. Смирнова¹,
Е.Ю. Паршина², Э.В. Бочаров¹, Н.А. Браже²,
Г.В. Максимов², Д.А. Долгих^{1,3}, Р.В. Черткова¹

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

²Кафедра биофизики, Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

³Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕЙРОГЛОБИНА И ЦИТОХРОМА С

Данная статья посвящена выяснению характера взаимодействия гемсодержащих белков нейроглобина и цитохрома с. Получены данные, свидетельствующие в пользу протекания реакции межмолекулярного переноса электрона, предположительно необходимой для осуществления нейроглобином нейропротекторной функции.

Ключевые слова: нейроглобин, цитохром с, рекомбинантные белки, гемсодержащие белки, глобины, межмолекулярный перенос электрона

M.A. Semenova¹, Z.V. Bochkova^{1,2}, O.M. Smirnova¹, E.Yu. Parshina²,
E.V. Bocharov¹, N.A. Brazhe², G.V. Maksimov², D.A. Dolgikh^{1,3},
R.V. Chertkova¹

¹Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS ²Biophysics Department, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University
³Biological faculty, Lomonosov Moscow State University

THE INTERACTION NATURE OF NEUROGLOBIN AND CYTOCHROME C

The article is devoted to the clarification of the interaction nature of heme-containing proteins neuroglobin and cytochrome c. The obtained data show the intra-molecular electron transfer which is presumably needed for the neuroprotective function of neuroglobin.

Keywords: neuroglobin, cytochrome c, recombinant proteins, heme-containing proteins, globins, intra-molecular electron transfer

Введение

Нейроглобин (Ngb) – гемсодержащий глобиновый белок, преимущественно локализованный в нейрональных клетках [1, с. 520]. Основной функцией Ngb является защита нейронов от клеточной гибели, при этом механизмы нейропротекторной функции Ngb изучены недостаточно [2, с. 2306]. Одним из таких механизмов предположительно является блокирование запуска апоптоза по внутреннему пути за счет взаимодействия с цитохромом *c* (Cyt *c*). Существует две основные гипотезы о характере взаимодействия Ngb и Cyt *c*: взаимодействие, сопряженное с переносом электрона, т.е. с окислительно-восстановительной реакцией (ОВР) между белками [3, с. 4884], и взаимодействие, основанное на электростатическом сближении за счет противоположно заряженных аминокислотных остатков белковых молекул, не сопряженное с переносом электрона [4, с. 105557]. При этом важно отметить, что электростатические взаимодействия между белками могут играть важную роль на этапе сближения молекул белка, предшествующему ОВР. Таким образом, эти гипотезы не являются строго антагонистическими.

Цель работы – определить характер взаимодействия гемсодержащих белков Ngb и Cyt *c*.

Материалы и методы.

Рекомбинантные Ngb [5, с. 327] и Cyt *c* [6, с. 86] получали с использованием бактериальных экспрессионных систем, разработанных ранее в нашей лаборатории. Для того, чтобы определить характер взаимодействия белков использовали методы спектроскопии: инфракрасной (ИК), комбинационного рассеяния (КР) (использовали лазерное возбуждение с длинами волн 532 и 633 нм) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Методы спектроскопии ИК, ЯМР и КР (длина волны возбуждения 633 нм) позволяют выявить конформационные изменения белковых молекул, тогда как метод спектроскопии КР (длина волны возбуждения 532 нм) направлен на выявление конформационных и редокс-изменений простетических групп – гемопорфиринов и их белкового микроокружения. Лиофилизированные белки растворяли в 30 мМ натрий-фосфатном буфере, содержащем 7 мМ ЭДТА, рН 6.5 (ИК и КР), либо в 30 мМ фосфатном буфере, содержащем 20 мМ NaCl, рН 7.0 (ЯМР) до концентрации 0,5 мМ.

Полученные результаты.

Получены спектры ИК, КР и ЯМР изолированных окисленных Ngb и Cyt *c*, а также их смеси в равных концентрациях. Был проведен сравнительный анализ спектров ИК и КР смеси Ngb и Cyt *c*, в результате которого не было выявлено отличий от суммы соответствующих спектров изолированных белков, накопленных по отдельности, при этом некоторые отличия в области с сигналами от аминных и ароматических групп были обнаружены при аналогичном сравнительном анализе ¹H-ЯМР-спектров. Это может быть связано как с большей чувствительностью одного из методов, так и с

использованием несколько отличного буфера, т.к. известно, что ионная сила раствора имеет значительное влияние на электростатические взаимодействия между белками [7, с. 297]. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие между полностью окисленными формами Ngb и Cyt *c* является слабым и в процессе такого взаимодействия не происходит никаких изменений гемовых групп и их белкового микроокружения.

При помощи спектроскопии КР была зарегистрирована ОВР между восстановленным Ngb и окисленным Cyt *c*. Восстановление Cyt *c* было выявлено по появлению на КР-спектрах (длина волны возбуждения 532 нм) реакционной смеси пиков, характерных для восстановленной формы Cyt *c* (300-600 см⁻¹), окисление Ngb было зарегистрировано на КР-спектрах (длина волны возбуждения 633 нм) по пикам в области 490-570 см⁻¹, которые показывают наличие дисульфидных связей, характерных для окисленного Ngb. Согласно нашим данным, ОВР сопровождается движением гема Cyt *c* в гемовой впадине предположительно для облегчения переноса электрона, о чем свидетельствуют интенсивные пики на разностных спектрах в области 600-700 см⁻¹, связанные с колебаниями тиоэфирных связей гема и белковой части Cyt *c*. Также наблюдали пики при 1140 см⁻¹ (колебания метильных радикалов) и 1570-1610 см⁻¹ (колебания метиновых мостиков), которые могут также свидетельствовать в пользу плоской конформации гема. Известно, что такая конформация гема является наиболее благоприятной для переноса электрона [8, с. 133].

Выводы.

Таким образом, с помощью методов спектроскопии комбинационного рассеяния мы показали, что между восстановленным Ngb и окисленным Cyt *c* происходит быстрая реакция переноса электрона, сопровождающаяся подстройкой и конформационными изменениями гема Cyt *c*. При этом слабые электростатические взаимодействия, по видимому, также играют роль на этапе сближения белковых молекул – до переноса электрона. Однако взаимодействие окисленных форм Ngb и Cyt *c*, скорее всего, не имеет физиологической функции и для эффективного блокирования запуска апоптотического каскада необходима ОВР между Ngb и Cyt *c*.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: определен характер взаимодействия между гемсодержащими белками Ngb и Cyt *c* – сближение белковых молекул за счет разницы в поверхностном заряде белковых молекул, после чего следует реакция переноса электрона от Ngb к Cyt *c*, сопровождающаяся движением гема Cyt *c* в гемовой впадине, изменением его конформации из скрученной в плоскую, и образованием дисульфидной связи при окислении Ngb.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00985).

Литература.

1. Burmester T., Weich B., Reinhardt S., Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain // *Nature*. 2000. V. 407. P. 520–523.
2. Brittain T., Kommer J., Aychaudhuri S., Birch N. An Antiapoptotic Neuroprotective Role for Neuroglobin // *Int. J. Mol. Sci.* 2010. V. 11. P. 2306–2321.
3. Fago A., Mathews A.J., Moens L., Dewilde S., Brittain T. The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b5 and cytochrome c // *FEBS Let.* 2006. V. 580. P. 4884–4888.
4. Tiwari P.B., Chapagain P.P., Uren A. Investigating molecular interactions between oxidized neuroglobin and cytochrome c // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 10557.
5. Семенова М.А., Бочкова Ж.В., Смирнова О.М., Игнатова А.А., Паришина Е.Ю., Зиганшин Р.Х., Бочаров Э.В., Браже Н.А., Максимов Г.В., Кирпичников М.П., Долгих Д.А., Черткова Р.В. Разработка системы биосинтеза, выделения и очистки

холоформы рекомбинантного нейроглобина и его физико-химическая характеристика // Биорг. химия. 2023. Т. 3. С. 319–330.

6. Chertkova R.V., Sharonov G.V., Feofanov A.V., Bocharova O.V., Latypov R.F., Chernyakh B.V., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Proapoptotic activity of cytochrome c in living cells: Effect of K72 substitutions and species differences // Mol. Cell. Biochem. 2008. V. 314. P. 85–93.

7. Bonding S.H., Henty K., Dingley A.J., Brittain T. The binding of cytochrome c to neuroglobin: A docking and surface plasmon resonance study // Int. J. Biol. Macromol. 2008. V. 43. P. 295–299.

8. Brazhe N.A., Nikelshparg E.I., Baizhumanov A.A., Grivennikova V.G., Semenova A.A., Novikov S.M., Volkov V.S., Arsenin A.V., Yakubovsky D.I., Evlyukin A.B., Bochkova Z.V., Goodilin E.A., Maksimov G.V., Sosnovtseva O., Rubin A.B. SERS uncovers the link between conformation of cytochrome c heme and mitochondrial membrane potential // Free Radic. Biol. Med. 2023. V. 196. P. 133–144.

Сведения об авторах

Марина Андреевна Семенова

Аспирант, м.н.с.

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

Москва, Россия

Эл. почта: marinaapbch@mail.ru

Жанна Владиславовна Бочкова

Аспирант, м.н.с.

Кафедра биофизики, Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова,

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

Москва, Россия

Эл. почта: zh.bo4kova@yandex.ru

Ольга Михайловна Смирнова

Студент магистратуры, инженер-исследователь

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

Москва, Россия

Эл. почта: olyasmirnova00@mail.ru

Евгения Юрьевна Паршина

К.б.н., с.н.с.

Кафедра биофизики, Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

Москва, Россия

Эл. почта: parshinae@gmail.com

Эдуард Валерьевич Бочаров

К.х.н., с.н.с.

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

Москва, Россия

Эл. почта: edvbon@mail.ru

Надежда Александровна Браже

К.б.н., в.н.с.

Кафедра биофизики, Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

Москва, Россия

Эл. почта: nadiya.brazhe@gmail.com

Георгий Владимирович Максимов

Д.б.н., профессор

Кафедра биофизики, Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

Москва, Россия

Эл. почта: gmaksimov@mail.ru

Information about authors

Marina Andreevna Semenova

PhD student, Junior researcher

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: marinaapbch@mail.ru

Zhanna Vladislavovna Bochkova

PhD student, Junior researcher

Biophysics Department, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: zh.bo4kova@yandex.ru

Olga Mikhailovna Smirnova

Master student, Research engineer

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: olyasmirnova00@mail.ru

Evgenia Yurevna Parshina

PhD (Biol.), Senior researcher

Biophysics Department, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University

Moscow, Russian Federation

E-mail: parshinae@gmail.com

Eduard Valerevich Bocharov

PhD (Chem.), Senior researcher

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: edvbon@mail.ru

Nadezda Aleksandrovna Brazhe

PhD (Biol.), Leading researcher

Biophysics Department, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University

Moscow, Russian Federation

E-mail: nadiya.brazhe@gmail.com

Georgiy Vladimirovich Maksimov

Doctor of Science (Biol.), Professor

Biophysics Department, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University

Moscow, Russian Federation

E-mail: gmaksimov@mail.ru

Дмитрий Александрович Долгих

Д.б.н., профессор, г.н.с.

Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

Москва, Россия

Эл. почта: dolgikh@nmr.ru

Рита Валерьевна Черткова

К.б.н., с.н.с.

Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и

Ю. А. Овчинникова РАН

Москва, Россия

Эл. почта: cherita@inbox.ru

Dmitry Aleksandrovich Dolgikh

Doctor of Science(Biol.), Professor, Chief researcher

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University

Moscow, Russian Federation

E-mail: dolgikh@nmr.ru

Rita Valerevna Chertkova

PhD (Biol.), Senior researcher

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: cherita@inbox.ru

УДК 616-71/-78
ГРНТИ 76.09
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.152-155

Г. И. Кленов, В.С. Хорошков, А. Н. Черных
Национальный исследовательский центр «Курчатов-
ский институт»

АДРОННАЯ ЛУЧЕВАЯ ТЕРАПИЯ В НИЦ «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ

В статье представлен краткий обзор развития протонной лучевой терапии (ПЛТ) в мире. Представлены текущие результаты работы по реализации Федеральной научно – технической программы, утвержденной Правительством РФ в марте 2020 года. Программа предусматривает разработку и запуск двух центров протонной лучевой терапии на базе НИЦ «Курчатовский институт» и НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ.

Ключевые слова: протонная лучевая терапия, протонная онкоофтальмология, комплекс протонной лучевой терапии.

G.I. Klenov, V.S. Khoroshkov, A.N. Chernykh
National Research Centre "Kurchatov Institute"

HADRON BEAM THERAPY AT NRC "KURCHATOV INSTITUTE"

The article provides a brief overview and trends in the development of proton beam therapy (PBT) in the world. The current results of the work on the implementation of the Federal Scientific and Technical Program approved by the Government of the Russian Federation in March 2020 are presented. The program provides for the development and launch of two centers for proton beam therapy on the basis of the National Research Center "Kurchatov Institute" and the National Research Center "Kurchatov Institute" - PNPI.

Key words: proton beam therapy, proton onco-ophthalmology, complex of proton beam therapy.

ВВЕДЕНИЕ.

Адронная (протонная) лучевая терапия (АЛТ) на пути своего развития прошла несколько этапов: экспериментальные исследования и накопление клинических данных, затем, начиная с 1990 г. строительство клинических многокабинных центров протонной лучевой терапии, которое после 2011 г. дополнилось разработками однокабинных комплексов. Накопленные к настоящему времени клинические результаты в ряде случаев показали безальтернативность протонной лучевой терапии для лечения ряда онкологических заболеваний, что позволяет говорить о целесообразности разработки как многокабинных, так и специализированных однокабинных комплексов протонной лучевой терапии. Сегодня протонная лучевая терапия после семидесяти лет своего развития уверенно завоевала свое место в мировом здравоохранении, как высокоэффективный метод лечения онкологических заболеваний. Протонами и ионами углерода уже облучено более 320000 [1] пациентов, и их число продолжает стремительный рост. Однако этот высокотехнологический метод лечения остается эксклюзивным методом, т.к. даже в развитых странах, таких как США, Япония и Европейский Союз число лучевых установок, необходимое для оказания этого вида медицинской помощи населению, еще не достигло целевого значения.

Обычно оценки в потребности в оборудовании для АЛТ выполняются исходя из предположений, что на 5 – 10 миллионов населения целесообразно иметь 1 центр адронной терапии. Однако создаваемые центры могут сильно отличаться друг от друга числом медицинских кабинетов, поэтому, более наглядно делать оценки, опираясь на число медицинских кабинетов, в которых размещаются лучевые установки.

Следует указать, что сегодня в мире действуют 105 центров протонной лучевой терапии и 14 центров ионной лучевой терапии. Кроме того, строятся еще 33 центра и планируется к строительству 30 центров протонной лучевой терапии [1]. В России работают 3 центра ПЛТ из них 2 на оборудовании иностранного производства.

Участие России в создании оборудования для АЛТ и выход с этим оборудованием на рынок хотя и запоздало, но может быть востребовано с учетом политической и экономической обстановки.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Развитие протонной лучевой терапии в НИЦ «Курчатовский институт». Понимая необходимость развития ПЛТ в стране Правительство РФ своим постановлением от 16 марта 2020 г. № 287 поручило НИЦ «Курчатовский институт» создать в рамках будущего Научно-образовательного медицинского центра ядерной медицины (НОМЦ ЯМ) комплекс протонной лучевой терапии (ПЛТ), онкоофтальмологический комплекс ПЛТ а также комплекс ионной лучевой терапии и типовое оборудование для тиражирования подобных комплексов [2,3].

Создание НОМЦ ЯМ на базе НИЦ «Курчатовский институт» должно обеспечить развитие современных центров адронной лучевой терапии в других субъектах Российской Федерации при научной и организационно-методической поддержке НИЦ «Курчатовский институт».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Комплекс протонной лучевой терапии. Создание комплекса протонной лучевой терапии («Луч-Протон»), размещаемого на территории НИЦ «Курчатовский институт», предназначено для многолетних разработок оборудования и технологий ПЛТ новых поколений и подготовки кадров (медицинских физиков и клиницистов).

Концепцией создания комплекса «Луч-Протон» предусмотрена разработка трех основных элементов оборудования – ускоритель с каналами транспортировки протонных пучков в два медицинских кабинета с лучевой установкой гантри для многопольного облучения пациента в положении лежа и лучевая установка с фиксированным в горизонтальной плоскости направлением протонного пучка для облучения пациента как в положении сидя тал и лежа, используя универсальный роботизированный позиционер.

В качестве ускорителя для Комплекса ПЛТ НИЦ «Курчатовский институт» будет разработан протонный синхротрон, позволяющий осуществлять выбор энергии выводимых из него пучков протонов в диапазоне от 70 до 250 МэВ и изменять ее от одного цикла ускорения к другому. Таким образом, вывод протонов не при максимальной, как в циклотроне, а при требуемой для конкретного пациента энергии и высокая эффективность вывода делают протонный синхротрон более удобной машиной в эксплуатации и более безопасной в радиационном смысле.

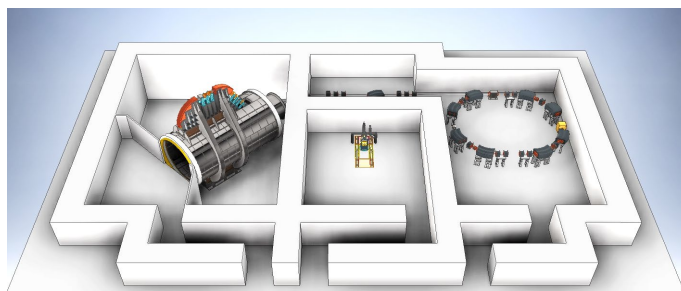


Рис. 2. Двухкабинная конфигурация расположения технологического оборудования Комплекса «Луч-Протон»

Отметим, что гибкая конфигурация Комплекса «Луч-Протон» (рис. 2) предлагает комплексное и настраиваемое решение для ПЛТ, позволяет оснащать как однокабинные, так и многокабинные центры в соответствии с клиническими и исследовательскими задачами. Возможные варианты процедурных кабинетов включают в себя гантри полного (на 360°) поворота протонного пучка, кабинета с фиксированным направлением протонного пучка для проведения терапии пациентов со злокачественными новообразованиями в положении сидя и лежа.

Онкоофтальмологический комплекс протонной лучевой терапии на базе циклотрона Ц-80. Создание онкоофтальмологического комплекса на базе действующего циклотрона Ц-80, размещаемого на территории НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ («ОКО»), предназначено для обеспечения высокотехнологичными средствами лечения пациентов со сложными онкоофтальмологическими заболеваниями Северо-Западного региона России и частично из других регионов страны.

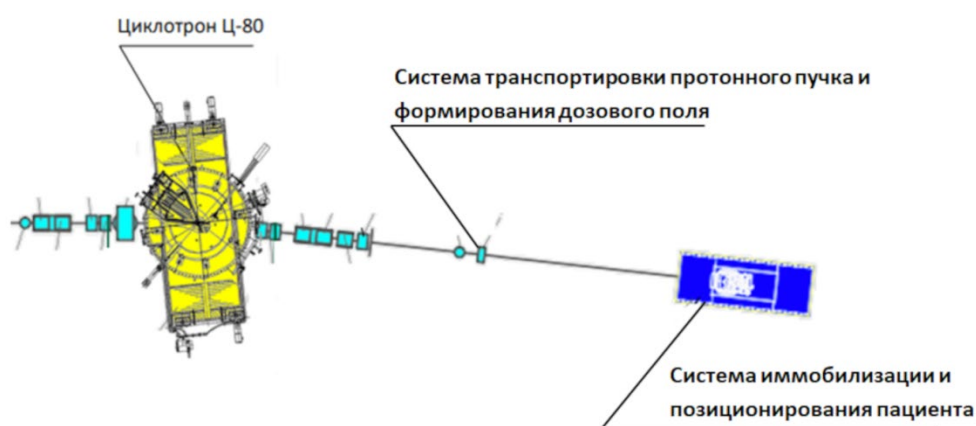


Рис. 3. Конфигурация расположения технологического оборудования проекта «ОКО»

Создаваемый онкоофтальмологический комплекс будет иметь в своем составе следующее новое оборудование и системы:

- инновационное кресло-позиционер с системой управления;
- устройство транспортировки терапевтического протонного пучка от ускорителя к лучевой установке (ЛУ);
- устройства формирования дозового поля;
- система мониторинга пучка и поглощенной дозы;
- система позиционирования пациента;
- программно-аппаратный комплекс (ПАК), интегрированный в автоматизированную систему управления технологическим процессом и лучевой установкой (АСУ ТП и АСУ ЛУ);
- помещение для подготовки пациентов к процедуре.

Предполагаемый план расположения основных узлов технологического оборудования схематически представлен на рис. 2.

В результате реализации проекта северо-западный регион России будет обеспечен высокотехнологичными медицинскими средствами лечения сложных онкоофтальмологических заболеваний: внутриглазных новообразований, новообразований орбиты и придаточного аппарата глаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показано, что в России существуют необходимые условия для того, чтобы обеспечить здравоохранение современным высокотехнологичным оборудованием для адронной лучевой терапии. В НИЦ «Курчатовский институт» в содружестве с ведущими онкологическими учреждениями страны накоплен опыт облучения протонами более 7000 пациентов. В 2012 г. завершен и прошел государственную экспертизу проект Центра протонной лучевой терапии на базе ГКБ им. С.П. Боткина, полностью

выполненный усилиями российских предприятий под научным руководством НИЦ «Курчатовский институт». Проведенные в НИЦ «Курчатовский институт» эскизные проработки онкофтальмологического комплекса протонной лучевой терапии позволили в кратчайшие сроки разработать проект и получить положительное заключение государственной экспертизы, что открывает возможности уже в 2023 г. осуществить физический пуск оборудования, обеспечивающее с высочайшей эффективностью лечение такого сложного заболевания, как меланома глаза. В мае 2023 г. будет разработан и передан в экспертизу проект комплекса протонной лучевой терапии, создаваемый на территории НИЦ «Курчатовский институт». Отработка оборудования комплекса и сопутствующих необходимых технологий позволят создать условия для обеспечения под научным и организационным руководством НИЦ «Курчатовский институт» тиражирование оборудования и внедрить в ближайшие годы созданное оборудование в медицинские учреждения России.

Литература

1. *WWW.PTCOG (Particles Therapy Co-Operative Group), Online 2022.*
2. *<http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202003260022?index=0&rangeSize=1>*
3. *Иванов Е.М., Клёнов Г.И., Максимов В.И., Хорошков В.С., Черных А.Н. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2022. Том 67. № 3.*

Сведения об авторах

Кленов Геннадий Иванович

д.т.н,
зам. нач. отдела
ФГБУ «Национальный исследовательский
Москва, Россия
Эл.почта: gklenov@yandex.ru

Хорошков Владимир Сергеевич

д.т.н,
зам. нач. отдела
ФГБУ «Национальный исследовательский
Москва, Россия
Эл.почта: vskhoroshkov@yandex.ru

Черных Алексей Николаевич

к.т.н,
и.о.нач. отдела
ФГБУ «Национальный исследовательский,
Москва, Россия
Эл.почта: chernykh-aleksey@yandex.ru

Information about authors

Klenov Gennady Ivanovich

Doctor of Technical Sciences,
deputy early department
National Research Centre "Kurchatov institute"
Moscow, Russia
E-mail: gklenov@yandex.ru

Khoroshkov Vladimir Sergeevich

Doctor of Technical Sciences,
deputy early department
National Research Centre "Kurchatov institute"
E-mail: vskhoroshkov@yandex.ru

Chernykh Aleksey Nikolaevich

PHD.
acting head of department National Research Centre
"Kurchatov institute"
Moscow, Russia
E-mail : chernykh-aleksey@yandex.ru

УДК 621.0
ГРНТИ 76.09
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.155-160

**Черных А.Н., Костюченко В.И., Жидков Д.А.,
Красильщиков К.С.**
ФГБУ «Национальный исследовательский Центр
„Курчатовский институт“»

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОГРАММНОГО ПАКЕТА МК TOPAS ПРИ ПРОЕКТИРОВАНИИ СИСТЕМ ФОРМИРОВАНИЯ ДОЗОВЫХ РАСПРЕДЕЛЕНИЙ ДЛЯ КОМПЛЕКСОВ ПРОТОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

В статье рассматриваются возможности использования программного пакета TOPAS, в основу которого заложено моделирование протонного пучка методом Монте

Карло с использованием библиотек GEANT4, для проектных работ по созданию систем формирования дозовых распределений (СФДР), предназначенных для использования в протонной лучевой терапии (ПЛТ). Показано, что в качестве составных частей СФДР могут моделироваться как пассивные, так и динамические элементы. Представлены варианты и проведен оптимизационный анализ различных СФДР, которые могут быть использованы при облучении онкоофтальмологических мишеней.

Ключевые слова: TOPAS, Монте Карло, система формирования дозовых распределений, протонно-лучевая терапия, онкоофтальмология

A.N. Chernykh, V. I. Kostjuchenko, D.A. Zhidkov, K.S. Krasilshchikov
National Research Centre "Kurchatov Institute"

USING MC TOPAS FOR DESIGNING SYSTEMS FOR THE FORMATION OF DOSE DISTRIBUTIONS FOR PROTON RADIATION THERAPY COMPLEXES

Discusses the possibilities of using the MC TOPAS and GEANT4 libraries for design of dose distribution generation systems. It is shown that both passive and dynamic elements can be modeled. Variants of various device that can be used for irradiation in oncophthalmological targets are presented.

Key words: TOPAS, Monte-Carlo method, proton beam therapy (PBT), system of formation of dose distributions, proton-radiation therapy, oncophthalmology.

Введение

Первый курс ПЛТ в России был проведен в ОИЯИ (Дубна) в 1968 году. В СССР работали 3 отечественных центра ПЛТ: в ОИЯИ (Дубна), ИТЭФ (Москва) и ПИЯФ (Гатчина) - в которых к 1991 г. была накоплена треть мирового клинического опыта. К настоящему времени доля суммарного опыта России составляет доли процента при наличии 3-х работающих центров ПЛТ: в С.Петербурге (Медицинский институт Березина Сергея, Elekta, США), в Димитровграде (Федеральный высокотехнологичный центр медицинской радиологии, IBA, Бельгия) и в Обнинске (МРНЦ имени А.Ф. Цыба, Prometheus, РФ). Для сравнения: в мире работает 113 центров, строится 69 (только в США 41 при 14 строящихся). В настоящее время в институтах Курчатовского комплекса (НИЦ "Курчатовский институт", Москва, НИЦ "Курчатовский институт" - ПИЯФ (ФГБУ Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константина) НИЦ "Курчатовский институт", Гатчина) в Гатчине и Москве проектируются два центра ПЛТ. Данная работа проводится в рамках этих проектов и посвящена основному инструментарию, который используется при проектировании СФДР.

Цель работы

Поставлена цель доказать, что найденные и освоенные средства моделирования процесса формирования дозовых распределений с помощью метода Монте-Карло – программный пакет TOPAS - пригодны для проектных работ по созданию СФДР [1]. При этом, в качестве элементов формирования могут моделироваться как пассивные, так и динамические устройства, механические и электромагнитные. По результатам проектирования СФДР для облучения онкоофтальмологических мишеней показано, что в результате моделирования с помощью TOPAS удастся найти решения, удовлетворяющие требованиям технического задания.

Материалы и методы

TOPAS - Tool for Particle Simulation – был создан как дополнение и расширение инструментария Geant4 Simulation Toolkit для того, чтобы упростить для медицинских физиков использование расширенного моделирования методом Монте-Карло всех форм лучевой терапии [2]. В то время как большинство ранних применений TOPAS были в протонной терапии, в настоящее время TOPAS используется во всех областях

исследований лучевой терапии, а также подходит для некоторых медицинских приложений визуализации. Продолжается работа по распространению TOPAS на радиационную биологию и научное образование. Другие потенциальные области применения включают исследования радиационного повреждения электроники, физики элементарных частиц, ядерной физики и астрофизики. TOPAS является лицензированным продуктом и распространяется свободно: в зависимости от статуса потребителя цена его колеблется от 0 до 2500 \$. Статус работы в Курчатовском комплексе над проектом ПЛТ оказался достаточным, чтобы получить лицензию и продукт бесплатно. Всю информацию о TOPAS можно получить на сайте www.topasmc.org. По последним данным лицензированными пользователями являются 2428 человек из 622 учреждений в 67 странах.

После аварии на синхротроне ИТЭФ в 2012 году, которая стала причиной закрытия трехкабинного комплекса ПЛТ, где с 1969 года было пролечено около 4-х с половиной тысяч онкологических больных, основной сферой деятельности коллектива отдела Медицинской Физики стала разработка проектов протонных установок и центров. В настоящее время, уже на площадке Курчатовского Комплекса, разрабатывается учебно-производственный Центр ПЛТ, а также для одного из Институтов этого Комплекса – ПИЯФ им. Константинова (Гатчина), - разрабатывается однокабинная установка с горизонтальным пучком для ПЛТ на базе сверхпроводящего Н-минус циклотрона Ц80. Основное предназначение комплекса ПИЯФ – производство радиофармпрепаратов, чему способствует большая интенсивность пучка (100 мкА). ПЛТ в такой ситуации отводилась второстепенная роль. Однако, благодаря тому, что ускоряемой частицей является Н-минус, специалисты ПИЯФ нашли возможность не просто отдельного вывода пучка в процедурную кабину ПЛТ, но и возможность параллельной работы в обеих кабинах. При этом желательно минимизировать отбираемый для ПЛТ ток, хотя при самых пессимистических вариантах формирования пучка величина отбираемого тока не превысит 1%.

Максимальная энергия выводимого из Ц80 пучка протонов $E=80$ МэВ, что соответствует пробегу 5.2 г/см², поэтому основной локализацией облучаемой мишени должна стать онкоофтальмология. Однако, опыт ИТЭФ подсказывает, что контингент мишеней может быть расширен за счет мишеней орбиты глаза, т.к. 2/3 всех пациентов на горизонтальном пучке с энергией $E=80$ МэВ имели именно такую локализацию опухоли. Кроме того, чтобы при необходимости обеспечить полную загрузку медицинского пучка, проектируемое кресло-позиционер этой установки должно предоставлять возможность облучения других мишеней головы и шеи.

Потенциально, интенсивность Ц80 позволяет использовать этот пучок для радиобиологических исследований в области FLASH-терапии, возможно перспективной в будущем области ПЛТ, при которой облучение должно производиться при мощности дозы порядка 100 Гр/с. Радиобиологические исследования на клетках и животных показали, что при такой мощности дозы повреждения здоровых тканей по пути пучка к мишени уменьшаются.

Исходя из вышесказанного, было принято решение разработать систему формирования дозовых полей с таким расчетом, чтобы имелась потенциальная возможность удовлетворить требованиям, которые предъявляются любым из сценариев:

- дозовые распределения диаметром до 30 мм и глубиной до $3,2$ г/см², с длиной плато модифицированной кривой Брэгга от 5 до 25 мм, с крутыми латеральными и дистальными градиентами – для внутриглазных мишеней;
- с диаметром до 50 мм и возможностью создания поля, конформного облучаемой мишени, - для мишеней орбиты глаза, головы и шеи;
- с мощностью дозы в выводимом в процедурную кабину пучка порядка 100 Гр/с - для исследований в области FLASH-терапии.

Реализации такой программы требует разработки специфических СФДР для каждого из заявленных пунктов.

При отсутствии протонного пучка, основными средствами для достижения поставленной задачи должны стать:

- административный и технический опыт специалистов, вошедших в коллектив проектировщиков, накопленный за более чем полувековой период практической работы в данной области;
- изучение обширной технической литературы;
- правильно подобранные и грамотно освоенные средства моделирования, позволяющие проверять новые идеи и разработки в условиях, воспроизводящих условия экспериментальных исследований на протонном пучке.

Основным таким средством стал программный пакет TOPAS.

Физико-математической основой TOPAS является GEANT4 со всеми его, приложениям, библиотекам и базами данных, созданными в ЦЕРНе. Пользовательский интерфейс TOPAS – параметрическая система, позволяющая настраивать все параметры симуляции Geant4, используя свой, упрощенный от оригинального C++, язык.

Достоинство такого подхода - в заметном упрощении кода без заметного уменьшения гибкости симуляции. Но, в то же время, появляются и сложности – необходимо изучить именно параметрический язык TOPAS. Уже просто для установки и начала работы пользователь должен иметь базовые знания об использовании путей, оболочек и переменных сред в выбранной им операционной системе.

Благодаря относительной простоте TOPAS, его пользователи имеют возможность для расширения языка, направленную на решение определенных задач. Примером может служить скрипт TOPAS-SOBP, написанный на Python и предназначенный для генерации распределенных брегговских пиков с помощью временных функций.

Естественно, подразумеваются базовые знания в ядерной и радиационной физике.

Очень желательны навыки в программировании на языке Python – подавляющее большинство пользователей выкладывают свои наработки, которые можно использовать при решении своих задач, именно на этом языке. Хотя TOPAS обладает достаточно большой библиотекой примеров, они приведены для иллюстрации и в большинстве случаев пользователь должен понять принципы использования, после чего уже приступать к работе, используя эти принципы, но не примеры напрямую.

Как правило, из ускорителя выводится узкий пучок, формируемый с помощью магнитной оптики и транспортируемый в процедурную кабину, где он должен быть трансформирован в объемное дозовое распределение с заданными характеристиками. Например, для облучения онкофтальмологических мишеней это дозовое поле должно иметь равномерное поперечное дозовое распределение диаметром до 30 мм, с глубиной проникновения до 3.2 г/см², с равномерным - $\pm 2.5\%$ - глубинным дозовым плато, длина которого соответствует толщине облучаемой мишени (от 5 до 25 мм). Трансформация узкого – 5 - 7 мм - пучка в такое объемное дозовое распределение осуществляется с помощью СФДР. Способы и соответствующие им средства формирования могут быть различными: от полностью пассивных, смешанных, до полностью активных.

Пассивное формирование осуществляется с помощью *рассеивателей (фольги из материалов с большим Z)*, формирующих равномерное поперечное дозовое распределение; *модификаторов энергетического спектра* типа гребенчатый фильтр (ГФ), формирующих равномерное глубинное распределение с заданной длиной дозового плато; *плоскопараллельных тормозителей*, регулирующих глубину проникновения в облучаемый объект; *болусов*, формирующих дистальную поверхность дозового распределения.

Активное формирование осуществляется сканированием узкого пучка как по площади поперечного сечения поля, так и по глубине проникновения пучка.

В смешанном могут использоваться такие динамические устройства, как «пропеллер» - колесо из нескольких ГФ, вращаемое в плоскости ХУ для формирования глубинного распределения [3], или воблер – электромагнитное устройство для смещения и

вращения пучка вокруг оси Z для формирования равномерного поперечного дозового распределения [4].

Если еще 10 лет назад программы Монте-Карло не использовались при решении динамических задач, то в настоящее время возможности TOPAS позволяют с успехом их решать.

Полученные результаты

Для установки ПЛТ на базе циклотрона Ц80 в ПИЯФ спроектированы СФДР для реализации всех трех заявленных сценариев облучения онкологических мишеней:

- все требования ТЗ на параметры объемного дозового поля для облучения онкоофтальмологических мишеней выполняются при размещении всех элементов формирования на расстоянии не менее 90 см от индивидуальной диафрагмы, определяющей размер и форму поперечного сечения объемного дозового поля. Основное достоинство такого размещения – крутые латеральные градиенты дозового поля даже при удалении мишени на значительное расстояние (типично – 7 см) от диафрагмы, что существенным образом облегчает выведение мишени поле облучения и контроль ее положения во время облучения. При этом, для формирования равномерного поперечного дозового распределения можно использовать как простое рассеяние на фольгах из материала с большим Z (наиболее технологичным является тантал), так и более экономичное формирование с использованием непрозрачного для пучка цилиндра, вырезающего центральную часть этого пучка [4]. Эффективность использования интенсивности при этом может увеличиваться на порядок. Равномерное глубинное распределение с заданной длиной плато в этом случае должно формироваться динамическим модификатором энергетического спектра типа «пропеллер»;

- если основным требованием является требование на конформность дозового поля и облучаемой мишени, показано, что необходимо использовать такие средства формирования, как болус, формирующий дистальную поверхность поля, и 3Д-ГФ [5] для формирования равномерного глубинного распределения и конформной мишени проксимальной поверхности поля. При этом наилучшие результаты достигаются при расположении средств формирования рядом с индивидуальной диафрагмой. Изготовление таких 3Д-ГФ стало технически возможным благодаря развитию 3Д-печати;

- реализация условий проведения FLASH-терапии зависит в первую очередь от ускорителя. На циклотроне Ц80 интенсивность достаточна для достижения необходимой мощности дозы. При этом для оптимизации может использоваться СФДР для конформной терапии, хотя, возможно, сам принцип FLASH-терапии обеспечит такую конформность.

Все результаты проверены моделированием с помощью MC TOPAS. Также успешно проверена возможность моделирования такого устройства, как воблер [6], необходимость использования которого может возникнуть при создании СФДР для онкоофтальмологического пучка в КИ, базирующегося на синхротроне, т.е. при дефиците интенсивности.

Выводы

MC TOPAS является пригодным и удобным инструментом при проектировании систем формирования дозовых распределений, что показано в данной работе. Нет особых сомнений, что возможности его применения для целей развития ПЛТ гораздо шире. Главным его достоинством является то, что наряду с уже достигнутым уровнем развития этого инструмента, благодаря политике его распространения и использования накапливающегося материала, он имеет тенденцию ускоренного расширения и углубления, т.к. к этому привлекаются все больше квалифицированных специалистов со всех частей света.

Заключение

При отсутствии возможности для экспериментальных работ, метод Монте-Карло и такие его инструменты как TOPAS становятся действенным инструментом для виртуальных исследований в разных областях ПЛТ. В данной работе показано практическое применение MC TOPAS для целей проектирования СФДР.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке НИЦ "Курчатовский институт"

Литература

1. Prusator M., Ahmad S., Chen Y. TOPAS Simulation of the Mevion S250 compact proton therapy unit // *J Appl Clin Med Phys*. 2017.
2. Perl J. Shin, J., Schumann J., Faddegon B., Paganetti H. TOPAS: an innovative proton Monte Carlo platform for research and clinical applications// *Med Phys*. 2012 Nov; 39(11):6818-37
3. Bijan S., Romano F., Cirrone A.P., Cuttone G., Hadizadeh M.H., Mowlavi A.A., Raffaele L. Designing a range modulator wheel to spread-out the Bragg peak for a passive proton therapy facility // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. 2016 A 806 p.101–108
4. Yapa J., Resta-L'opeza J., Касперекс А., Schnuerera R., Jollyd S., Boogerte S., Welsch C. Beam characterisation studies of the 62 MeV proton therapy beamline at the Clatterbridge Cancer Centre // *European Journal of Medical Physics* July, 2020,15,
5. Simeonov Y., Weber U., Penchev P., Ringbæk T.P., Schuy C., et al. 3D range-modulator for scanned particle therapy: development Monte Carlo simulations and experimental evaluation// *Phys Med Biol*. 2017. 62(17):7075.
6. Chung K., Kim J., Kim D., Ahn S., Han Y. The Proton Therapy Nozzles at Samsung Medical Center: A Monte Carlo Simulation Study using TOPAS// *arXiv:1503.03133v2 [physics.med-ph]*. 2015. 29 May

Сведения об авторах

Алексей Николаевич Черных

кандидат техн.наук
исп.обяз.начальника отдела
ФГБУ«Национальный исследовательский Центр „Курчатовский институт“»
Москва, Россия
Эл.почта: chernykh-aleksey@yandex.ru

Валерий Иванович Костюченко

зам.начальника лабораторий
ФГБУ«Национальный исследовательский Центр „Курчатовский институт“»
Москва, Россия
Эл.почта: kvi@ya.ru

Дмитрий Алексеевич Жидков

н.с.
ФГБУ«Национальный исследовательский Центр „Курчатовский институт“»
Москва, Россия
Эл.почта: dmtr7114@mail.ru

Красильщиков Константин Сергеевич

лаборант-исследователь
ФГБУ«Национальный исследовательский Центр „Курчатовский институт“»
Москва, Россия
Эл.почта: kopobka.ne@gmail.com

Information about author

Aleksey Nikolaevich Chernykh

c.t.s. acting head of department
National Research Centre "Kurchatov institute"
Moscow, Russia
E-mail : chernykh-aleksey@yandex.ru

Valery Ivanovich Kostjuchenko

deputy head.laboratories National Research Centre "Kurchatov institute"
Moscow, Russia
E-mail: kv-i@ya.ru

Dmitry Alekseevich Zhidkov

research associate
National Research Centre "Kurchatov institute"
Moscow, Russia
Email: dmtr7114@mail.ru

Konstantin Sergeevich Krasilschikov

laboratory assistant-researcher
National Research Centre "Kurchatov institute"
Moscow, Russia
E-mail: kopobka.ne@gmail.com

УДК 535.37, 53.06, 57.084
ГРНТИ 29.31.23, 34.15.05
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.161-169

**А.Б. Коновалов, В.В. Власов, С.И. Самарин,
А.С. Углов**
ФГУП “Российский федеральный ядерный центр –
ВНИИ технической физики
им. академика Е.И. Забабахина”
И.Д. Соловьев, А.П. Савицкий
ФГУ “Федеральный исследовательский центр “Фундамен-
тальные основы биотехнологии РАН”
В.В. Тучин
Саратовский национальный исследовательский государ-
ственный университет им. Н.Г. Чернышевского

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ТОМОГРАФИЯ НА ОСНОВЕ АСИМП- ТОТИЧЕСКОГО ПРИБЛИЖЕНИЯ ФУНКЦИИ ИСТОЧНИКА: ТЕКУЩЕЕ СО- СТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Статья посвящена оригинальному методу время-разрешенной флуоресцентной молекулярной томографии, основанному на использовании асимптотического приближения функции источника флуоресценции. Проанализированы результаты численных и физического экспериментов по верификации метода, полученные авторами статьи за последние 4 года. По результатам анализа сделан вывод о потенциальной перспективности метода и намечены направления дальнейших исследований, направленных на верификацию метода как метода субмиллиметрового пространственного разрешения. В качестве модернизации метода предложен итерационный подход, в рамках которого коэффициент поглощения флуорофора и время жизни флуоресценции реконструируются последовательно с использованием апостериорного знания об объекте, полученного на предыдущих итерациях.

Ключевые слова: флуоресцентная молекулярная томография, коэффициент поглощения флуорофора, время жизни флуоресценции, функция распределения параметров флуоресценции, алгоритм реконструкции.

A.B. Kononov, V.V. Vlasov, S.I. Samarin, A.S. Uglov
FSUE “Russian Federal Nuclear Center – Zababakhin All-Russia Research In-
stitute of Technical Physics”
I.D. Solovyev, A.P. Savitsky
Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Rus-
sian Academy of Science
V.V. Tuchin
Chernyshevsky Saratov State University

ASYMPTOTIC SOURCE FUNCTION APPROXIMATION BASED FLUORESCENCE MOLECULAR TOMOGRAPHY: CURRENT STATUS AND PROSPECTS

The paper is devoted to an original method of time-resolved fluorescence molecular tomography based on asymptotic approximation to the fluorescence source function. It analyzes results the authors have obtained during last 4 years in their testing the method in numerical and physical experiments. The method is inferred to be quite promising and directions of further research for its verification as a sub-millimeter resolution method are outlined. As a modernization of the method, the authors propose an iterative approach where the fluorophore absorption coefficient and fluorescence lifetime are reconstructed successively using a posteriori knowledge on the object from previous iterations.

Keywords: fluorescence molecular tomography, fluorophore absorption coefficient, fluorescence lifetime, fluorescence parameter distribution function, reconstruction algorithm.

Введение

В последние годы флуоресцентная молекулярная томография (fluorescence molecular tomography, FMT) [1] получила широкое распространение как метод молекулярного

имиджинга мелких лабораторных животных, применяемый для решения задач экспериментальной онкологии, таких как выяснение механизмов канцерогенеза, действия лекарственных препаратов, подбор стратегии лечения различных видов опухолей. Информативным параметром, который представляет особый интерес для исследователей, является время жизни флуоресценции. Этот параметр является наиболее чувствительным к изменениям молекулярного окружения флуоресцентных биосенсоров и позволяет получить важную информацию о пространственно-временных характеристиках процессов, происходящих в клетках и молекулах тканей животных [2]. Современные методы время-разрешенной FMT времени жизни (fluorescence molecular lifetime tomography, FMLT) испытывают трудности с работой непосредственно во временном домене. Обычно выполняется переход из временного домена в частотный домен [3], либо применяются медленные нелинейные методы реконструкции [4]. Это связано с тем, что во временном домене зависимость функции источника флуоресценции от времени жизни имеет очень сложный вид, не позволяющий построить эффективную линейную модель реконструкции. В период с 2019 по 2023 годы нами разработан и частично исследован оригинальный метод время-разрешенной FMLT [5-8], позволяющий решить вышеуказанную проблему. Метод основан на использовании асимптотического приближения функции источника флуоресценции и состоит из двух основных этапов. На первом этапе формулируется и решается во временном домене линейная обратная задача FMT относительно обобщенной функции распределения параметров флуоресценции (fluorescence parameter distribution function, FPDF) простого вида, включающей пространственные распределения коэффициента поглощения флуорофора и времени жизни флуоресценции. На втором этапе выполняется разделение распределений параметров также во временном домене. Несмотря на то, что метод является приближенным, он позволил получить вполне обнадеживающие результаты и показал, что готов составить конкуренцию другим методам время-разрешенной FMLT. Так, например, в [6] на уровне численного эксперимента показано, что с помощью нашего метода можно получить пространственное разрешение 100 мкм даже, если использовать только макроскопический режим регистрации данных и не использовать мезоскопический режим. Эта цифра является вполне конкурентоспособной и внушает определенный оптимизм на будущее. Однако следует признать, что на данном этапе полученные нами результаты носят предварительный характер, условия проведения экспериментов нуждаются в улучшении, а сам метод – в дальнейшем исследовании, верификации на уровне экспериментов с фантомами и лабораторными животными, а также, вероятно, модернизации. В такой ситуации мы сочли целесообразным и необходимым уделить особое внимание скрупулёзному анализу полученных в [5-8] результатов, на его основании попробовать реально оценить потенциал и перспективы метода и наметить дальнейшие пути исследования. Таким образом, настоящая статья посвящена обзору и анализу результатов, полученных с использованием нового метода FMLT, а также оценке его перспектив на будущее.

Краткое описание метода FMLT

Наш метод FMLT ориентирован на геометрию обратного рассеяния и использование рано пришедших диффузных фотонов, соответствующих переднему фронту регистрируемого время-разрешенного сигнала флуоресценции. Именно для таких фотонов, как это показано в [6], справедливо асимптотическое приближение функции источника флуоресценции.

Согласно нашему методу модель реконструкции FPDF (первый этап) описывается линейным интегральным уравнением Фредгольма 1-го рода

$$\Gamma^f(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t) = \int_V f(\mathbf{r}) W_f(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \mathbf{r}, t) d^3r, \quad (1)$$

где $\Gamma^f(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t)$ – время-разрешенный сигнал флуоресценции, возбуждаемой мгновенным источником, испускающим пикосекундный импульс из точки \mathbf{r}_s в момент времени $t_s = 0$, который регистрируется на границе среды в точке \mathbf{r}_d в момент времени t , $f(\mathbf{r})$ – искомая FPDF, $W_f(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, \mathbf{r}, t)$ – функция чувствительности, отвечающая за реконструкцию FPDF. Для функции $f(\mathbf{r})$ справедливо [5-8]

$$f(\mathbf{r}) = \frac{4Dc\gamma\mu_{af}(\mathbf{r})}{\tau(\mathbf{r})v^2 + 4Dc}, \quad (2)$$

где D и c – коэффициент диффузии и скорость света в среде на длине волны возбуждающего излучения, γ – квантовый выход флуоресценции, $\mu_{af}(\mathbf{r})$ и $\tau(\mathbf{r})$ – пространственные распределения коэффициента поглощения флуорофора и времени жизни флуоресценции, v – средняя скорость движения центра масс мгновенного распределения фотонов вдоль их средней траектории [9].

Обратная задача относительно FPDF в соответствии с моделью (1) ставится стандартным образом (см., например, [1]) и сводится к решению системы линейных алгебраических уравнений

$$\mathbf{W}\mathbf{f} = \mathbf{g}, \quad (3)$$

где \mathbf{W} – матрица чувствительности, в которую записываются функции чувствительности, рассчитанные для всех участвующих в реконструкции связей источник-детектор (далее ИД-связи); \mathbf{f} – вектор, элементы которого определяют искомую функцию $f(\mathbf{r})$ в вокселях трехмерной регулярной сетки; \mathbf{g} – вектор, элементы которого представляют собой измерительные данные, извлеченные из измеренных сигналов $\Gamma^f(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d, t)$.

Для обращения системы (3) мы использовали различные итерационные алгоритмы, базирующиеся на стандартном алгебраическом алгоритме реконструкции (algebraic reconstruction technique, ART) [10]. В [5] ART итерации сочетались с регуляризацией посредством минимизации нормы полной вариации (ART with total variation (TV) regularization, ART-TV) [11]. В [6] кроме ART-TV мы применяли также ART с ускоренной мягкой пороговой фильтрацией (ART with fast iterative shrinkage thresholding, ART-FIST) [12]. Наконец, в [7] был апробирован гибридный алгоритм, сочетающий ART и с ускоренной мягкой пороговой фильтрацией, и с TV-регуляризацией (ART with fast iterative shrinkage thresholding and TV-regularization, ART-FIST-TV).

Для того чтобы иметь возможность разделить распределения $\mu_{af}(\mathbf{r})$ и $\tau(\mathbf{r})$ (второй этап), функцию $f(\mathbf{r})$ необходимо реконструировать для нескольких различных значений средней скорости $v: v_1, \dots, v_N$. Тогда искомые распределения мы получим, решая систему

$$\begin{pmatrix} 4Dc\gamma & -f_1(\mathbf{r})v_1^2 \\ \vdots & \vdots \\ 4Dc\gamma & -f_N(\mathbf{r})v_N^2 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} \mu_{af}(\mathbf{r}) \\ \tau(\mathbf{r}) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 4Dcf_1(\mathbf{r}) \\ \vdots \\ 4Dcf_N(\mathbf{r}) \end{pmatrix}. \quad (4)$$

В [5] мы выбирали $N = 2$ и пытались решить определенную систему. Однако эта попытка не увенчалась успехом (см. раздел “Результаты численных экспериментов”). В [7] строилась и решалась переопределенная система ($N = 3$), для чего применялся алгоритм наименьших квадратов с QR-факторизацией [13].

Результаты численных экспериментов

В [5] и [6] описаны два численных эксперимента по реконструкции рассеивающих свет фантомов с двумя шарообразными флуоресцентными включениями, образующими периодические структуры. В эксперименте [5] область реконструкции составляла $11 \times 11 \times 8 \text{ мм}^3$, а в эксперименте [6] – $20 \times 20 \times 10 \text{ мм}^3$. В обоих случаях мы полагали, что свет подводится к объекту и отводится от него с помощью некоторого виртуального оптоволоконного зонда. В [5] зонд имел квадратное сечение размером $11 \times 11 \text{ мм}^2$, в котором располагались возбуждающие флуоресценцию волокна (221) и собирающие свет волокна (220) в шахматном порядке. Полагалось, что зонд плотно примыкает к объекту и не меняет своего положения. В численном эксперименте [6] зонд круглого сечения имел одно возбуждающее волокно в центре и 24 собирающих волокон, 12 из которых располагались на периметре окружности радиусом 8 мм, а 12 других – на периметре окружности радиусом 10 мм. При этом полагалось, что зонд должен перемещаться и сканировать область размером $20 \times 20 \text{ мм}^2$. В обоих численных экспериментах мы ориентировались на макроскопический режим регистрации данных. Поэтому в [5] при реконструкции учитывались только ИД-связи, для которых расстояние между источником и детектором было больше равно 8 мм. Видимо, по этой причине, несмотря на формально большое количество источников и детекторов, были получены некорректные реконструкции, на которых изображения флуоресцентных включений аномально вытягивались вдоль направления z , перпендикулярного плоскости ввода и вывода света. Иначе говоря, имела место деградация пространственного разрешения вдоль данного направления. Подобного эффекта нам удалось избежать в [6], используя геометрию сканирования. В [6] восстанавливались флуоресцентные включения малого размера (500, 200 и 100 мкм) и были получены весьма обнадеживающие результаты. На рисунке 1 представлен фрагмент 3D реконструкции с включениями диаметром 100 мкм (слева), а также его 2D сечения: z - и y - срезы (в центре и справа соответственно).

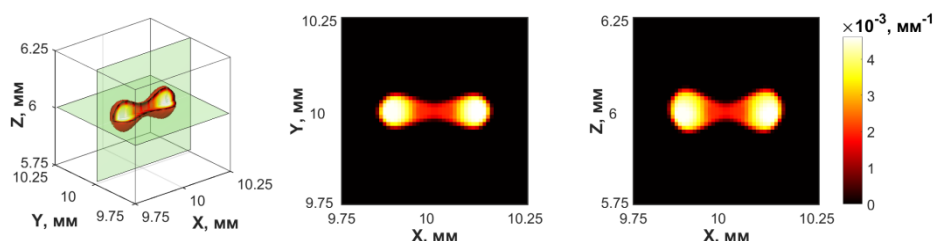


Рисунок 1 – Фрагмент реконструкции с флуоресцентными включениями диаметром 100 мкм

Из рисунка 1 видно, что визуально периодические структуры разрешаются друг относительно друга. Коэффициент передачи модуляции, который мы оценили как относительную глубину провала между двумя максимумами интенсивности [9], равен приблизительно 40%. Это означает, что и количественно в соответствии с критерием Фуко-Релея имеет место надежное разрешение структур. Заметим, что представленный на рисунке 1 результат получен с использованием оригинального алгоритма ART-FIST, предложенного нами в [6]. С помощью же алгоритма ART-TV [11], который также исследовался, разрешить включения диаметром 100 мкм не получилось.

В [5] была сделана попытка разделить параметры флуоресценции. К сожалению, полученные изображения оставили желать лучшего. При разделении мы обращали определенную систему, а такой подход очень чувствителен к ошибкам при реконструкции FPDF. Забегая вперед, можно заметить, что в [7] мы решили эту проблему посредством перехода к переопределенной системе и применению для ее решения метода наименьших квадратов с регуляризацией. В [6] разделение параметров флуоресценции не выполнялось. Изображения, представленные на рисунке 1, визуализируют распределение коэффициента поглощения флуорофора, восстановленное для выбранного постоянного значения времени жизни.

Результаты физического эксперимента

Эксперимент [7] проводился в ФГУ “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии РАН”. Экспериментальная установка была сконструирована на основе системы счета одиночных фотонов с корреляционной обработкой во времени (TCSPC) компании Becker & Hickl GmbH (Берлин, Германия). Для возбуждения флуоресценции использовали импульсный лазер суперконтинум SC-450-6 компании Fianium (Саутгемптон, Англия). Регистрация время-разрешенных сигналов флуоресценции выполнялась в геометрии обратного рассеяния с помощью трехканального оптоволоконного зонда, в котором четыре волокна закреплены линейно с межосевым расстоянием 1,1 мм. Первое волокно использовалось для ввода возбуждающего пучка света, последующие три волокна – для регистрации. Таким образом, мы имели в наличии всего три расстояния между источником и детектором: 1,1; 2,2 и 3,3 мм. В качестве фантома использовался параллелепипед размером $33 \times 40 \times 15$ мм³ из однородного имитирующего биологические ткани материала INO Biomimic. Фантом имел цилиндрическое отверстие радиусом 1,5 мм, в которое помещался флуоресцирующий раствор Cu5. Зонд перемещался по поверхности фантома с шагом 0,5 мм с помощью микрометрической подвижки. Размер области сканирования составил 9×9 мм². Поскольку использовался мезоскопический режим, функции чувствительности рассчитывались не аналитически как в [5] и [6], а с помощью метода Монте-Карло, для чего был разработан специальный код **TurbidMC** [8].

Несмотря на неоптимальную геометрию, нам удалось подобрать верную стратегию формирования массивов измерительных данных и матриц чувствительности. Она заключалась в выборе для реконструкции FPDF не одного, а нескольких временных отсчетов каждого измеренного время-разрешенного сигнала с тем, чтобы компенсировать сильную недостаточность данных. В результате нам удалось вполне адекватно восстановить FPDF, и даже выполнить корректное разделение распределений коэффициента поглощения флуорофора и времени жизни флуоресценции (см. рисунок 2) посредством построения и решения переопределенной системы (4).

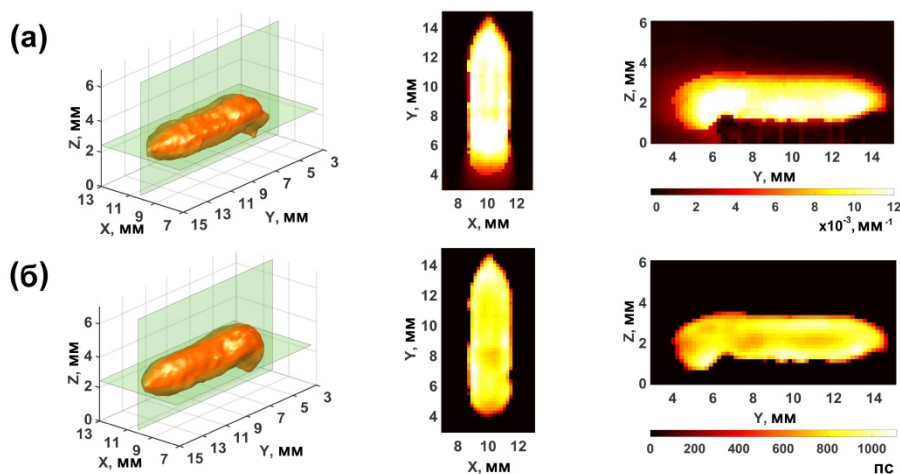


Рисунок 2 – Результат разделения распределений параметров флуоресценции: (а) коэффициент поглощения флуорофора, (б) – время жизни флуоресценции

В процессе обработки данных эксперимента [7] выяснилось, что точность нашего метода во многом (в большей степени, чем этого бы хотелось) зависит от доступности априорной информации об объекте. Оказалось, что крайне важно правильно выбрать начальные приближения оптических и флуоресцентных параметров, а также желательно учитывать место локализации флуорофора при расчете функций чувствительности. В такой ситуации возникла идея модернизировать метод таким образом, чтобы иметь возможность часть необходимой информации получать апостериорно в процессе реконструкции. Краткое изложение идеи дано в разделе “Анализ и обсуждение результатов”.

Заметим, что в [7] фантом не был предназначен для тестирования пространственного разрешения, подобно численным объектам, реконструированным в [5] и [6], поэтому на уровне физического эксперимента метод не был верифицирован как метод субмиллиметрового разрешения. Это также необходимо учесть при планировании дальнейших экспериментов.

Наконец, в [8] мы сравнили результаты моделирования время-разрешенных сигналов флуоресценции с экспериментальными импульсами, измеренными в [7], и получили очень хорошее совпадение. Это навело на мысль в дальнейшем использовать модельные данные для калибровки процедуры реконструкции, в частности, определения начала отсчетов времен задержки детекторов t .

Анализ и обсуждение результатов

Сравнивая геометрии регистрации данных в [5], [6] и [7], следует отметить, следующее. Геометрия сканирования [6] вряд ли подходит для практического воплощения. Для ее реализации требуется сканирующее устройство. Кроме того, она не рассматривает “короткие” ИД-связи, свойственные мезоскопическому режиму, и могут возникнуть проблемы с точностью воспроизведения структур на малых глубинах (менее 3 мм). Геометрия физического эксперимента [7], напротив, имеет очень ограниченную номенклатуру расстояний между источником и детектором мезоскопического диапазона. В этом случае методу может не хватить глубинной чувствительности. Как ни удивительно, предпочтение хотелось бы отдать геометрии [5]. На данном этапе исследований она не раскрыла свой потенциал, поскольку не были задействованы “короткие” ИД-связи. В действительности же она представляет собой геометрию, характерную для диффузионной оптической томографии высокой плотности (high density diffuse optical tomography, HD-DOT), которая с успехом применяется в нейробиодиагностике [14]. Таким образом, в дальнейших экспериментах следует сочетать макро- и мезо- режимы регистрации, выбирать геометрию с многочисленными перекрестными ИД-связями, охватывающими большой диапазон расстояний источник-детектор (0,5 – 12 мм).

Об идее модернизации метода. Апостериорная информация об оптических параметрах может быть получена методом HD-DOT [14]. Для реконструкции параметров флуоресценции предлагается итерационный подход с последовательным приближением коэффициента поглощения флуорофора и времени жизни флуоресценции и использованием апостериорной информации, полученной на предыдущих итерациях. При этом уже на первой итерации будет оценено место локализации флуорофора, что требуется для корректного расчета функций чувствительности. Важно, что итерационный подход избавит от процедуры разделения параметров, которая, как выяснилось, очень чувствительна к ошибкам реконструкции FPDF.

Важной характеристикой метода является его глубинная чувствительность. В [6] исследованы глубины до 9 мм. В [7] глубина залегания флуорофора – менее 4 мм. Реально же интерес представляют глубины до 20 мм включительно. Поэтому имеет смысл рассмотреть вопрос о возможности искусственного увеличения диапазона исследуемых глубин. Полагаем, что для этой цели могут быть использованы методы оптического просветления ткани [15], которые уже широко применяются в оптической микроскопии.

Заключение

В данной работе представлен скрупулезный анализ результатов, полученных авторами в рамках исследования оригинального метода время-разрешенной флуоресцентной молекулярной томографии, основанного на асимптотическом приближении функции источника флуоресценции. Авторы считают, что представленный анализ, безусловно, носит новаторский характер, поскольку он позволил не только вскрыть недостатки предыдущего этапа работ, но и сгенерировать новые идеи, наметить конкретные направления дальнейших исследований метода на уровне экспериментов с фантомами и лабораторными животными. По результатам проведенного анализа следует

заклучить, что метод сохраняет реальную надежду на то, что он будет верифицирован как метод субмиллиметрового пространственного разрешения и высокой глубинной чувствительности и найдет практическое применение в экспериментальной онкологии. Для этого, безусловно, необходимо продолжить исследования. К числу направлений дальнейших исследований нужно отнести следующие:

1. В дальнейших экспериментах целесообразно сочетать макро- и мезо- режимы регистрации данных и ориентироваться на геометрию типа HD-DOT с большим диапазоном расстояний источник-детектор.
2. Следует реализовать и исследовать итерационную версию метода, в рамках которой коэффициент поглощения флуорофора и время жизни флуоресценции будут восстанавливаться последовательно с использованием априорной информации, полученной на предыдущих итерациях.
3. С целью верификации метода как метода субмиллиметрового пространственного разрешения необходимо поставить и провести физический эксперимент по реконструкции фантома с флуоресцентными включениями, образующими периодические пространственные структуры.
4. Следует поставить и провести численный и физический эксперименты по оценке влияния эффекта просветления ткани на точность воспроизведения структур на различных глубинах.
5. Ближайшей задачей авторов является также переход от экспериментов с фантомами к экспериментам с лабораторными животными.

Литература

1. Darne C., Lu Y., Sevick-Muraca E.M. *Small animal fluorescence and bioluminescence tomography: a review of approaches, algorithms and technology update // Physics in Medicine and Biology*. 2014. No. 59(1). P. R1-R64.
2. Datta P., Heaster T.M., Sharick J.T., Gillette A.A., Skala M.C. *Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications // Journal Biomedical Optics*. 2020. No. 25(7). P. 071203.
3. Nothdurft R.E., Patwardhan S.V., Akers W., Ye Y.-P., Achilefu S., Culver J.P. *In vivo fluorescence lifetime tomography // Journal of Biomedical Optics*. 2009. No 14(2). P. 024004.
4. Cai C., Cai W., Cheng J., Yang Y., Luo J. *Self-guided reconstruction for time-domain fluorescence molecular lifetime tomography // Journal of Biomedical Optics*. 2016. No. 21(12), P. 126012.
5. Konovalov A.B., Vlasov V.V. *A new method for separate reconstruction of fluorophore absorption and fluorescence lifetime in time domain: first results of a numerical experiment // Proceedings of SPIE*. 2020. V. 11457. P. 1145703.
6. Konovalov A.B., Vlasov V.V., Uglov A.S. *Early-photon reflectance fluorescence molecular tomography for small animal imaging: Mathematical model and numerical experiment // International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*. 2021. No. 37(1). P. e3408.
7. Konovalov A.B., Vlasov V.V., Samarin S.I., Soloviev I.D., Savitsky A.P., Tuchin V.V. *Reconstruction of fluorophore absorption and fluorescence lifetime using early photon mesoscopic fluorescence molecular tomography: a phantom study // Journal of Biomedical Optics*. 2022. No. 27(12). P. 126001.
8. Самарин С.И., Коновалов А.Б., Власов В.В., Соловьев И.Д., Савицкий А.П., Тучин В.В. *Основанное на методе Монте-Карло моделирование временных функций рассеяния точки и функций чувствительности для мезоскопической время-разрешенной флуоресцентной молекулярной томографии // Компьютерная оптика*. 2023. В печати.
9. Konovalov A.B., Vlasov V.V., Lyubimov V.V. *Statistical characteristics of photon distributions in a semi-infinite turbid medium: Analytical expressions and their application to*

- optical tomography // Optik – International Journal for Light and Electron Optics. 2013. No. 124(23). P. 6000-6008.*
10. Gordon R., Bender R., Herman G.T. Algebraic reconstruction techniques (ART) for three-dimensional electron microscopy and X-ray photography // *Journal of Theoretical Biology. 1970. No. 29(3). P. 471-482.*
 11. Yu H., Wang G. Compressed sensing based interior tomography // *Physics in Medicine and Biology. 2009. No. 54(9). P. 2791-2805.*
 12. Beck A., Teboulle M. A fast iterative shrinkage-thresholding algorithm for linear inverse problems // *SIAM Journal on Imaging Sciences. 2009. No. 2(1). P. 183-202.*
 13. Paige C.C., Sanders M.A. LSQR: An algorithm for sparse linear equations and sparse least squares // *ACM Transaction on Mathematical Software. 1982. No. 8(1). P. 43-71.*
 14. Wheelock M.D., Culver J.P., Eggebrecht A.T. High-density diffuse optical tomography for imaging human brain function // *Review of Scientific Instruments. 2019. No. 90(5). P. 051101.*
 15. Sdobnov A.Yu., Darvin M.E., Genina E.A., Bashkatov A.N., Lademann J., Tuchin V.V. Recent progress in tissue optical clearing for spectroscopic application // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2018. V. 197. P. 216-229.*

Сведения об авторах

Александр Борисович Коновалов

к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник
ФГУП “Российский федеральный ядерный центр –
ВНИИ технической физики им. академика Е.И.
Забабихина”

Снежинск, Россия

Эл. почта: a_konov@mail.vega-int.ru

Виталий Викторович Власов

руководитель лаборатории
ФГУП “Российский федеральный ядерный центр –
ВНИИ технической физики им. академика Е.И.
Забабихина”

Снежинск, Россия

Эл. почта: vitaly.vlasov.v@yandex.ru

Сергей Иванович Самарин

к.ф.-м.н., руководитель лаборатории
ФГУП “Российский федеральный ядерный центр –
ВНИИ технической физики им. академика Е.И.
Забабихина”

Снежинск, Россия

Эл. почта: samarine@mail.ru

Александр Сергеевич Углов

старший научный сотрудник
ФГУП “Российский федеральный ядерный центр –
ВНИИ технической физики им. академика Е.И.
Забабихина”

Снежинск, Россия

Эл. почта: a.s.uglov@vniitf.ru

Илья Дмитриевич Соловьев

к.х.н., младший научный сотрудник
ФГУ “Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии РАН”
Москва, Россия

Эл. почта: gungnier@gmail.com

Александр Павлович Савицкий

д.х.н., профессор, заведующий лабораторией
ФГУ “Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии РАН”
Москва, Россия

Эл. почта: apsavitsky@inbi.ras.ru

Information about author

Alexander Borisovich Kononov

PhD (Phys), Leading Scientist
FSUE “Russian Federal Nuclear Center – Zaba-
bakhin All-Russia Research Institute of Technical
Physics”

Snezhinsk, Russian Federation

E-mail: a_konov@mail.vega-int.ru

Vitaly Viktorovich Vlasov

Head of Laboratory
FSUE “Russian Federal Nuclear Center – Zaba-
bakhin All-Russia Research Institute of Technical
Physics”

Snezhinsk, Russian Federation

E-mail: vitaly.vlasov.v@yandex.ru

Sergei Ivanovich Samarin

PhD (Phys), Head of Laboratory
FSUE “Russian Federal Nuclear Center – Zaba-
bakhin All-Russia Research Institute of Technical
Physics”

Snezhinsk, Russian Federation

E-mail: samarine@mail.ru

Alexander Sergeevich Uglov

Senior Researcher
FSUE “Russian Federal Nuclear Center – Zaba-
bakhin All-Russia Research Institute of Technical
Physics”

Snezhinsk, Russian Federation

E-mail: a.s.uglov@vniitf.ru

Ilya Dmitrievich Solovyev

PhD (Chem), Junior Researcher
Bach Institute of Biochemistry, Research Center of
Biotechnology of the Russian Academy of Science
Moscow, Russian Federation

E-mail: gungnier@gmail.com

Alexander Pavlovich Savitsky

Doctor of Science (Chem), Professor, Head of Labor-
atory
Bach Institute of Biochemistry, Research Center of
Biotechnology of the Russian Academy of Science
Moscow, Russian Federation

E-mail: apsavitsky@inbi.ras.ru

Валерий Викторович Тучин

д.ф-м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой
Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
Саратов, Россия
Эл. почта: tuchinvv@mail.ru

Valery Victorovich Tuchin

Doctor of Science (Phys), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Science
Chernyshevsky Saratov State University
Saratov, Russian Federation
E-mail: tuchinvv@mail.ru

УДК 608; 615.849.12; 616.831-006
ГРНТИ 76.13.19
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.169-173

Л.Г. Ваганян, В.Н. Вербенко, Н.А. Кузора,
В.И. Максимов, Ф.А. Пак, А.И. Халиков
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П.
Константинова НИЦ «Курчатовский институт»
<http://www.pnpi.nrcki.ru/>

PROTOPLAN: СИСТЕМА ДОЗИМЕТРИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ

В статье представлены основные возможности и характерные особенности цифровой системы для дозно-анатомического планирования стереотаксической радиохирургии (SRS) методом напролёт узким пучком протонов СЦ-1000, имеющим энергию 1 ГэВ. Разработка направлена на преодоление недостатков технических решений, существовавших в ПИЯФ и определение вектора дальнейшего развития SRS.

Ключевые слова: система планирования лечения, гарантия качества лучевой терапии, протонная стереотаксическая радиохирургия.

L.G. Vaganyan, V.N. Verbenko, N.A. Kuzora, V.I. Maksimov,
F.A. Pak, A.I. Khalikov
Petersburg nuclear physics institute of the NRC "Kurchatov institute"
<http://www.pnpi.nrcki.ru/en/>

PROTOPLAN: A DOSIMETRIC PLANNING SYSTEM

The article presents the main capabilities and characteristic features of a digital system for dose-anatomical planning of stereotactic radiosurgery (SRS) by the on through-method with a narrow proton beam of SC-1000 having an energy of 1 GeV. The development overcomes the shortcomings of technical solutions that existed in the PNPI and determines the vector of further development of SRS.

Keywords: treatment planning system, radiation therapy quality assurance, proton stereotactic radiosurgery.

Введение.

Стереотаксическая радиохирургия (SRS) протонами применяется в основном для глубокозалегающих малоразмерных новообразований, локализованных в головном мозге. С энергией частиц 1 ГэВ она является уникальным методом лучевой терапии. В частности, в годы становления протонной терапии в мире методика SRS протонами, проходящими напролёт, была реализована в Беркли [1, с. 146]. В России клинический опыт применения узких высокоэнергетических протонов [2, с. 10-17] является единственным и получен с использованием терапевтического канала синхроциклотрона СЦ-1000 Петербургского института ядерной физики (ПИЯФ, г. Гатчина).

В ходе проведения стереотаксического облучения внутричерепных мишеней до 2 см³ малый размер пучка при наведении (в соответствии с клиническим планом полная ширина на половине высоты может составлять от 5 до 10 мм) и высокий краевой градиент при расчёте поглощённой дозы в области интереса требуют безукоризненной точности.

Компьютерное планирование и прогнозирование радиотерапевтической дозы – эффективный подход, введённый мировыми стандартами в подготовительный этап лучевой терапии онкологических заболеваний и подтверждающий безопасность и надёжность проведения сеансов до облучения. Расчёт дозовой нагрузки вручную на сегодня считается устаревшей методикой и экспериментальные данные в основном используются только для верификации дозы. Готовые пакеты программ не подходят для имитации применения протонов с фиксированной энергией 1 ГэВ на терапевтической установке ПИЯФ.

Цель работы.

В соответствии с необходимостью обновления методики планирования [3, с. 82] была поставлена цель разработать программное обеспечение (ПО), в котором будут учтены: энергия, размер, профиль и углы сходимости и расходимости протонного пучка СЦ-1000; изменение линейной передачи энергии по траектории; отсутствие у медицинского протонного комплекса системы гантри; облучение напролёт по методике перекрёстного (изоцентрического) облучения; осуществление ротаций элементов терапевтической установки (перемещения на заданные углы с возможностью задания скорости движения элементов установки); рассеяние в облучаемом объекте и «размытие» распределения дозы за счёт вклада рождающихся в процессе взаимодействия протонов с биологическими тканями вторичных частиц и ядер отдачи.

Материалы и методы.

Разработанная система цифрового дозно-анатомического планирования (СДАП) [4, с. 275] названа ProtoPlan и работает в 3D-режиме. Основу ProtoPlan составляют стандартные типы модулей и инструментов: регистрации изображений медицинской интроскопии, определения зон интереса, внесения или вычисления данных о параметрах медицинского протонного комплекса, расчёта и отображения трёхмерного распределения дозы по отношению к анатомии пациента, оценки плана, оптимизации распределения доз, документирования утверждённых планов, архивирования. Стандартный функционал продиктован международными рекомендациями и руководящими принципами ICRU, IAEA, AAPM, ACR-ASTRO, QUANTEC и другими. Существенно ProtoPlan отличается от других систем планирования вследствие конструктивных характеристик СЦ-1000, методики радиотерапии и технических характеристик терапевтической установки, техники доставки излучения и параметров пучка.

«Медицинский» пучок протонов СЦ-1000 [5, с. 424-432] имеет малое поперечное сечение и строго прямолинейно распространяется в тканях, вследствие чего осуществляет равномерную ионизацию вдоль траектории. Угловая расходимость пучка при проведении сеанса протонной терапии намного меньше, чем при радиотерапии методом пика Брэгга, что упрощает планирование лечения. Профиль релятивистского протонного пучка стабильный, подчиняется закону распределения Гаусса и обеспечивает очень чёткие контуры дозы, позволяющие сохранить критически важные структуры.

Формирование дозного распределения осуществляется магнитно-оптическим методом, при этом пучок на входе в объект и на выходе из объекта облучения сохраняет свои размеры и не создаёт ореола дозы, не уменьшает градиент дозы между целевым объёмом и органами риска, имеет слабое боковое рассеяние. Стандартные системы типа гантри, технология которых заключается в том, что источник вращается вокруг пациента, не могут быть применены для протонов релятивистских энергий излучения. В сравнении с техниками облучения других центров, отличия заключаются в вопросах транспортировки, формирования и дозиметрии пучка [6, с. 6-11].

Мишени нельзя облучать протонами 5-10 мм с энергией 1 ГэВ областью пика Брэгга, поэтому используется методика перекрёстного обстрела: один и тот же пучок наводится в изоцентр под разными углами. Доза концентрируется в нужной точке за счёт фокусировки пучка в точку облучения (изоцентр) дублетом квадрупольных магнитных линз и путём медленных поворотов в двух взаимно перпендикулярных плоскостях относительно мононаправленного стационарного горизонтального пучка

элементов установки для проведения стереотаксической протонной терапии (УПСТ): лечебного стола и деки прибора, фиксирующего голову. Так дозные поля являются строго локализованными и имеют высокий краевой градиент, а нормальные ткани, критические органы и структуры, находящиеся в зоне интереса, при этом остаются в максимальной сохранности. Как правило, в целях обеспечения гарантии качества, ротация вокруг вертикальной оси составляет не более 80° , а ротация вокруг горизонтальной оси ограничена 72° . Данный метод [7, с. 7-9, с. 20-29] известен как «Гатчинский». В результате изоцентрического многопольного облучения протоны описывают траекторию, как показано на рис. 1.

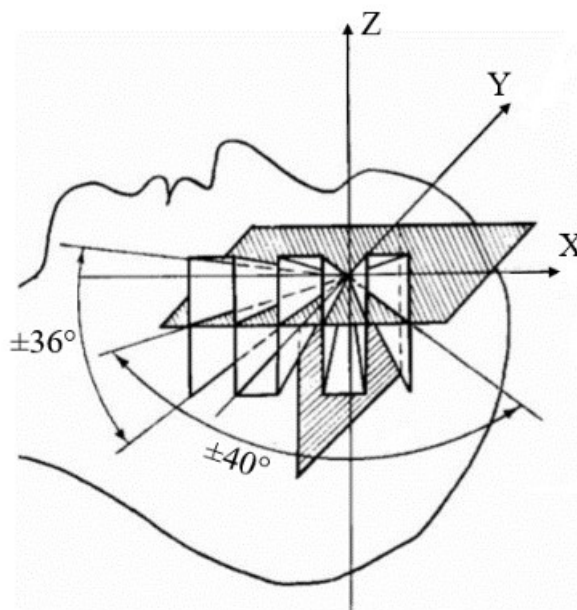


Рис. 1. Схема облучения опухоли Гатчинским методом.

Показано направление протонного пучка (вдоль оси Y), проходящего через центр мишени при стереотаксическом облучении с применением ротации лечебного стола вокруг оси Z на $\pm 40^\circ$ и маятникообразных движений деки прибора, фиксирующего голову, на $\pm 36^\circ$ вокруг оси X.

Доза, получаемая пациентом, в ProtoPlan рассчитывается с использованием пакета GEANT4 на основе взаимодействия 1 ГэВ протонов с веществом, биологическими тканями, и с учётом вклада образующихся при взаимодействии с пациентом вторичных компонентов [8, с. 207-212]. Алгоритмы основаны на методе Монте-Карло с параметризацией интегральных свойств и на модели пучка в 3D-геометрии. ПО учитывает дивергенцию пучка во всех направлениях, осуществляет свёртку профиля входного пучка с параметрами рассеяния, моделирует идеально узкий параллельный входной пучок, поперечный профиль которого подчиняется закону распределения Гаусса.

Полученные результаты.

На рис. 2 показан общий вид системы планирования. ProtoPlan содержит весь необходимый функционал для планирования протонной терапии узким 1 ГэВ пучком. Основными возможностями ПО являются: получение данных с диагностических устройств (ДД), поддержка формата DICOM; восстановление изображений из исходного набора 2D-срезов; определение плотности тканей и точного элементного состава; технология совмещения данных в 3D (Fusion); обработка ДД (применение инструментов для работы с изображениями и зоной интереса); сегментация целевых объёмов и органов риска; расчёт поглощённой дозы от заданного пучка и представление наложенных на анатомические изображения 2D- и/или 3D- дозных распределений; построение гистограмм «доза-объем» для мишеней и критических органов; экспорт плана облучения в программу управления терапевтической установкой.

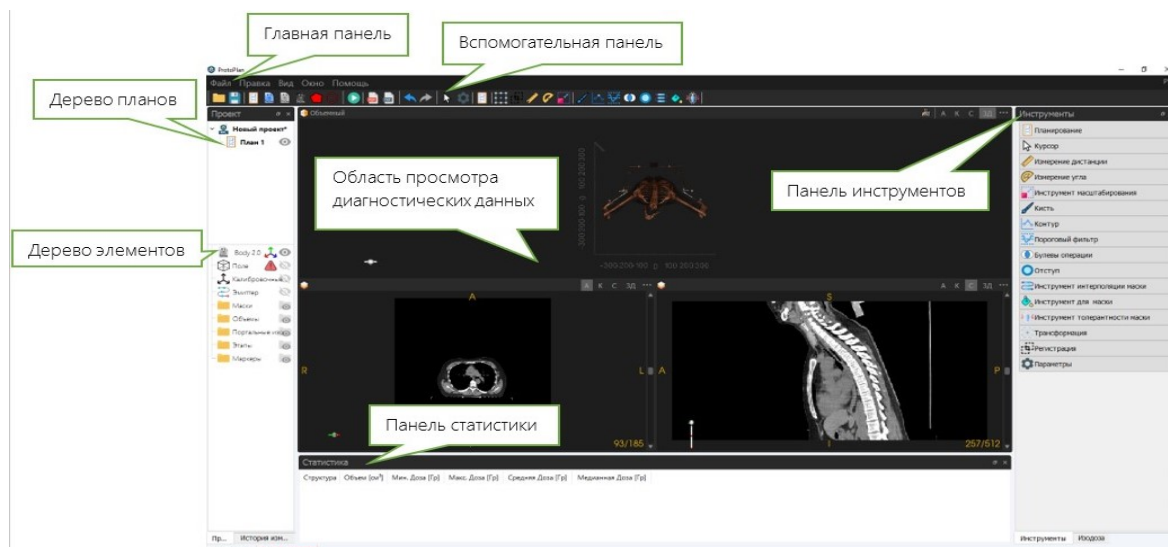


Рис. 2. Рабочее окно в системе дозно-анатомического планирования ProtoPlan.

После разработки ProtoPlan стало возможным моделирование условий облучения и прогнозирование дозы при различных параметрах УПСТ и пучка. В зависимости от размера, формы и локализации мишени стало возможным создание необходимой конформности пучка. Расчёт дозных нагрузок в мишени и прилегающих тканях стал более точным. Погрешность алгоритма расчёта дозы во всех точках облучаемого объёма, алгоритма интерполирующей функции, алгоритма автоматического оконтурирования и всех других алгоритмов, используемых в ProtoPlan, не превышает 2%.

Программа была многократно обкатана. СДАП стабильна, использует индивидуальный алгоритм расчёта и оценки дозы, определяющий оптимальное решение для схемы лечения, решает проблему создания индивидуального плана, имеет возможность вносить коррективы на всех этапах его создания, гарантирует достижение запланированного радиотерапевтического результата.

Система планирования радиотерапии была зарегистрирована Федеральной службой по интеллектуальной собственности (РОСПАТЕНТ) и внесена в Реестр программ для электронно-вычислительных машин (ЭВМ), регистрационный № 2021680869 от 15.12.2021. А после включения ProtoPlan в состав УПСТ было получено разрешение на проведение клинических испытаний медицинского изделия № 1192/2022 от 12.12.22.

Выводы.

Существующие коммерческие ПО не соответствовали задачам, поставленным к компьютеризированной системе для дозиметрического планирования стереотаксической радиохирургии на УПСТ протонами с энергией 1 ГэВ. Разработка ProtoPlan в полном объёме решила их. Система планирования обеспечивает гарантию качества протонной терапии, облегчает и ускоряет работу, значительно снижает вероятность ошибок и повышает качество лечения. Корректность алгоритмов расчёта дозы проверяется при верификации.

Заключение.

Впервые была разработана система цифрового дозиметрического планирования стереотаксической радиохирургии протонами с энергией 1 ГэВ, проходящими навывлет и облучающими по изоцентрической ротационной технике, которая впоследствии вошла в состав медицинского протонного комплекса ПИЯФ и усовершенствовала методику планирования радиотерапии.

С получением заключения о возможности проведения клинических испытаний УПСТ появилась возможность перейти к регистрации медицинского изделия, а в перспективе – возобновить медицинскую деятельность.

Литература.

1. Tobias C.A. Pretherapeutic Investigations with Accelerated Heavy Ions. // *Radiology*, 108 (1). – 1973. – P. 145-158. DOI: 10.1148/108.1.145.

2. Гранов А.М. и др. Сорокалетний опыт клинического применения пучка протонов с энергией 1000 МэВ на базе синхроциклотрона Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова // Медицинская физика. - 2016. – Т. 70, № 2. – С. 10-17.
3. Иванов Е.М. и др. Статус и перспективы развития протонной стереотаксической терапии на синхроциклотроне НИЦ КИ ПИЯФ СЦ-1000 // Исслед. и практика в медицине. - 2018. – С. 82.
4. Khalikov A. et al. Dose planning system for the proton beam therapy complex // Book of abstracts RAD 2021. – 2021. – P. 275.
5. Abrosimov N.K. et al. 1000 MeV Proton beam therapy facility at Petersburg Nuclear Physics Institute Synchrocyclotron // J. Phys.: Conf. Ser. – 2006. V. 41, № 047. – Pp. 424-432.
6. Васильев А.А. и др. Расчёт глубинных дозных распределений, создаваемых пучком протонов с энергией 1000 МэВ при ротационном облучении // Медицинская физика. - 2020. № 4. – С. 5-12.
7. Брожик Д.С. и др. Статус медицинского протонного комплекса НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ // Препринт 3045, Гатчина, ПИЯФ. ISBN 978-5-86763-441-4. – 2020. – 48 стр.
8. G.A. Pablo Cirrone et al. Hadrontherapy: a Geant4-Based Tool for Proton/Ion-Therapy Studies // Progress in Nuclear Science and Technology. – 2011. – Vol. 2. – P. 207-212.

Сведения об авторах

Лилит Гайковна Ваганян

м. н. с. лаборатории медицинской физики отдела медицинской радиологии (ЛМФ ОМР) Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра Курчатовский институт (ПИЯФ – НИЦ «КИ») Гатчина, Россия

Эл. почта: vaganyan_lg@pnpi.nrcki.ru

Валерий Николаевич Вербенко

д. б. н., проф. ЛМФ ОМР ПИЯФ – НИЦ «КИ» Гатчина, Россия

Эл. почта: verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru

Наталья Александровна Кузора

инженер 2 кат. ЛМФ ОМР ПИЯФ – НИЦ «КИ» Гатчина, Россия

Эл. почта: kuzora_na@pnpi.nrcki.ru

Владимир Исаакович Максимов

к. техн. н., зам. директора по перспективным разработкам ПИЯФ – НИЦ «КИ» Гатчина, Россия

Эл. почта: Maximov_VI@pnpi.nrcki.ru

Фёдор Александрович Пак

м. н. с. ЛМФ ОМР ПИЯФ – НИЦ «КИ» Гатчина, Россия

Эл. почта: pak_fa@pnpi.nrcki.ru

Александр Ифратович Халиков

зав. ЛМФ ОМР ПИЯФ – НИЦ «КИ» Гатчина, Россия

Эл. почта: khalikov_ai@pnpi.nrcki.ru

Information about author

Lilit Gaikovna Vaganyan

Junior researcher of Medical Physics Laboratory, Medical Radiology Department (MPL MRD) Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC “Kurchatov Institute” (PNPI – NRC “Kurchatov Institute”) Gatchina, Russian Federation
E-mail: vaganyan_lg@pnpi.nrcki.ru

Valeriy Nikolaevich Verbenko

Doctor of biological sciences of MPL MRD PNPI – NRC “Kurchatov Institute” Gatchina, Russian Federation
E-mail: verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru

Natalya Aleksandrovna Kuzora

2nd category engineer of MPL MRD PNPI – NRC “Kurchatov Institute” Gatchina, Russian Federation

E-mail: kuzora_na@pnpi.nrcki.ru

Vladimir Isaakovich Maksimov

Candidate of technical sciences, deputy director for advanced development PNPI – NRC “Kurchatov Institute” Gatchina, Russian Federation

E-mail: Maximov_VI@pnpi.nrcki.ru

Fedor Aleksandrovich Pak

Junior researcher of MPL MRD PNPI – NRC “Kurchatov Institute” Gatchina, Russian Federation

E-mail: vaganyan_lg@pnpi.nrcki.ru

Aleksandr Ifratovich Khalikov

Head of MPL MRD PNPI – NRC “Kurchatov Institute” Gatchina, Russian Federation

E-mail: khalikov_ai@pnpi.nrcki.ru

ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКОГО СПОСОБА ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В статье дано обоснование применения нового способа диагностики вирусных заболеваний путем измерения показателя преломления биожидкости, например, ротовой жидкости. Проведен анализ известных рефрактометрических способов измерения показателей преломления жидкостных сред, показавший их низкие точность, скорость и воспроизводимость результатов измерений в реальном масштабе времени. Предложенный волоконно-оптический рефрактометрический способ неинвазивной экспресс-диагностики вирусных заболеваний, в том числе SARS-CoV-2 позволит устранить данные недостатки.

Ключевые слова: *волоконно-оптический рефрактометрический способ измерения, микросенсор, коэффициент преломления, экспресс-диагностика, биожидкость, световой поток, апертурный угол*

T.I. Murashkina, V.A. Badeev
Penza State University

JUSTIFICATION OF THE USE OF FIBER-OPTIC REFRACTOMETRIC METHOD OF RAPID DIAGNOSIS OF VIRAL DISEASES

The article substantiates the application of a new method for the diagnosis of viral diseases by measuring the refractive index of biofluid, for example, oral fluid. The analysis of known refractometric methods for measuring refractive indices of liquid media has been carried out, showing their low accuracy, speed and reproducibility of measurement results in real time. The proposed fiber-optic refractometric method for noninvasive rapid diagnosis of viral diseases, including SARS-CoV-2, will eliminate these shortcomings.

Keywords: *fiber-optic refractometric measurement method, refractive index, express diagnostics, bio-liquid, luminous flux, aperture angle*

Введение

На разных стадиях диагностики вирусных заболеваний необходимы соответствующие достоверные способы измерения параметров биожидкостей [1,2].

Толчком для создания нового способа измерения коэффициентов преломления жидкостей послужили проблемы в период пандемии при диагностике вирусного заболевания Covid-19, а именно большая длительность диагностики заболевания и малая воспроизводимость результатов измерений. На сегодняшний день проблема быстрого измерения показателя преломления жидкостных сред (например, ротовой жидкости) в реальном масштабе времени с высокой точностью и воспроизводимостью не решена [1, 2].

Цель работы - разработка физических основ преобразования оптического потока в волоконно-оптической микросистеме, реализующей новый рефрактометрический способ неинвазивной экспресс-диагностики вирусных заболеваний, в том числе SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Проведен анализ известных способов измерения параметров биожидкостей, некоторые из которых обсуждаются в статье.

Известен ряд рефрактометрических способов определения коэффициента преломления жидкости, один из которых основан на прохождении света через две призмы, между гипотенузными гранями которых помещают несколько капель исследуемой

жидкости. Лучи света, выходящие из измерительной призмы, поступают в зрительную трубу, по границе раздела света и тени, наблюдаемой в зрительной трубе, определяют коэффициент преломления [3].

Недостатки известного способа:

- измерения предельного угла проводят по границе света и тени, которая недостаточно четкая для высокоточных измерений, а это приводит к погрешностям определения коэффициента преломления;

- если исследуются жидкости с вирусами, то конструкция устройства, реализующего способ, не отвечает условиям безопасности, после каждого измерения необходимо проводить дезинфекцию устройства, что не отвечает требованиям экспресс-анализа и резко удорожает процедуру анализа.

Известен другой рефрактометрический способ определения коэффициента преломления жидкости, основанный на использовании зависимости показателя преломления бинарной смеси (состоящей из растворителя и исследуемого компонента), которую заливают в тонкостенную призматическую кювету или в призматическую выемку в материале с известным коэффициентом преломления и по углу отклонения луча определяют искомый коэффициент преломления [4].

Недостатки известного способа:

- малая чувствительность и низкая точности измерения, так как, например, если в воде с коэффициентом преломления 1,33 растворить хлорид натрия (30 %), то коэффициент преломления должен составить 1,37; разность коэффициентов в 0,04 зарегистрировать с высокой точностью можно только, используя сложные аппаратные средства, не подходящие для точного экспресс-анализа;

- трудно определить или обеспечить процентное соотношение растворяемых веществ, что существенно влияет на значение показателя преломления исследуемой жидкости;

- реализация призматической кюветы, в которой точно соблюдены все ее геометрические параметры, удорожает устройство, реализующее способ;

- большое время проведения измерений из-за необходимости размещения жидкости в призмах, а использование нескольких призм будет осложнено из-за их дороговизны и отсутствия в свободном доступе в необходимых количествах (когда, например, речь идет об анализах на Covid-19).

Наиболее близким по технической реализации к новому способу является волоконно-оптический способ преобразования светового потока, не относящийся к рефрактометрическим способам, но частично используемый авторами для решения поставленной задачи [5,6]. Он заключается в том, что на выходе подводящего оптического волокна (ПОВ) формируется световой конус, который падает на боковую поверхность прозрачного цилиндра, перемещающегося под воздействием измеряемой физической величины, преломляется на границе «воздух – стекло», проходит через тело цилиндра, вторично преломляется на границе «стекло – воздух», направляется на приемный торец отводящих оптических волокон (ООВ), при этом в зоне расположения ООВ формируется эллипсоидная освещенная структура, частично перекрывающая торцы ООВ, по изменению интенсивности оптических сигналов на выходе ООВ судят о значении измеряемой физической величины (рисунки 1, 2).

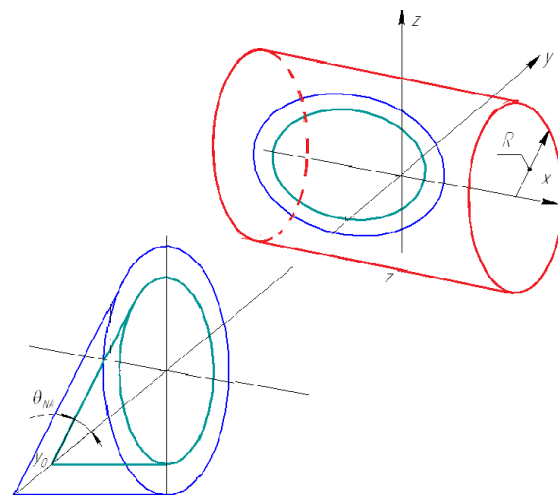


Рисунок 1 – Формирование эллипсоидного светового пятна

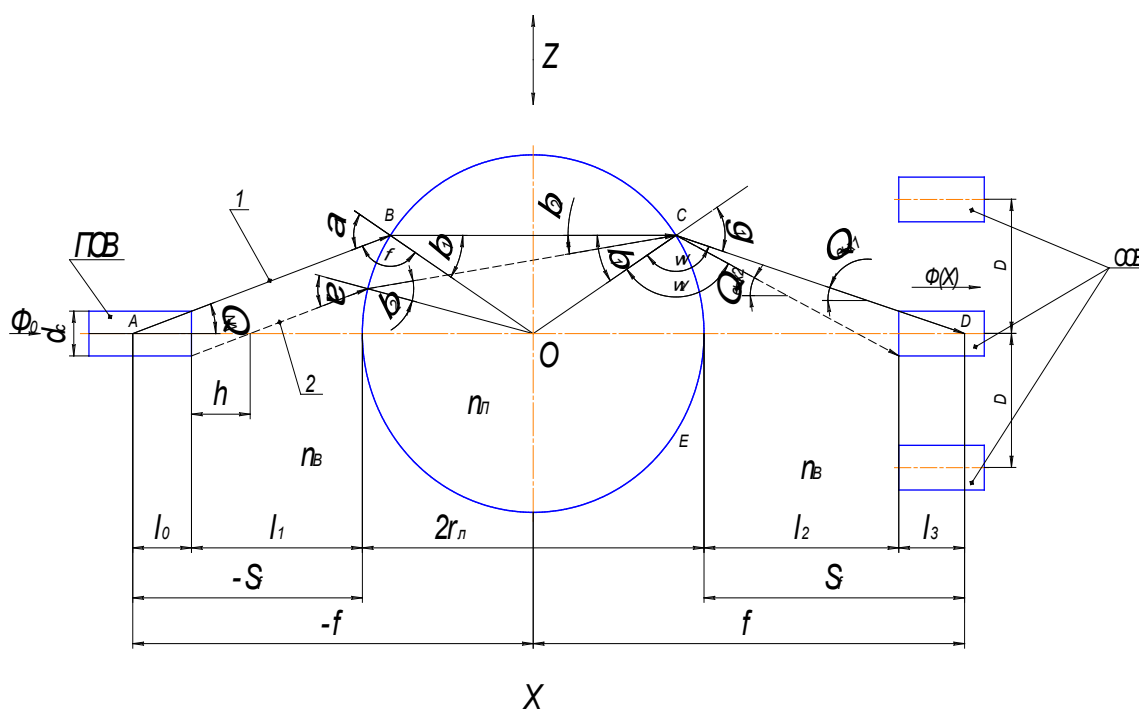


Рисунок 2 – К пояснению известного волоконно-оптического способа преобразования оптических сигналов в волоконно-оптическом преобразователе микроперемещений [6]

Изменение положения линзы (например по оси X) приводит к изменению всех углов падения и преломления и изменению углов $\Theta_{\text{ВЫХ1}}$ и $\Theta_{\text{ВЫХ2}}$, под которыми свет падает на приемные торцы ООВ. При этом в плоскости расположения приемных торцов ООВ наблюдается эллипсоидная освещенная зона, меняющая свое положение относительно торцов ООВ.

Недостаток этого способа заключается в том, что он не может быть применен в полной мере для измерения показателя преломления прозрачных жидкостей из-за технической реализации измерительных преобразователей, в основе принципа действия которых он лежит, а также в силу конструктивного исполнения цилиндра, не имеющего полости для заполнения жидкостью.

Предложено было адаптировать предшествующие разработки научной школы «Волоконно-оптическое приборостроение» г. Пензы для решения данной проблемы, а именно волоконно-оптические микросенсоры микроперемещений на основе стержневых линз. В результате подана заявка на изобретение №2021130405 от 18.10.2021, Волоконно-оптический способ определения коэффициента преломления прозрачного

вещества и реализующий его волоконно-оптический рефрактометрический измерительный преобразователь» [7].

Полученные результаты

Сделано предположение, что изменить трассу прохождения светового потока в измерительном преобразователе, рассмотренном выше, можно не только перемещением линзы, но и изменением показателей преломления элементов оптической системы, например, изменяя коэффициент преломления цилиндра. Для этого его надо выполнить полым и заполнить жидкостью, коэффициент преломления которой необходимо измерить.

Образец ротовой жидкости располагается в цилиндрической прозрачной трубке, относительно боковой поверхности которой с противоположных сторон на расчетном расстоянии располагаются излучающий торец ПОВ и приемный торец ООВ (рисунок 3).

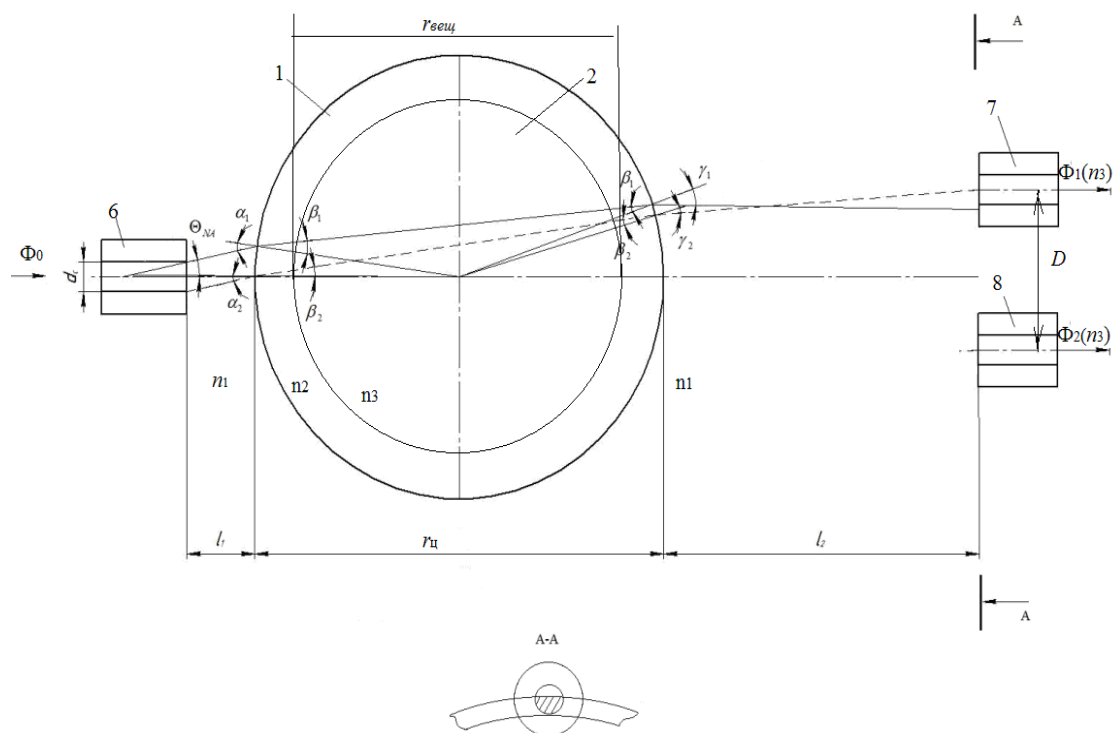


Рисунок 3 – Построения для определения функции преобразования ВОРМС

Световой поток с выхода ПОВ под постоянным апертурным углом $\Theta_{НА}$ в виде полого усеченного конуса падает на боковую поверхность прозрачной цилиндрической трубки, заполненной жидкостью, преломляется на цилиндрических границах разделов сред: «воздух-материал трубки», «материал трубки - жидкость», «жидкость - материал трубки», «материал трубки - воздух» и под некоторыми углами $\Theta_{ВЫХ1}$ и $\Theta_{ВЫХ2}$, зависящими от коэффициентов преломления и соотношения размеров всех сред, падает на приемный торец ООВ. Интенсивность светового потока с выхода ООВ зависит от коэффициента преломления ротовой жидкости.

Изображение излучающего торца ПОВ 6 в плоскости А-А, где расположены приемные торцы ООВ, меняет свой контур при изменении показателя преломления жидкости, что, в свою очередь, ведет к изменению площади перекрытия приемных торцов ООВ 7 и 8 световым пятном.

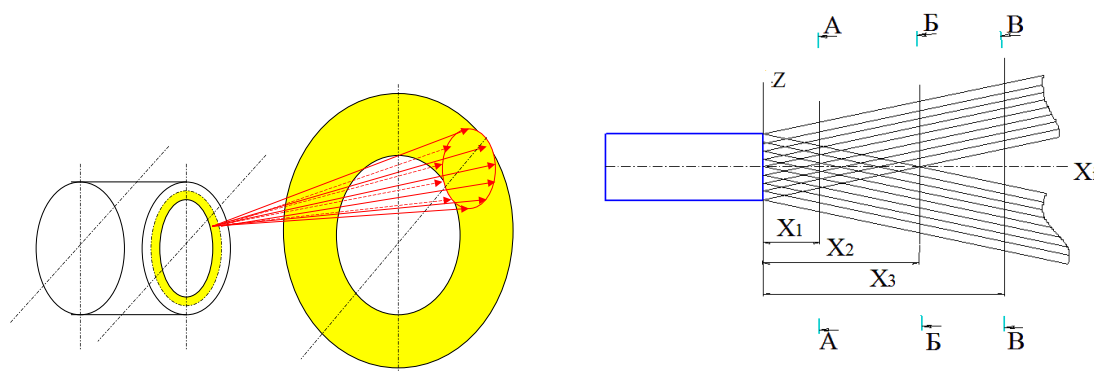
Возможность расположения ООВ 7 и 8 с некоторым допустимым смещением по окружности частично снижает требования к процедуре юстировки оптической системы.

Расстояния l_1 и l_2 , внешний и внутренний диаметры цилиндрической трубки $d_{ц}$, $d_{вещ}$ выбираются из условия максимального ввода светового потока и конструктивного согласования элементов оптической системы.

Кроме того, необходимо не только разместить ООВ на нужном расстоянии, но также позиционировать их таким образом, чтобы оптические лучи попадали в оптическое волокно под углами, не превышающими апертурный угол оптического волокна $\Theta_{НА}$.

Применяется подход к исследованиям, заключающийся в учете пространственного распределения мощности светового потока на излучающем торце ПОВ в виде полого усеченного конуса [5]:

- 1) распространение света во всех направлениях симметрично,
- 2) световой поток состоит из лучей, лежащих в одной плоскости, которые образуют два множества параллельных лучей,
- 3) поперечное сечение пучка имеет круговую и кольцевую зоны (рисунок 4).



$\alpha = 2\Theta_{НА}$ – угол при вершине конуса, где $\Theta_{НА}$ – апертурный угол оптического волокна
Рисунок 4 - Распространение света с каждой точки излучательного торца ПОВ

Распределение интенсивности I_{X_i} в дальней зоне дифракции определится как:

$$I_{X_i} = \begin{cases} I_{X_i} & r_{внут} \leq |y| \leq R_{вн} \\ 2I_{X_i} & |y| \leq r_{внут} \end{cases} \quad (1)$$

Интенсивность I_{X_i} рассчитывается как освещенность от отдельного луча, прошедшего расстояние $\frac{X_i}{\cos\Theta_{НА}}$: $I_{X_i} = \frac{B \sin^2\Theta_{НА} \cos^2\Theta_{НА}}{X_i^2}$, где B – яркость излучения, Вт/(см²ср).

Сделаны важные методологические выводы: 1) в зоне измерений имеются сечения, в которых освещенность равномерная, и сечения, где освещенность резко уменьшается в направлении от оптической оси; 2) при конструировании волоконно-оптического рефрактометрического микросенсора трубку с жидкостью следует располагать в сечении В–В, где однородное распределение освещенности, исключая неоднозначность определения коэффициента преломления.

Распространение света в виде полого конуса позволяет его разделить на два и более независимых световых потока непосредственно в зоне измерения, например используя два и более ООВ, приемные торцы которых располагаются на расчетном расстоянии друг от друга. При этом верхняя часть светового потока поступает по верхнему ООВ на первый приемник излучения, нижняя часть светового потока по нижнему ООВ поступает на второй приемник излучения. Оптические сигналы на приемниках излучения преобразуются в электрические сигналы, причем перед началом измерения в полость цилиндра заливают калибровочную жидкость с известным коэффициентом преломления n_0 , далее на место трубки с калибровочной жидкостью помещают аналогичную цилиндрическую трубку с жидкостью, коэффициент преломления $n_ж$ которой необходимо

определить. По изменению в k -раз интенсивности оптического сигнала на выходе ООВ определяют коэффициент преломления жидкости по формуле $n_{ж}=kn_0$.

Выводы. Предлагаемый новый волоконно-оптический рефрактометрический способ измерения показателя преломления жидкости позволит:

- повысить чувствительность преобразования оптических сигналов, обеспечиваемой снижением потерь светового потока в микрометрическом оптическом тракте измерительного преобразователя;
- повысить точность измерения показателя преломления биожидкости (например, ротовой жидкости) при вирусных заболеваниях, в том числе при SARS-CoV-2;
- упростить процедуру юстировки оптической системы микросенсора;
- проводить предварительную калибровку микросенсора;
- выполнять при необходимости двухканальное преобразование оптических сигналов в зоне восприятия измерительной информации для снижения в 2 и более раз большинства дополнительных погрешностей микросенсора;
- уменьшить массо-габаритные характеристики микросенсора;
- обеспечить высокую воспроизводимость (до 98 %) результатов измерений;
- проводить экспресс-диагностику состава биожидкости;
- использовать в зоне измерения оптическое излучение мощностью не более 10 мкВт, что при необходимости позволит проводить измерения в искро-взрыво-пожароопасных средах;
- исключить любые негативные последствия от электромагнитного воздействия на здоровье пациента и на результаты измерения.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются:

- системный подход к оценке ситуации в области диагностики параметров биожидкостей с помощью рефрактометрических способов преобразования оптических сигналов, показавший отсутствие таковых для экспресс-диагностики в реальном масштабе времени;
- подход к исследованиям, заключающийся в учете пространственного распределения мощности светового потока на излучающем торце ПОВ в виде полого усеченного конуса;
- новый волоконно-оптический рефрактометрический способ измерения показателей преломления исследуемых биожидкостей.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-29-10017

Литература

1. *Бадеева Е.А., Арутюнов А.В., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Аюпова Ф.С., Гуленко О.В. Перспективные возможности оптических методов измерения в диагностике герпетической инфекции полости рта// В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2021. Весенняя сессия . Москва, 2021. С. 44-47.*
2. *В.А. Бадеев, Е.А. Шачнева, Л.А. Шапетько, Т.И. Мурашкина Применение волоконно-оптического рефрактометрического микродатчика при мониторинге состояния водной среды// Материалы, средства и технологии получения и обработки измерительной информации (Шляндинские чтения -2022): Материалы XIV Междунар. науч.-техн. конф. с элементарнауч. шк. и конкурсом НИР для студентов, аспирантов и молодых ученых (г.Пенза 24-26 октября 2022)/под ред. Е.А.Печерской. – Пенза: Изд.-во ПГУ. – 2022- С.106-108
<file:///C:/Users/1/Downloads/0174e29.pdf>*
3. *Латышенко, К.П. Мониторинг загрязнения окружающей среды : учебник и практикум для среднего профессионального образования// Москва :*

Издательство Юрайт, 2019. - 375 с.

4. URL: <https://urait.ru/bcode/433597>
5. Мурашкина Т.И., Бадеева Е.А. Волоконно-оптические приборы и системы: Научные разработки НТЦ "Нанотехнологии волоконно-оптических систем" Пензенского государственного университета Ч.1 // СПб.: Политехника, 2018. 187 с. <https://doi.org/10.25960/7325-1132-1>;
6. Мурашкина Т.И., Зуев В.Д., Кривулин Н.П., патент РФ 2338155 Волоконно-оптический преобразователь перемещений// Оpubл. 25.06.2008, Бюл. №31
7. Бадеева Е.А., Бадеев В.А., Мурашкина Т.И., Серебряков Д.И., Хасанишина Н.А., Васильев Ю.А., Кукушкин А.Н. Заявка на изобретение РФ №2021130405 от 18.10.2021, Волоконно-оптический способ определения коэффициента преломления прозрачного вещества и реализующий его волоконно-оптический рефрактометрический измерительный преобразователь.

Сведения об авторах

Татьяна Ивановна Мурашкина

доктор техн. наук, профессор, профессор
каф. «Приборостроение» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»
Пенза, Россия

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Владислав Александрович Бадеев

студент кафедры «Приборостроение»
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»
Пенза, Россия

Эл. почта: vladbadeev4464@gmail.com

Information about author

Tatiana Ivanovna Murashkina,

Doctor of (Tech.) Sciences, Professor,
Professor of the Department of Instrument Engineering Penza State University
Penza, Russian Federation

E-mail: timurashkina@mail.ru

Vladislav Alexandrovich Badeev

student of the Department of "Instrument Engineering" Penza State University
Penza, Russian Federation

E-mail: vladbadeev4464@gmail.com

УДК 531.78, 629.3.054.239
ГРНТИ 90.27.30
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.180-186

Т.И. Мурашкина¹, Е.А. Бадеева¹,
Ю.А. Васильев², Т.В. Паршикова¹,
Е.Ю. Плотникова², Т.В. Истомина³

¹ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

²ФГБОУ ВО «Кубанский медицинский государственный университет»

³ ФГАОУ НИУ «Московский энергетический институт»

ИЗМЕРЕНИЕ ДАВЛЕНИЯ ЯЗЫКА НА НЁБО С ПОМОЩЬЮ ВОЛОКОННО-ОПТИЧЕСКОГО МИКРОСЕНСОРА

Предлагается методика измерения давления языка на нёбо при челюстно-лицевых патологиях с помощью волоконно-оптического микросенсора давления, обеспечивающая высокие точность, воспроизводимость и достоверность результатов измерений. Методика учитывает возраст, пол пациентов. Предложено проводить измерения давления при разных положениях языка в полости рта.

Ключевые слова: методика, волоконно-оптический микросенсор, челюстно-лицевая патология, давление, язык, нёбо, полость рта

T.I. Murashkina¹, E.A. Badeeva¹,
Yu.A. Vasiliev², T.V. Parshikova¹,
E.Y. Plotnikova², A.N. Kukushkin¹

¹Penza State University

²Kuban State Medical University

³Moscow Power Engineering Institute

MEASURING THE PRESSURE OF THE TONGUE ON THE PALATE USING A FIBER-OPTIC MICROSENSOR

A technique for measuring the pressure of the tongue on the palate in maxillofacial pathologies using a fiber-optic pressure microsensor is proposed, providing high accuracy, reproducibility and reliability of measurement results. The method takes into account the age, gender of patients. It is proposed to measure pressure at different positions of the tongue in the oral cavity.

Keywords: *technique, fiber-optic microsensor, maxillofacial pathology, pressure, language, palate, oral cavity*

Введение

Среди врожденных пороков развития лица у детей несращение губы и/или неба занимают первое место. Частота рождения детей с несращением губы и неба достаточно велика – от 1:500 до 1:1000 родившихся [1]. Для диагностики несращения губы и/или неба используют различные методики, одной из перспективных среди которых являются методики, основанные на измерении давления языка на нёбо [2]. В полости рта язык оказывает давление на окружающие ткани, так как является сильнейшим мышечным органом полости рта [3]. Язык при расщелине своей спинкой оказывает давление на нёбо, тем самым раздвигает нефиксированные сегменты горизонтальной небной пластинки, что неблагоприятно для хирургического этапа реабилитации. Соответственно стоит задача определения закономерностей изменения давления языка на нёбо и другие окружающие анатомические образования полости рта от возрастнo-половых особенностей, диагноза в изменении лицевого скелета пациента (в том числе ребенка). Основная сложность при решении этой задачи заключается в том, что до сих пор не установлены точные значения давления языка на нёбо для различных патологий челюстно-лицевой области, хотя давление языка на небо является наиболее показательным источником информации о состоянии полости рта [4].

Как свидетельствуют результаты исследования (Proffit W.R., Knight J.M., 1977), во время глотания язык давит на зубы в боковых отделах в пределах (140 ± 50) г/см², в области кончика – (75 ± 50) г/см² [5]. Максимальное давление $(562,3)$ г/см² языком приходится по средней линии на верхние передние зубы и передний участок неба (Kydd W.L., 1956). Исследования показывают, что во время глотания язык развивает силу, равную $369,2 \pm 14,0$ г/см². Причем внутриротовое давление языка во фронтальном отделе полости рта у женщин значительно больше, чем у мужчин, и прямо пропорционально возрасту человека.

С учетом данных факторов давление будет воспроизводиться в предполагаемом диапазоне $(0,5 \dots 0,6)$ кг/см², который по мере увеличения статистической информации будет уточняться. Данные значения будем уточнять путем реальных измерений у пациентов разного возраста, пола и заболеваний с помощью современных волоконно-оптических средств измерения, к которым относятся волоконно-оптические микросенсоры (ВОМС) давления языка на нёбо [6,7,8].

Цель исследования - повышение точности, воспроизводимости и достоверности результатов измерений давления языка на нёбо на основе разработки методики измерения давления языка на нёбо при челюстно-лицевых патологиях с помощью безопасных высокоточных ВОМС давления.

Материалы и методы

Объективные методы предполагают постепенное накопление измерительной информации о значениях давления языка на нёбо. Дело в том, что в разных источниках медицинской информации приводятся достаточно противоречивые данные о диапазонах давления языка. Соответственно для результативного использования ВОМС необходимо их уточнить.

Для измерения этого давления изготовлен волоконно-оптический датчик давления языка на нёбо аттенуаторно-отражательного типа [8] (рисунок 1).

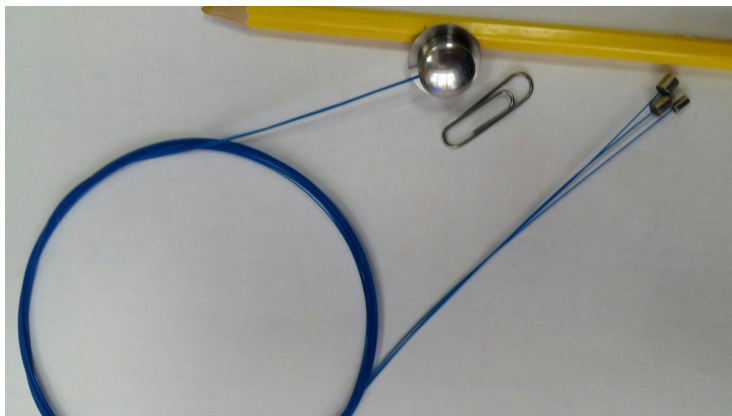


Рисунок 1 – Фото ВОМС с волоконно-оптическим кабелем

На начальном этапе испытаний можно только предполагать, как ВОМС будет установлен в полости рта пациента (рисунок 2) [3].

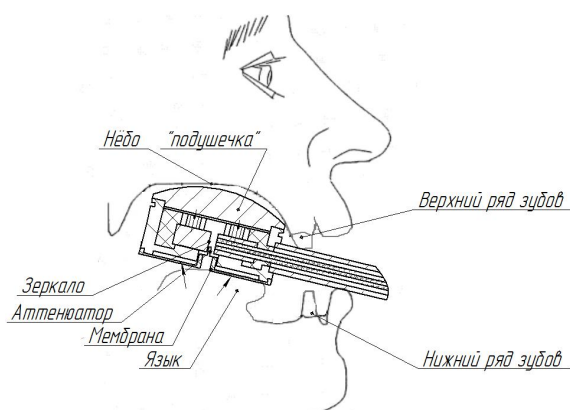


Рисунок 2 – Установка ВОМС в полости рта пациента [3]

Перед проведением клинических измерений необходимо волоконно-оптическому датчику давления (ВОДД), основным элементом которого является ВОМС, присписать градуировочную характеристику, которую снимают в нормальных лабораторных условиях [9]. Один цикл градуирования предполагает воспроизведение 8...10 значений давления $P_1, P_2, \dots, P_{\max}$ и записи в протокол испытаний значений выходного сигнала - выходного напряжения $U_1(P_1), U_2(P_2), \dots, U_{\max}(P_{\max})$ [10]. Цикл градуирования повторяют еще три раза, т.е. всего должно быть не менее четырех циклов градуирования.

Для выполнения процедуры градуировки ВОДД медицинского назначения необходимо воспроизводить низкие значения давления. Для этого используется набор однозначных мер веса (рисунок 3).

Необходимое давление P_i от 0 до P_{\max} и от P_{\max} до 0 через каждые $0,1P_{\max}$ создается наложением на воспринимающий элемент ВОМС гирек массой от 60 до 600 грамм. При наложении гирьки происходит прогиб мембраны и изменяется интенсивность светового

потока $\Phi(P)$, поступающего по волоконно-оптическому кабелю на электронный блок датчика. Соответственно меняется выходное напряжение $U(P)$.

По результатам выполнения процедуры градуирования находятся средние значения напряжения в каждой точке градуирования. В соответствии с градуировочной характеристикой при необходимости значения давления могут выводиться на устройство индикации. По результатам градуирования и клинических испытаний будет уточнен диапазон измеряемых давлений.



Рисунок 3 – Схема для снятия градуировочной характеристики датчика

Полученные результаты

Для достижения поставленной цели разработана методика измерения давления языка на нёбо при челюстно-лицевых патологиях с помощью ВОМС.

Перед началом измерений пациент располагается в стоматологическом кресле и укладывает голову на его подголовник в опорнофиксированном положении. Предварительно его знакомят с микросенсором и способом его установки в полости рта. Исследуемый привыкает к межзубному положению загубника ВОМС (см. рисунок 1) и проводит несколько тренировочных надавливаний языком на чувствительный элемент. Вначале пациент осуществляет легкое (без усилий) проглатывание 5 мл воды, в результате чего производится минимальное (естественное) надавливание языка на чувствительный элемент ВОМС. Затем ему предлагается сделать языком максимально усиленное отрывистое давление на чувствительный элемент ВОМС. Дальнейшие клинические исследования осуществляются в соответствии с разработанной методикой.

Методика включает следующие этапы.

- 1) Определить к какой возрастной и гендерной группе относится пациент. Сделать соответствующие отметки в таблице 1.

Таблица 1 – Возраст, пол пациента

Возраст, лет					пол	
0...1	1...5	45...60	м	ж

- 2) Определить для конкретного возраста и пола пациента нормальные числовые значения давления языка на нёбо в соответствии с базой данных, которые занести в таблицу 2.

- 3) Установить ВОМС в полости рта в соответствии с рисунком 1, предварительно выполнив дезинфекцию рук 70% этиловым спиртом и другими дезинфицирующими средствами, и поместив часть ВОМС, размещаемую в полости рта, в гигиенический пакет.

Таблица 2 – Значения давления языка на нёбо

Возраст	1...5 (3)			
пол	м			
Положение языка	Нормальное значение давления языка на нёбо, P , кгс/см ²	Допустимое отклонение давления языка на нёбо, P , кгс/см ²	Среднее значение результата измерения давления языка на нёбо, $P_{cp} \pm \Delta P_d$, кгс/см ²	Максимальное значение реального отклонения давления языка на нёбо, ΔP_p , кгс/см ²
4.1 Кончик языка в зубы				
4.2 Кончик языка к молярам				
4.3 Кончик языка перпендикулярен нёбу				

4) С помощью ВОДД провести измерения давления P языка на нёбо в трех положениях языка в полости рта: кончик языка в зубы, кончик языка к молярам, кончик языка перпендикулярен нёбу.

Занести результаты измерений в таблицу 3.

Таблица 3 – Результаты измерений давления P языка на нёбо

Положение языка	Выходное напряжение ВОДД, U , В (Измеренное значение давления языка на нёбо $P_{и}$, кгс/см ²)			
	Первое измерение	Второе измерение	Третье измерение	Четвертое измерение
Кончик языка в зубы				
Кончик языка к молярам				
Кончик языка перпендикулярен нёбу				

5) Повторить операции по пункту 4) еще 3 раза.

6) Определить среднее значение результата измерения давления языка на нёбо P_{cp} и занести в таблицу 2.

7) Определить максимальное значение реального отклонения давления языка на нёбо по формуле $\Delta P_p = |P - (P_{cp} \pm \Delta P_d)|_{\max}$ и занести результаты расчета в таблицу 2.

8) Определить патологию в соответствии с отклонениями от нормы. Сделать записи в таблице 4.

Таблица 4 – Выявленная патология

Максимальное значение реального отклонения давления языка на нёбо, ΔP_p , кгс/см ²	Патология

Выводы

Предлагаемая методика позволит:

- исключить неоднозначность измерения давления языка на нёбо для разных возрастов, гендерной принадлежности пациентов, повысить достоверность результатов измерений.

- обеспечить высокую воспроизводимость (до 80 %) результатов измерений;

- использовать в зоне измерения оптическое излучение мощностью не более 10 мкВт, исключить негативные последствия от электромагнитного воздействия на здоровье пациента и на результаты измерения.

Заключение. Авторы считают, что в данной работе новыми являются:

- системный подход к оценке ситуации в области диагностики ЧЛП с помощью ВОМС;

- схема и последовательность снятия градуировочной характеристики датчика;

- методика измерения давления языка на нёбо при ЧЛП с помощью ВОМС.

Информация о финансовой поддержке:

Исследование выполнено в рамках гранта Российского Научного Фонда и Кубанского Научного Фонда № 22-15-20069.

Список использованных источников

1. Мамедов Ад.А., Кучеров Ю.И., Жиркова Ю.В., Макленнан А.Б., Морозова Н.С., Блиндер Ж.А. Междисциплинарный подход в лечении детей с расщелиной губы и неба в современных условиях развития здравоохранения России // В сборнике: 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.
2. Арутюнов А.В., Волобуев В.В., Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А. Врожденные пороки развития лица у детей крупного региона России: современное состояние проблемы и перспективные диагностические решения// Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + M&Ec`2020 (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2020 г.). 2020. Весенняя сессия. 124 с. С.73-76
3. Бадеева Е.А., Арутюнов Д.И., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Хасанишина Н.А., Славкин И.Е. Волоконно-оптическая диагностическая система аномалий челюстно-лицевой области у детей, связанных с дисфункцией языка// Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Межд. конференции NT + M&Ec`2020 (Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2020 г.). 2020. Весенняя сессия. - С.5-10
4. Ямашев И.Г., Матвеев Р.С. Язык: клиничко-функциональные методы диагностики патологических состояний. - Чебоксары: АУ Чувашии ИУВ, 2012. - С. 48.
5. Ильина Р. Ю. Информативность системы полость рта - язык в диагностике побочных эффектов психотропных средств : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.00.21 / Ильина Роза Юрьевна; [Место защиты: ГОУВПО "Казанский государственный медицинский университет"].- Казань, 2009.- 145 с.: ил.
6. Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Серебряков Д.И., Арутюнов А.В., Терещенко Л.Ф., Бростилова Т.Ю., Хасанишина Н.А. Патент на изобретение РФ 2741274. Волоконно-оптический датчик силы мышц языка – давления языка на небо и способ его сборки // Опубликовано: 2021.01.22, бюл.3
7. Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Васильев Ю.А., Серебряков Д.И., Бростилова Т.Ю., Хасанишина Н.А., Терещенко Л.Ф. Волоконно-оптический датчик силы (давления) мышц языка// Модели, системы и сети в экономике, технике, природе и обществе. – 2019. - №3. – С. 83-93.
8. Бадеева Е.А., Мурашкина Т.И., Серебряков Д.И., Бадеев А.В. Патент на изобретение РФ 2740538. Способ преобразования светового потока и реализующий его волоконно-оптический датчик давления// Опубликовано: 2021.01.15, бюл.2
9. Мурашкина Т.И. Техника физического эксперимента и метрология. Учеб. пособие. Рекомендовано ФИРО в качестве учебного пособия для студентов направления Лазерная техника и лазерные технологии и Приборостроение – СПб.: Политехника, 2015 - 138 с.

Сведения об авторах

Татьяна Ивановна Мурашкина

доктор техн. наук, профессор, профессор каф.
«Приборостроение» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»
Пенза, Россия

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Information about author

Tatiana Ivanovna Murashkina,

Doctor of (Tech.) Sciences, Professor,
Professor of the Department of Instrument Engineering Penza State University
Penza, Russian Federation

E-mail: timurashkina@mail.ru

Елена Александровна Бадеева

доктор техн. наук, доцент, профессор каф. «Радио-техника и радиоэлектронные системы» ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

Пенза, Россия

Эл. почта: badeeva_elen@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

Татьяна Викторовна Паршикова

студентка кафедры «Приборостроение»

ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

Пенза, Россия

Эл. почта: ms.parshikova01@mail.ru

Екатерина Юрьевна Плотникова

Врач-неонатолог первой категории отделения новорожденных №1 ГБУЗ "Родильный дом города Краснодара" МЗ КК

Краснодар, Россия

Эл. почта cat.roll@yandex.ru

Татьяна Викторовна Истомина

доктор техн. наук, профессор, профессор каф. «Основы радиотехники» ФГБОУ ВО НИУ «Московский энергетический институт»,

Москва, Россия

E-mail: istom@mail.ru.

Elena Alexandrovna Badeeva

Doctor of (Tech.) Sciences, Associate Professor, Professor of the Department "Radio Engineering and Radio Electronic Systems"

Penza State University

Penza, Russian Federation

E-mail: badeeva_elen@mail.ru

Vasiliev Yuri Anatolyevich

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

Kuban State Medical University

Krasnodar, Russia

E-mail: yurii-59@mail.ru

Tatiana Viktorovna Parshikova

student of the Department of "Instrument Engineering" Penza State University

Penza, Russian Federation

E-mail: ms.parshikova01@mail.ru

Ekaterina Yurievna Plotnikova

Neonatologist of the first category of the Department of newborns № 1 of the Maternity Hospital of the city of Krasnodar

Krasnodar, Russia

E-mail: cat.roll@yandex.ru

Tatiana Viktorovna Istomina,

Doctor of (Tech.) Sciences, Professor, professor of the Department of Fundamentals of radio engineering of the NRU "Moscow Power Engineering Institute",

Moscow, Russian Federation

E-mail: istom@mail.ru

УДК 671.373

ГРНТИ 76.09

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.186-191

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

ИФТ ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН

ОСОБЕННОСТИ ТЕПЛОЙ ЛАЗЕРОИНДУЦИРОВАННОЙ КОАГУЛЯЦИИ БИМОДЕЛЕЙ

Исследованы особенности лазероиндуцированной тепловой коагуляции биомоделей применительно к задаче лечения гепатоцеллюлярной карциномы. Для доставки излучения в объем биомодели использовались оптические волокна с плоским торцом. Особенностью коагуляции биомодели на основе яичного белка на длине волны 0,98 мкм является наличие выраженного порога коагуляции. Как и в случае такой биомодели, объем образованного коагулята в образцах печени свиньи *in vitro* для длины волны 1,94 мкм значительно превосходит объем, получаемый при облучении образцов на длине волны 0,98 мкм.

Ключевые слова: лазер, оптическое волокно, биомодель, яичный белок, печень свиньи, тепловая коагуляция.

PECULIARITIES OF THERMAL LASER-INDUCED COAGULATION OF BIOMODELS

The peculiarities of laser-induced thermal coagulation of biomodels were studied in relation to the problem of treating hepatocellular carcinoma. To deliver radiation into the volume of the biomodel, optical fibers with a flat end were used. A peculiarities of coagulation of the biomodel based on chicken egg protein at a wavelength of 0.98 μm is the presence of a pronounced coagulation threshold. As in the case of such a biomodel, the volume of coagulate formed in the liver for a wavelength of 1.94 μm significantly exceeds the volume obtained by irradiating the liver at a wavelength of 0.98 μm .

Keywords: laser, optical fiber, biomodel, egg protein, pig liver, thermal coagulation.

Введение

Лазерная локальная гипертермия давно и активно используется в противоопухолевой терапии [1,2]. При традиционной лазерной гипертермии в температурном диапазоне 40—45°C имеют место повреждения клеток, такие как деактивация ферментов, изменения в клеточных мембранах и зависимости от времени облучения - гибель клеток. При этом традиционная гипертермия в самостоятельном виде оказывает существенное противоопухолевое действие только в 12—13% случаев [3, 4]. При температуре \square 60-70°C имеет место тепловая денатурация белков биоткани в результате необратимого нарушения пространственной структуры их молекул. Для обеспечения эффективности такой процедуры необходимо создать вокруг опухоли 3D-температурную область с границей между опухолевой и здоровой тканями \square 60°C (температура коагуляции белков ткани). Лазериндуцированная коагуляция опухолевой ткани представляется более эффективным подходом в связи с необратимой гибелью клеток опухолевой ткани. Одной из радикальных мер по снижению онкозаболеваний является их выявление и лечение на ранних стадиях. Одним из распространенных онкозаболеваний является печеночно-клеточный рак - гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), который диагностируется в 80% случаев всех видов заболеваний печени [5]. Сложность такого заболевания состоит в его стремительном прогрессировании: при некоторых формах ГЦК от момента выявления яркой клинической картины до летального исхода проходит всего несколько месяцев. Такого рода опухоли формируются в объеме органа и на начальной стадии заболевания могут представлять собой сферические или эллипсоидные образования размером до 0,5- 1 см. Перспективным подходом для формирования 3D-температурной области в объеме опухолевой ткани является локальная доставка лазерного излучения с помощью оптических волокон, что позволяет управлять тепловыми полями в опухолевой ткани и на ее границах с минимальным повреждением здоровых тканей. Это дает возможность подводить лазерное излучение к подповерхностным и глубоким образованиям ГЦК.

Цель работы.

Целью данной работы является исследование особенностей формирования коагулируемых объемов в биомоделях при тепловом воздействии лазерного излучения различных длин волн применительно к задаче лечения гепатоцеллюлярной карциномы.

Материалы и методы.

Схема установки для исследования динамики формирования коагулируемых объемов в биомоделях представлена на рис. 1. В качестве источников лазерного излучения использовались полупроводниковый лазер мощностью до 10 Вт с длиной волны 0,98 мкм и волоконный многомодовый лазер мощностью до 15 Вт с длиной волны 1,94 мкм. Для доставки излучения к биомодели использовалось оптическое волокно с диаметром сердечника 600 мкм. Мощность излучения, подводимая к биомодели, измерялась с

помощью измерителя мощности FieldMaster (Coherent). Для контроля и визуализации температурных полей использовался тепловизор А655sc (FLIR) с дополнительным объективом для увеличения. Для съёмки и визуализации процесса лазериндуцированной коагуляции использовалась скоростная камера (Photron), скорость съёмки составляла 60 кадров в секунду. В качестве объекта исследований использовались биомодели из натурального яичного белка и ткани печени свиньи *in vitro*.

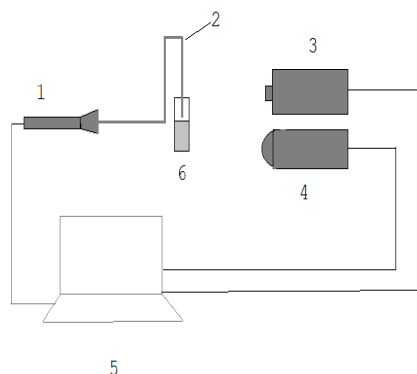


Рис. 1. Схема экспериментальной установки. 1- лазер; 2-оптическое волокно; 3-скоростная видеокамера; 4-тепловизор; 5 – компьютер; 6-биомодель.

Полученные результаты.

На рис. 2 представлен типичный вид коагулятов, полученных при тепловом воздействии на биомодель лазерного излучения с длинами волн 0,98 мкм (а) и 1,94 мкм (б). Отметим, что при подаче излучения через плоский торец оптического волокна формируемый коагулят имеет эллипсоидную форму. Размер коагулята при таком подводе излучения может достигать 1 см. Из литературных данных известно, что физическое состояние белка в процессе нагрева изменяется постепенно: при температуре 58°C белок начинает свертываться, при 60-61°C свертывание становится более интенсивным, а при 65°C процесс становится необратимым [6].

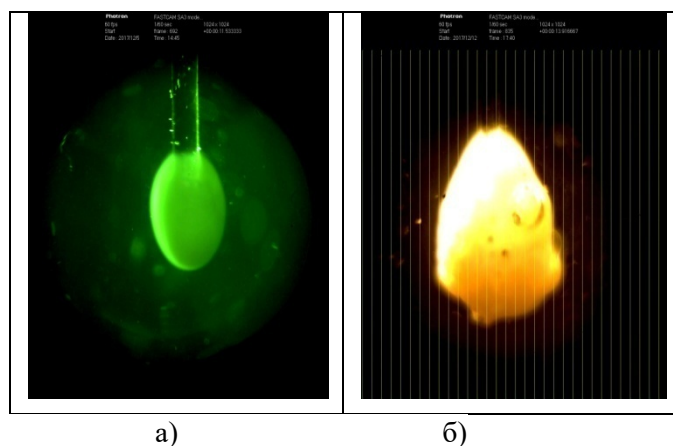


Рис. 2. Вид коагулятов при тепловом воздействии на биомодель на основе яичного белка излучения с длиной волны 0,98 мкм (7,2 Вт, 10 с) (а) и с длиной волны 1,94 мкм (3,2 Вт, 10 с) (б).

Особенностью коагуляции биомодели на длине волны 0,98 мкм является наличие выраженного порога коагуляции. На рис. 3 предоставлены зависимости объема коагулята от времени лазерного облучения при постоянной мощности лазерного излучения на выходе из оптического волокна (а) и от мощности излучения (б) для длин волн излучения 1,94 и 0,98 мкм. Скорость образования коагулята для длины волны 1,94 мкм составляла 7,45 мм³/сек, для длины волны 0,98 мкм – 0,35 мм³/сек. Объем коагулята определялся с помощью видеозаписи, полученной скоростной видеокамерой. Как следует из рисунков, при длине волны 0,98 мкм существует выраженное пороговое значение мощности излучения, при которой, начинается процесс коагуляции в биомодели. Для данных условий эксперимента порог коагуляции составил 2,5 Вт. Порог

коагуляции для длины волны 1,94 мкм существенно меньше и составлял менее 0,3 Вт. Это обусловлено существенным различием коэффициентов поглощения излучения для этих длин волн [7].

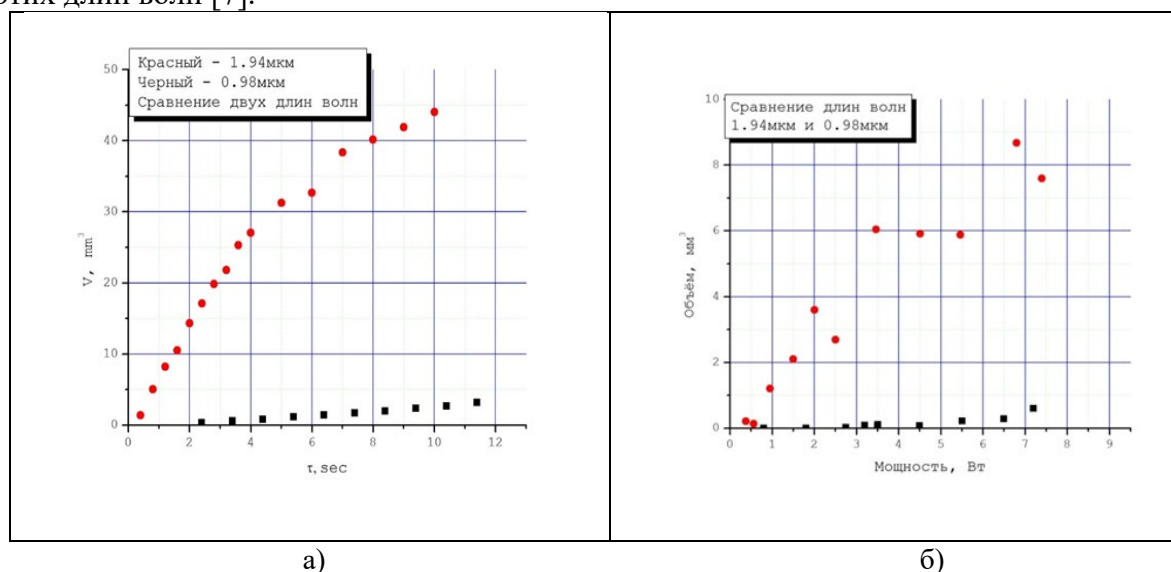


Рис. 3. Зависимость объема коагулята от времени лазерного облучения при мощности излучения 3,2 Вт (а) и от мощности лазерного излучения (б) для длин волн 1,94 (черные квадраты) и 0,98 мкм (красные круги).

Эксперименты с использованием в качестве биомодели тканей печени свиньи *in vitro* показали следующее. При использовании режима умеренного нагрева (2-3 Вт) на длине волны 0,98 мкм имеет место процесс коагуляции ткани без ее карбонизации (рис. 4, а). Граница области коагуляции наблюдается по

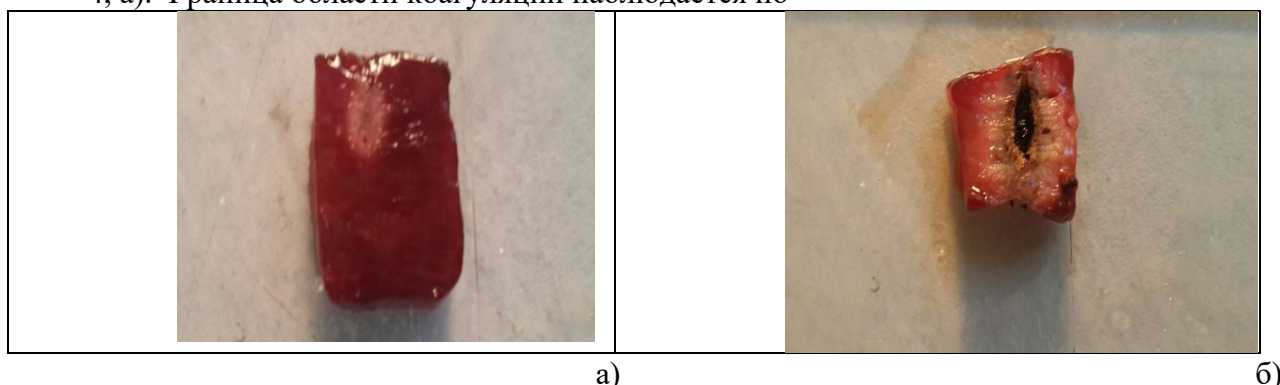


Рис. 4. Характер теплового воздействия на образцы тканей печени *in vitro* для длин волн 0,98 (а) и 1,94 мкм (б).

характерному бледному оттенку ткани. Для длины волны 1,94 мкм, при тех же условиях облучения, в центре образца (рис. 4, б) образовывалась зона обугливания (карбонизации). Время облучения составляло 2 минуты, мощность излучения – 2,5 Вт. Границе между необлученной и термически модифицированной ткани соответствует температура коагуляции белков ткани.

Ниже, на рис.5, показано изменение объема коагуляции ткани печени в зависимости от вложенной энергии лазерного излучения для двух длин волн: 1,94 и 0,98 мкм. Как и в случае белковой биомодели объем образованного коагулята в печени для длины волны 1,94 мкм значительно превосходит объем, получаемый при облучении печени на длине волны 0,98 мкм.

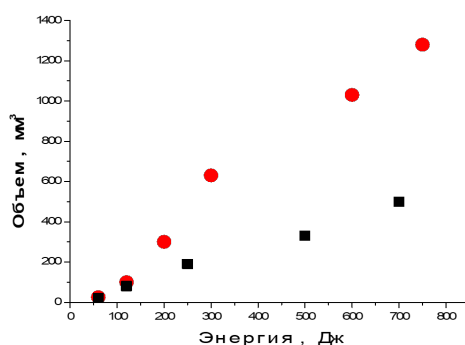


Рис.5. Зависимость объема коагулята печени от вложенной энергии лазерного излучения. Длина волны 0,98 мкм – черные квадраты, 1,94 мкм – красные круги.

Выводы.

Исследованы особенности образования коагулируемых объемов при тепловом воздействии лазерного излучения с длинами волн 0,98 и 1,94 мкм в двух типах биомоделей при подводе излучения к объекту воздействия с помощью оптических волокон с плоским торцом. Показано, что объем коагулята зависит от мощности и времени лазерного облучения. Скорость образования коагулята на длине волны 1,94 мкм на порядок больше, чем для длины волны 0,98 мкм. Это обусловлено существенным различием коэффициентов поглощения излучения для этих длин волн. Объем образованного коагулята в образцах печени *in vitro* для длины волны 1,94 мкм значительно превосходит объем, получаемый при облучении печени на длине волны 0,98 мкм. При умеренном нагреве объема образцов печени на длине волны 0,98 мкм имеет место процесс коагуляции ткани без ее карбонизации. Для длины волны 1,94 мкм в центре образца формируется зона обугливания (карбонизации). Объем образованного коагулята в печени для длины волны 1,94 мкм значительно превосходит объем, получаемый при облучении печени на длине волны 0,98 мкм.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

Заключение

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

Показано, что особенностью коагуляции биомоделей на длине волны 0,98 мкм является наличие выраженного порога коагуляции. Порог коагуляции для длины волны 1,94 мкм значительно меньше. Скорость образования коагулята на длине волны 1,94 мкм на порядок больше, чем для длины волны 0,98 мкм.

При умеренном нагреве объема образцов печени *in vitro* на длине волны 0,98 мкм происходит коагуляция ткани без ее карбонизации. Для длины волны 1,94 мкм в центре образца формируется зона обугливания (карбонизации). Объем образованного коагулята в печени для длины волны 1,94 мкм значительно больше объема, образованного при облучении печени на длине волны 0,98 мкм

Литература.

1. A.C. Steger, W. R. Lees, K. Walmsley, and S. G. Bown. *Interstitial laser hyperthermia: a new approach to local destruction of tumours.* // *BMJ*, 1989, 299 (6695), P. 362–365.
2. Фрадкин С.З. Современное состояние гипертермической онкологии и тенденции ее развития. // *Медицинские новости*, 2004, № 3, С. 3–8.
3. Van der Zee J. *Heating the patient: a promising approach?* // *Annals of Oncology*. 2002. V.13. P.1173–1184.

4. Мардынский Ю.С., Курпешев О.К., Ткачев С.И. Гипертермия как универсальный радиосенсибилизатор. // V Российская онкологическая конференция, М., 2001, <http://www.rosoncweb.ru/library/5th-conf/47.html>.
5. В.И. Чиссов. Онкология. Национальное руководство. // М., Геотар-Медиа, 2017, 544 с.
6. <https://zverovod.info/kury/sostav-yaytsa.html>
7. V.Tuchin. Tissue optics. Light scattering methods and instruments for medical diagnosis. // SPIE PRESS, Bellingham, Washington USA, 2007, 882 p.

Сведения об авторах

Александр Константинович Дмитриев,
н.с. ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН

Москва, Россия

Эл. почта: dmitriev_a62@mail.ru

Алексей Николаевич Коновалов,
с.н.с. ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН

Москва, Россия

Эл. почта: ank27.ift@mail.ru

Владимир Николаевич Кортунов,
н.с. ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН

Москва, Россия

Эл. почта: vncor@yandex.ru

Валерий Андреевич Ульянов,
к.т.н., в.н.с. ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН

Москва, Россия

Эл. почта: vaul595@mail.ru

Information about author

Alexander Konstantinovich Dmitriev,
researcher, IPT FRC “Crystallography and Photonics” RAS
Moscow, Russian Federation

E-mail: dmitriev_a62@mail.ru

Aleksey Nikolaevich Kononov,
senior researcher, IPT FRC “Crystallography and Photonics” RAS,

Moscow, Russian Federation

E-mail: ank27.ift@mail.ru

Vladimir Nikolaevich Kortunov,
researcher, IPT FRC “Crystallography and Photonics” RAS
Moscow, Russian Federation

E-mail: vncor@yandex.ru

Valery Andreevich Ulyanov,
leading researcher, IPT FRC “Crystallography and Photonics” RAS

Moscow, Russian Federation

E-mail: vaul595@mail.ru

УДК 577.336+ 57.01

ГРНТИ 34.17.53

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.191-195

А.В. Чаплыгина, В.И. Ковалев, Д.Ю. Жданова.

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

НАКОПЛЕНИЕ ЛИПОФУСЦИНА В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ 5xFAD КАК ПЕРИФЕРИЧЕСКИЙ БИОМАРКЕР БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

В статье обсуждается возрастное накопление печеночного липофусцина у животных, модели болезни Альцгеймера. Представлены оригинальные экспериментальные данные, показывающие различие в возрастном накоплении липофусцина в печени мышей 5xFAD и здоровых мышей.

Ключевые слова: липофусцин, болезнь Альцгеймера, 5xFAD, флуоресценция, периферические маркеры.

LIPOFUSCIN ACCUMULATION IN THE LIVER OF 5xFAD MICE AS A PERIPHERIC BIOMARKER OF ALZHEIMER'S DISEASE

This article discusses the age-related accumulation of hepatic lipofuscin in animals with a model of Alzheimer's disease. We present original experimental data showing a difference in the age-related accumulation of lipofuscin in the liver of 5xFAD mice and healthy mice.

Keywords: *lipofuscin, Alzheimer's disease, 5xFAD, fluorescence, peripheral markers.*

Введение.

Все больше данных свидетельствует о важной роли функции печени в патофизиологии болезни Альцгеймера (БА). Взаимодействия между изменениями периферической метаболической сети, центральными изменениями и временной шкалой патофизиологии БА показывают, что периферические метаболические изменения могут влиять на здоровье и функцию мозга в долгосрочной перспективе. [1, с. 965-984]. Так, нарушение передачи сигналов, энергетического метаболизма, воспаление и резистентность к инсулину играют роль в БА [2, с. S405-S426; 3, с. 187-198]. Многие метаболические расстройства, такие как диабет, гипертония, ожирение и дислипидемия также являются факторами риска развития БА [4, с. 300-330]. Считается, что нарушения в работе печени напрямую влияют на развитие БА. Скопление большого количества бета-амилоида в крови пациентов с БА сопровождается высокими концентрациями липопротеинов печени [5, e3001358]. Показана связь биохимических маркеров печени и установленных маркеров БА [6, e197978]. Эти данные подчеркивают важность печени в патофизиологических характеристиках БА.

Накопление внутриклеточного пигмента липофусцина является одним из биомаркеров старения организмов. Липофусцин (хотя данный термин не является самым удачным при описании всего многообразия внутриклеточных пигментов, часть из которых даже не содержит липидные включения) накапливается в течение всей жизни и в норме удаляется из организма под действием внутриклеточных протеаз и деградируется в лизосомах. Считается, что его сверхпродукция связана с нарушением клеточной аутофагии, дисфункцией клеточных органелл и окислительным стрессом.

Хотя, считается, что липофусцин – маркер стареющих клеток, последние работы показывают его тесную связь с патологическим тау-белком и бета-амилоидом при БА [7, с. 1107–1116; 8, с. 464]. Более того, самое новое исследование, показывает, что альфа-структуры белкового липофусцина являются токсическим компонентом бета-амилоидных бляшек [9, с. 429-438]. Это говорит о белковом липофусцине как о перспективном маркере не только нарушения биогенеза митохондрий, но и ранних стадий БА.

Цель работы.

Наше исследование посвящено сравнению уровня белкового липофусцина в гомогенатах печени трансгенных 5xFAD мышей, являющихся моделью БА, и нетрансгенных мышей разных возрастов.

Материалы и методы.

Работа проводилась на гомогенатах печени трансгенных мышей линии 5xFAD (Tg) и здоровых контрольных нетрансгенных мышках-однопотомках (nTg). Трансгенные животные линии 5xFAD характеризуются ранним выраженным амилоидогенезом в головном мозге, поскольку в своем геноме несут шведскую (K670N/M671L), флоридскую (I716V) и лондонскую (V717I) мутации белка предшественника бета-амилоида человека APP (695), а также M146L и L286V мутации в гене пресенилина 1. В исследовании использовались животные возрастом 1 день, 4 месяца и 15 месяцев.

Печень животных выделяли в среде 250 мМ Сахарозы, 0,5 мМ EGTA, 10 мМ Перес (рН 7,0), продавливая через пресс и гомогенизируя в стеклянном гомогенизаторе с тefлоновым пестиком в результате чего происходило полное разрушение тканей и крупных частиц, затем расфасовывали на льду в пробирки по 1 мл, замораживали и далее использовали для опытов. Все пробы выравнились по концентрации белка (0,3 мг/мл) с помощью ультрафиолет-экспресс-метода по оптической плотности в ультрафиолете при 286 нм. Определение содержания липофусцина и запись флуоресцентных спектров проводилось с помощью сканирующего спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, USA) в 1-сантиметровых кварцевых кюветах при 20°C и нормальном парциальном давлении кислорода. Количественные цифры по содержанию липофусцина получали в условиях разрушения агрегатов детергентом додецилсульфатом натрия, который дезинтегрирует белковые комплексы, разрушая клеточные мембраны, но не разрушает липофусцин, так как между денатурированными белками в липофусцине имеются прочные химические связи типа конъюгатов шиффовых оснований. Добавление детергента в наших опытах позволяет уменьшать светорассеяние, напрямую влияя на запись спектральных характеристик. Образование липофусцина детектировалось по характерной полосе флуоресценции в районе 460 нм при возбуждении в области 360 нм.

Обработку данных производили с помощью программы Sigma Plot 12.5. Значения в графиках являются усредненными спектрами по всем экспериментам. Для проверки гипотезы о нормальном распределении использовался тест Шапиро-Уилка. Оценка различий между попарными выборками проведена с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

Полученные результаты.

Одним из важных свойств липофусцина является его интенсивная флуоресценция в синей области при возбуждении в близкой ультрафиолетовой области. На рис. 1 А показаны спектры излучения в синей области детергентных гомогенатов печени мышей при возбуждении 360 нм.

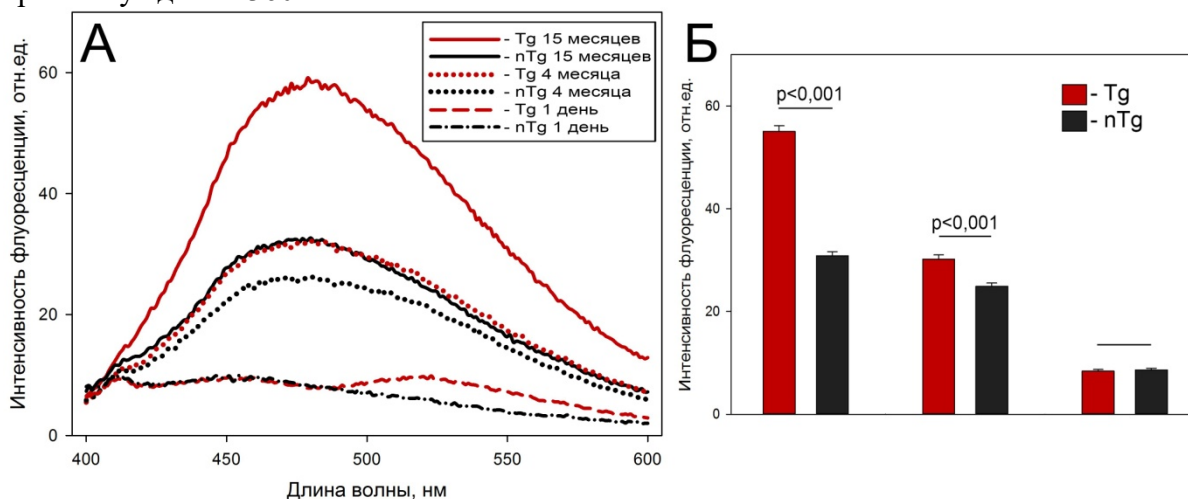


Рисунок 1. А – Спектры липофусциновой флуоресценции гомогенатов печени Tg и nTg животных разных возрастов (360/460).

Б – Разница в интенсивности липофусциновой флуоресценции в максимуме 460 нм между группами Tg и nTg животных разных возрастов.

Максимумом для липофусциновой флуоресценции является длина волны в 460 нм. Для данной длины волны не было обнаружено разницы в интенсивности липофусциновой флуоресценции новорожденных животных 5xFAD и нетрансгенных мышей-однопометников (Tg $8,384 \pm 1,586$ отн.ед., nTg $8,634 \pm 1,626$ отн.ед.). Следующие данные (рис. 1 Б) подтверждают роль липофусцина как биомаркера старения: интенсивность его флуоресценции увеличивается с возрастом как у Tg, так и у nTg животных. При этом стоит отметить, что у животных в возрасте 4 месяцев уже наблюдается различие в

уровне липофусцина. Интенсивность его флуоресценции у Tg животных составляет $30,183 \pm 4,196$ отн.ед. против $24,907 \pm 3,104$ отн.ед. у nTg животных. При старении животных (группа 15 месяцев) наблюдалось значительное увеличение интенсивности липофусциновой флуоресценции у Tg животных $55,063 \pm 5,505$ отн.ед., при этом уровень липофусциновой флуоресценции у nTg животных составлял всего $30,802 \pm 4,315$ отн.ед. Используемые в исследовании трансгенные мыши линии 5XFAD широко применяются в качестве модели наследственной формы БА и характеризуются ранним выраженным амилоидогенезом в головном мозге. Уже к четырём месяцам у животных наблюдается накопление высоких уровней бета-амилоида, а также синаптическая дегенерация, потеря нейронов и дефицит в пространственном обучении, а к шести месяцам амилоидные бляшки и глиоз обнаруживаются в коре головного мозга и гиппокампе. Мы полагаем, что уровень периферического липофусцина в некоторой степени также отражает процесс их ускоренного старения и является одним из дегенеративных изменений, присущих БА.

Выводы.

Результаты этого исследования позволяют предположить, что липофусцин, в целом являющийся маркером старения и дегенерации, связан с диагнозом БА. Патологическое накопление липофусцина в печени также может свидетельствовать о дополнительной метаболической нагрузке на печень, обеспечивающей утилизацию токсических продуктов головного мозга больных БА. Хотя наши результаты предполагают важную роль печени в патофизиологических характеристиках БА, причинно-следственные пути еще предстоит выяснить.

Заключение

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

Впервые было измерено содержание флуоресцентного пигмента липофусцина в гомогенатах печени мышей 5xFAD – модели БА, а также здоровых мышей однопометников разных возрастов. Полученные данные показывают, что накопление печеночного липофусцина можно рассматривать как периферический маркер при БА.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00485.

Литература.

1. Toledo J.B., Arnold M., Kastenmüller G., Chang R. et al. *Metabolic network failures in Alzheimer's disease: A biochemical road map* // *Alzheimer's & Dementia*. 2017. V. 13. P. 965-984.
2. Clarke J.R., Ribeiro F.C., Frozza R.L., De Felice F.G., Lourenco M.V. *Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease: from basic neurobiology to clinical approaches* // *J Alzheimers Dis*. 2018. V. 64. № 1. P. S405-S426.
3. Kapogiannis D., Mattson M.P. *Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease* // *Lancet Neurol*. 2011. V. 10. № 2. P. 187-198.
4. Craft S. *The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged* // *Arch Neurol*. 2009. V. 66. № 3. P. 300-305.
5. Lam V., Takechi R., Hackett M.J., Francis R., Bynevelt M., Celliers L.M., et al. *Synthesis of human amyloid restricted to liver results in an Alzheimer disease-like neurodegenerative phenotype* // *PLoS Biol*. 2021. V. 19. № 9. P. e3001358.
6. Nho K., Kueider-Paisley A., Ahmad S., et al. *Association of Altered Liver Enzymes With Alzheimer Disease diagnosis, cognition, neuroimaging measures, and cerebrospinal fluid biomarkers* // *JAMA Netw Open*. 2019. V. 2. № 7. P. e197978.
7. Dehkordi S.K. et al. *Profiling senescent cells in human brains reveals neurons with CDKN2D/p19 and tau neuropathology* // *Nat. aging*. 2021. V. 1. № 12. P. 1107–1116.
8. Moreno-García A. et al. *An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related*

Neurodegeneration // Front. Neurosci. 2018. Vol. 12. P. 464

9. *Serwer P., Wright E.T., Hunter B. Additions to Alpha-Sheet Based Hypotheses for the Cause of Alzheimer's Disease // J Alzheimers Dis. 2022. V. 88. № 2. P. 429-438.*

Сведения об авторах

Алина Вадимовна Чаплыгина

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пуцино, Россия

e-mail: shadowhao@yandex.ru

Владимир Игоревич Ковалев

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пуцино, Россия

e-mail: ladiko@post.com

Дарья Юрьевна Жданова

Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Пуцино, Россия

e-mail: ddzhdanova@mail.ru

Information about author

Alina Vadimovna Chaplygina

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russia*

e-mail: shadowhao@yandex.ru

Vladimir Igorevich Kovalev

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russia*

e-mail: ladiko@post.com

Daria Yurievna Zhdanova

*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
Pushchino, Russia*

e-mail: ddzhdanova@mail.ru

УДК 575.17:599.9

ГРНТИ 34.23.35

DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.195-201

Удина И.Г.¹, Грачева А.С.^{1,2}, Васильев Ю.А.³,
Гуленко О.В.,³ Курбатова О.Л.¹

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

²НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского
ФНКЦ РР,

³Кубанский государственный медицинский университет,

ГЕНЕТИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКИЙ ПОДХОД ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СУДЕБНЫХ БАЗ ДАННЫХ ДЛЯ НАСЕЛЕНИЯ МЕГАПОЛИСА

Продемонстрирован генетико-демографический подход при создании судебной референтной базы данных на примере трех поколений мужского населения Москвы по гаплогруппам Y-хромосомы. Полученные результаты демонстрируют необходимость генетико-демографического анкетирования при формировании референтных баз данных для населения мегаполиса и важность возрастного фактора.

Ключевые слова: *судебные референтные базы данных, мегаполис, гаплогруппы Y-хромосомы, миграция, поколение, анкетирование.*

Udina I.G.¹, Gacheva A.S.^{1,2}, Vasiliev Yu.A.³, Gulenko O. V.,
³ Kurbatova O.L.¹¹ N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian academy of sciences,² V.A. Negovskii Research Institute of general resuscitation.,³ Kubanskii State Medical University**GENETIC DEMOGRAPHIC APPROACH FOR CREATING FORENSIC DATA BASES FOR POPULATION OF MEGALOPOLIS**

Genetic demographic approach for creating forensic reference data base on an example of three generations of male population of Moscow by haplogroups of Y-chromosome was demonstrated. Obtained results demonstrate necessity of genetic demographic questionnaire data collection for creating reference data bases for population of megalopolis and importance of age factor.

Keywords: forensic reference data base, megalopolis, haplogroups of Y-chromosome, migration, population, generation. questionnaire data.

Введение.

Известно, что базы данных, которые могут быть позиционированы как судебные генетические базы для ДНК-идентификации или популяционные референтные судебные базы ДНК-маркеров, необходимы для оценки вероятности случайного совпадения генотипа исследуемого биологического образца субъекта при проведении судебных экспертиз по идентификации личности (для задач криминалистики при установлении преступника или при установлении жертв терактов, техногенных и природных катастроф, погибших на войне, а также при установлении отцовства, материнства и других родственных отношений) методами анализа ДНК [1]. Разрешающая способность применяемых технологий весьма высока и достаточна для решения задач по ДНК-идентификации личности и установлению родства. Для обеспечения надежности и истинности установления личности на основе анализа ДНК вероятность случайного совпадения генотипа, определенного по изученным молекулярным маркерам в исследуемом образце, с генотипом другого человека в популяции вычисляется на основе данных о частотах встречаемости соответствующих молекулярно-генетических маркеров в конкретной популяции, представителя которой и идентифицируют с помощью анализа ДНК. Референтная база данных может быть эквивалентна репрезентативной популяционной базе данных, в которой представлены информативные для проведения судебной экспертизы ДНК-маркеры с целью проведения ДНК-идентификации личности. В качестве таких маркеров используют панели из аутосомных STR-маркеров, гаплогруппы мтДНК и Y-хромосомы. В Интернете сосредоточены базы данных по Y-хромосоме, мтДНК и по аутосомным (судебным) STR; их перечень и адреса размещены на сайте: https://isogg.org/wiki/DNA_databases [2].

Особенности генетико-демографических процессов в мегаполисах обуславливают повышенную сложность создания референтных баз данных для населения мегаполисов. В первую очередь, сложность обусловлена огромным размером популяции, смешанным характером населения в результате межнациональных браков, интенсивным притоком мигрантов разных национальностей, их неравномерным естественным приростом, неравномерностью расселения представителей разных этноконфессиональных и профессиональных групп по городской территории, вплоть до формирования этнических кварталов, консолидацией этнических диаспор за счет предпочтения браков среди «своих», т.е. внутри этнических диаспор. Внешняя (центростремительная) миграция в мегаполис приводит к повышению генетического разнообразия в мегаполисе, особенно, если мигранты происходят из отдаленных регионов с населением, сильно отличающимся от основного населения мегаполиса [3]. В качестве данных о населении мегаполиса

помимо генетико-демографического анкетирования используют данные официальной статистики и переписей [4].

Миграция является основным генетико-демографическим процессом, влияющим на генофонд мегаполиса и, вследствие неблагоприятия процессов естественного воспроизводства, служит основным источником роста населения [3]. Изучение молекулярно-генетических маркеров, которые передаются по женской и мужской линиям, например, гаплогруппы мтДНК и Y-хромосомы, представляют особый интерес. С помощью таких маркеров можно охарактеризовать приток в генофонд мегаполиса не характерных для коренного населения маркеров и рассмотреть динамику маркеров в поколениях под действием миграции (с учетом различий миграционных потоков по полу). Для мегаполисов актуальна и проблема создания популяционных референтных судебных баз данных по ДНК-маркерам, включая маркеры, которые передаются только по мужской или женской линии, которые востребованы не только для ДНК-идентификации личности, но и для установления родства. На основе молекулярных маркеров мировое разнообразие Y-хромосомы человека в настоящее время довольно хорошо изучено, варианты Y-хромосом представлены в базах данных [5-7].

Наиболее ярким примером применением маркеров Y-хромосомы в целях криминалистики служит установление личности террориста-смертника, устроившего взрыв в аэропорту «Домодедово». Определение гаплогруппы Y-хромосомы в образце, полученном в аэропорту, позволило установить географический регион происхождения лица, а в дальнейшем и идентифицировать террориста [8]. Следует заметить, что изучение маркеров Y-хромосомы весьма эффективно для установления происхождения при смешении различных по происхождению потоков населения на примере Аргентины [9] или установлении древних миграций на примере Иране [10], что отчасти сходно с происходящим в генофондах мегаполисов.

Целью данного исследования была демонстрация необходимости генетико-демографического подхода при формировании судебных референтных баз данных для мегаполиса на примере профиля частот гаплогрупп Y-хромосомы в трех поколениях населения Москвы и особенностей изменения профиля частот гаплогрупп в поколениях под действием миграции.

Материалы и методы.

Изучены мужские выборки москвичей из трех поколений. Выборка АМ содержит данные о москвичах, средний год рождения которых – 1949 ± 2 ; выборка БМ содержит данные о новорожденных, родившихся в Москве в 2017-2018 гг.; выборка ВМ содержит данные о мужчинах в среднем 1985 года рождения. Эти три выборки представляют три поколения москвичей, которые можно рассматривать как поколения: «деды» (АМ), «родители» (БМ) и «дети» (ВМ). Проведено генетико-демографическое анкетирование и генотипирование по 18 STR Y-хромосомы, по которым с помощью Интернет-предиктора определены гаплогруппы Y-хромосомы [11]. В качестве STR-маркеров NRY (нерекombинирующей области Y-хромосомы) использованы 18 STR (*DYS389I*, *DYS389II*, *DYS390*, *DYS19*, *DYS385A*, *DYS385B*, *DYS456*, *DYS437*, *DYS438*, *DYS447*, *DYS448*, *DYS449*, *DYS391*, *DYS392*, *DYS393*, *DYS439*, *DYS635* и *DYS576*). Установлены характерные особенности профилей частот гаплогрупп Y-хромосомы в поколениях населения мегаполиса, обусловленные миграцией населения в мегаполис. Статистическая обработка проведена по алгоритмам программы “Statistica.” Анализ генетико-демографических данных, полученных в результате анкетирования, проведен параллельно с анализом изученных молекулярно-генетических маркеров, которые позволяют маркировать миграционные потоки.

Полученные результаты.

В целом, выявленные частоты в выборках из жителей г. Москвы соответствуют частотам, характерным для русского населения [12, 13]. Следующие гаплогруппы Y-

хромосомы выявлены во всех выборках Москвы: R1a, R1b, E1b1b, N, T, I1b и I2, а также J1 и J2 [14]. В отношении спектра присутствующих гаплогрупп и их частотного профиля изученные выборки из населения г. Москвы различаются. Два старших поколения достоверно отличаются от младшего поколения по профилю частот гаплогрупп Y-хромосомы ($G=18,0593$, $d.f.=8$, $P<0,025$), по присутствию гаплогруппы N ($G=7,2455$, $d.f.=1$, $P<0,01$), а также по представленности «южных по происхождению» гаплогрупп Y-хромосомы (C3, G2a, G2c, H, J1, J2, L, O2, O3, Q, R2 и T) ($G=9,6243$, $d.f.=1$, $P<0,005$). В младшем поколении представлен 21,1% «южных по происхождению» гаплогрупп с наиболее разнообразным спектром этих гаплогрупп. Выявленные особенности частотных профилей по гаплогруппам Y-хромосомы для представителей мужского населения Москвы обусловлены миграционными процессами и согласуются с определенными по анкетным данным оценками коэффициентов миграции в поколениях г. Москвы и с данными анкет об этнической принадлежности жителей мегаполиса [15].

Таким образом, установлены характерные спектры и профили частот Y-хромосомы для выборок жителей Москвы из разных поколений жителей Москвы и продемонстрирована гетерогенность разных поколений москвичей в отношении гаплогрупп Y-хромосомы, а также прослежена динамика накопления в поколениях не характерных ранее гаплогрупп Y-хромосомы - «южных по происхождению гаплогрупп»), привносимых в популяцию с потоками мигрантов [14]. В поколениях мегаполиса с помощью изучения гаплогрупп Y-хромосомы можно выявлять изменения в генофонде населения мегаполиса как по спектру, так и по профилю частот гаплогрупп под действием миграции, которая обуславливает замену исходного генофонда населения мегаполиса. Генетико-демографическое анкетирование позволяет оценивать этническую принадлежность как жителей Москвы, так и их предков в ближайших поколениях. Молекулярные маркеры служат надежным инструментом с высокой разрешающей способностью для прослеживания миграционных потоков.

С применением анализа генетико-демографического анкетирования проведено исследование в выборках из трех поколений с учетом этнической принадлежности предков, которое позволило вычлнить в каждом поколении выборки жителей, для которых по результатам анкетирования не выявлены представители других национальностей, кроме преобладающей в изученном мегаполисе - русской. Для двух старших поколений процент русских в выборках составил 75%, а для младшего поколения этот процент составил всего 21%. Полученные таким образом выборки в среднем содержат на 5,2% меньше «южных по происхождению» гаплогрупп, что подтверждает (помимо особенностей географического распространения) их накопление в популяции в поколениях населения мегаполиса за счет притока мигрантов. В суммарной выборке из русских всех трех поколений доля «южных по происхождению» гаплогрупп составила 7,6%. В исходных выборках доля «южных по происхождению» гаплогрупп в поколении «дедов» составила 6,2%, в поколении «отцов» - 11% и 21,1% в поколении «детей». Следует отметить, что «южные по происхождению» гаплогруппы чаще присутствуют в генофонде жителей Москвы, имеющих нерусских предков по мужской линии в предыдущих поколениях. Однако, присутствие «южные по происхождению» гаплогрупп по ряду причин не всегда можно подтвердить за счет данных анкетирования. В мегаполисах происходит накопление не характерных ранее для населения мегаполиса гаплогрупп Y-хромосомы в поколениях за счет миграции. Понятно, что формирование референтных баз для мегаполисов необходимо проводить с учетом генетико-демографических процессов в мегаполисах, в первую очередь, миграции, Генетико-демографическое анкетирование является необходимым инструментом при формировании референтных баз данных. Только применение такого генетико-демографического подхода позволит сформировать надежные референтные базы для применения для ДНК-идентификации личности в криминалистике, а также проводить их своевременную актуализацию и обновление.

Выводы.

С помощью генетико-демографических параметров, характерных для каждого мегаполиса, возможно в дальнейшем прогнозировать динамику частот конкретных гаплогрупп Y-хромосомы в генофонде мегаполиса в поколениях с учетом миграционных процессов. Определение частот Y-хромосомы в отдельных поколениях населения мегаполиса важно для формирования популяционных референтных баз данных, необходимых для вычисления оценок вероятности при проведении ДНК-идентификации личности для жителей мегаполиса, и их обновления. Референтные популяционные базы данных по судебным молекулярным маркерам востребованы как для решения задач по определению родства и установлению отцовства, так и для задач криминалистики, включая не только уголовные случаи, но и установление личности жертв техногенных и природных катастроф.

Заключение.

Авторы считают, что новизна данного исследования состоит в том, что наглядно продемонстрирована необходимость применения генетико-демографического подхода при создании актуальных популяционных референтных баз ДНК-данных в мегаполисах, который позволяет учитывать выявленные особенности изменений в генофонде по поколениям населения мегаполиса под действием миграционных процессов. При создании популяционных референтных баз данных для проведения ДНК-идентификации в мегаполисах необходимо проведение генетико-демографического анкетирования одновременно с молекулярно-генетическим анализом для изучения ДНК-маркеров с высокой разрешающей способностью за счет специфики маркеров и особенностей их географического распространения в регионах, являющихся источниками миграционных потоков в мегаполис.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследование одобрено Этическим комитетом ИОГен РАН. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие (в выборке новорожденных согласие было получено от их матерей). Демографические данные, полученные в результате анкетирования, и результаты исследования представлены и хранятся в анонимной (обезличенной) форме.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Исследование проведено в рамках темы государственного задания ИОГен РАН № 0112-2019-0001 «Геномные исследования и генетический полиморфизм клетки, организма и популяции».

Литература.

1. Цыбовский И.С., Веремейчик В.М., Котова С.А., Крицкая С.В., Евмененко С.А., Удина И.Г. Создание судебной референтной базы данных по 18 аутосомным STR для ДНК-идентификации в Республике Беларусь. *Генетика*. 2017. № 2. С. 249-258. DOI: 10.7868/S0016675817020138. (Вариант. Tsybovskii I.S., Vere-meichik V.M., Kotova S.A., Kritskaya S.V., Evmenenko S.A., and Udina I.G. Developing Forensic Reference Database by 18 Autosomal STR for DNA Identification in Republic of Belarus. *Russian Journal of Genetics*, 2017, Vol. 53, No. 2, pp. 275–284. DOI: 10.1134/S1022795417020132)
2. https://isogg.org/wiki/DNA_databases Список баз данных по аутосомным STR, гаплогруппам мтДНК и Y-хромосомы. (дата обращения 30.08.2019).
3. Курбатова О.Л., Янковский Н.К. Миграция – основной фактор популяционной динамики городского населения России // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 7. С. 831-851. (Вариант. Kurbatova O.L., Yankovsky N.K. Migration as the Main Factor of the

- Russia's Urban Population Dynamics // Russian J. Genetics. 2016. V. 52. №7. P. 726–745.) doi: 10.7868/S0016675816070067*
4. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Веремейчик В.М., Прудникова А.С., Атраментова Л.А., Цыбовский И.С., Удина И.Г. Особенности генетико-демографических процессов в населении трех мегаполисов в связи с проблемой создания генетических баз данных // *Генетика. Т. 49. № 4. 2013. С. 513-522. DOI: 10.7868/S0016675813040085*
 5. Hammer M.F., Chamberlain V.F., Kearney V.F., Stover D., Zhang G., Karafet T., Walsh B., Redd A.J. Population structure of Y-chromosome SNP haplogroups in the United States and forensic implications for constructing Y-chromosome STR databases // *Forensic Sci Int. 2006. 1; 164(1), 45-55. doi: 10.1016/j.forsciint.2005.11.013*
 6. Purps J., Siegert S., Willuweit S., Nagy M., Alves C., et al. A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci // *Forensic Sci Int Genet. 2014. 12(100), 12-23. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.04.008*
 7. de Knijff P. (2022) On the forensic use of Y-chromosome polymorphisms // *Genes (Basel). 17;13(5), 898. doi: 10.3390/genes13050898*
 8. Боринская С.А., Балановский О.П., Курбатова О.Л., Янковский Н.К. По следам ДНК: как генетика народонаселения помогает криминалистике // *Природа. 2020. № 11. С. 3–14. DOI: 10.7868/S0032874X20110010*
 9. Caputo M., Sala A., Corach D. Demand for larger Y-STR reference databases in ethnic melting-pot countries: Argentina as a test case // *Int J Legal Med. 2019. 133(5), 1309-1320. doi: 10.1007/s00414-019-02012-5*
 10. Grugni V., Battaglia V., Hooshiar Kashani B., Parolo S., Al-Zahery N., Achilli A., Olivieri A., Gandini F., Houshmand M., Sanati M.H., Torroni A., Semino O. (2012). Ancient migratory events in the Middle East: new clues from the Y-chromosome variation of modern Iranians // *PLoS One. 7(7), e41252. doi: 10.1371/journal.pone.0041252*
 11. Whit Athey's Haplogroup Predictor. – URL: <http://www.hprg.com/hapest6/hapest6G2a/hapest6.htm?order=orig> (дата обращения 29.08.2019).
 12. Балановская Е.В., Балановский О.П. Русский генофонд на русской равнине. –М: Луч, 2007. – 416 с.
 13. Балановский О.П. Генофонд Европы. Москва: Товарищество науч. изд. КМК. 2015. 353 с.
 14. Удина И. Г., Грачева А. С., Курбатова О. Л. Частоты гаплогрупп Y-хромосомы и процессы миграции в трех поколениях жителей Москвы // *Генетика. 2022 Т.58. №11. С. 1325-1333. DOI:10.31857/S001667582110121*
 15. Курбатова О.Л., Грачева А.С., Победоносцева Е.Ю., Удина И.Г., Генетико-демографические параметры населения г. Москвы. Миграционные процессы. *Генетика. 2021. Т. 57. № 12. С. 1438-1449. (Вариант. Kurbatova O.L., Gracheva A.S., Pobedonostseva E.Yu., Udina I.G. Genetic demography of the population of Moscow: migration processes // Russian Journal of Genetics, 2021. - Vol. 57. N. 12. p. 1443-1453. DOI: 10.1134/S1022795421120085)*

Сведения об авторах

Ирина Геннадьевна Удина
 доктор биол. наук, доцент. Рук. группы, глвный научный сотрудник
 Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
 РАН
 Москва, Россия
 Эл. почта: irina_udina@mail.ru

Information about author

Irina Gennadyevna Udina
 Doctor of Science (Biol.), Associate professor,
 Head of group of population immunogenetics, Chief scientist
 N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences
 Moscow, Russian Federation
 E-mail: irina_udina@mail.ru

Алеся Сергеевна Грачева

к.б.н., старший научный сотрудник
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
РАН
Москва, Россия
Эл. почта: palesa@yandex.ru

Alesya Sergeevna Gracheva

PhD (PhD (Biol.), Senior Scientist
Head of population immunogenetics group
N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences
Moscow, Russian Federation
E-mail: palesa@yandex.ru
Yurii Anatolievich Vasiliev
Associate professor
Kubanskii State Medical University
Krasnodar, Russian Federation
Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Юрий Анатольевич Васильев

доцент
Кубанский государственный медицинский университет
Краснодар, Россия
Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Olga Vladimirovna Gulenko

Doctor of Science (Med.), Associate professor,
Kubanskii State Medical University
Krasnodar, Russian Federation
Эл. почта: ogulenko@yandex.ru

Ольга Владимировна Гуленко

Д. мед. наук, доцент
Кубанский государственный медицинский университет
Краснодар, Россия
Эл. почта: ogulenko@yandex.ru

Ольга Леонидовна Курбатова

Д. биол. наук, главный научный сотрудник,
Руж.гр.
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
РАН
Москва, Россия
Эл. почта: okurbat@list.ru

Olga Leonidovna Kurbatova

Doctor of Science (Biol.), Associate professor,
Head of group of demographic genetics, Chief scientist
N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences
Moscow, Russian Federation
E-mail: okurbat.list.ru

УДК 616.36-008.5 - 053.31, 616.2- 022.8-085
ГРНТИ 76.01.73
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.201-205

**Я.В. Клименко¹, Е.Ю. Плотникова^{1,2},
И.И. Павлюченко¹, Ю.А. Васильев¹,
А.П. Столярова¹, Л.Г. Акобян¹**

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России
²ГБУЗ "Родильный дом города Краснодара" МЗ КК

РОЖДАЕМОСТЬ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬЮ ПОЛИНОЗОМ И ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИЕЙ НОВОРОЖДЕННЫХ В Г. КРАСНОДАРЕ ПО ДАННЫМ ГБУЗ РОДИЛЬНЫЙ ДОМ Г. КРАСНОДАРА МЗ КК В ДИНАМИКЕ 5 ЛЕТ

В статье представлены результаты ретроспективного анализа статистических данных по рождаемости и смертности новорожденных, количественного состава лиц с аллергопатологией и гипербилирубинемией новорожденных, зафиксированных в ГБУЗ Родильный дом г. Краснодара МЗ КК в динамике 3 лет.

Ключевые слова: Краснодар, гипербилирубинемия новорожденных, неонатальная желтуха, аллергия, рождаемость, заболеваемость.

	<p>Ya.V. Klimenko¹, E.Yu. Plotnikova^{1,2}, I.I. Pavlyuchenko¹, Yu. A. Vasiliev¹, A.P. Stolyarova¹, L.G. Hakobyan¹ ¹Kuban State Medical University ²Maternity hospital of the city of Krasnodar</p>
--	---

BIRTH RATE AND PREVALENCE OF ALLERGY AND JAUNDICE SYNDROME IN THE KRASNODAR ACCORDING TO THE DATA OF THE STATE MEDICAL INSTITUTION MATERNITY HOSPITAL OF KRASNODAR IN THE DYNAMICS OF 5 YEARS

The article presents the results of a retrospective analysis of statistical data on the birth rate and mortality of newborns, the quantitative composition of persons with allergopathology and hyperbilirubinemia of newborns recorded in the Maternity Hospital of Krasnodar of the Ministry of Health of the CC in the dynamics of 3 years.

Keywords: *Krasnodar, hyperbilirubinemia of newborns, neonatal jaundice, allergy, fertility, morbidity.*

Введение

В настоящее время проблема рождаемости и смертности населения в стране и мире в целом является весьма актуальной, требующей постоянного мониторинга. Согласно данным Росстата, в России, в том числе Краснодарском крае, рождаемость неуклонно снижается. Так, в 2023 г. естественная убыль в России составила 24534 человек, а в Краснодарском крае – 2619 человек [1].

При этом, среди родившихся фиксируется тенденция прогрессирования риска заболеваемости в неонатальном периоде, приводящее, в последующем, к повышению уровня инвалидизации населения [2]. Глубокие изменения среды обитания человека, наблюдающиеся в последнее время, превышающие онто- и филогенетические детерминированные адаптационные возможности организма, превратились в реальную угрозу для здоровья и являются одной из причин выраженных метаболических сдвигов в организме. Это, как следствие, приводит к возникновению большого числа заболеваний и коморбидных состояний. Данные патологии, имеющие наследственную предрасположенность и развивающиеся в течении жизни, при соприкосновении с другими неблагоприятными факторами, являются предметами пристального изучения в рамках нового направления в науке и здравоохранении «экологической медицины» [3, 4].

Группа мультифакториальных заболеваний (МФЗ) относится к самой многочисленной и разнообразной группой болезней, составляя более 90% от всей соматопатологии человека. Данное заболевание характеризуется высокими темпами развития, приводящее к смертности и инвалидизации населения в современных популяциях [5]. Согласно данным медицинской Концепции развития здравоохранения 2020 года, цифры по количеству больных МФЗ продолжает увеличиваться [6].

В настоящее время среди новорожденных все чаще встречается такое МФЗ, как гипербилирубинемия (ГБ) новорожденных [7]. Основным фактором развития данной патологии выступает резус-изоиммунизация, которая, в основном, развивается при несовместимости крови матери и плода по антигену RhD. Также ГБ может прогрессировать при несовместимости крови матери и плода по антигенам С, с, Е, е. [8]. Гемолитическая болезнь новорожденного (ГБН) в РФ диагностируется приблизительно у 0,6%-1% новорожденных, при этом частота развития резусизоиммунизации за последние годы еще не имеет существенной тенденции к снижению [8].

Также к наиболее распространенным МФЗ, развитие которого напрямую зависит от генетических, а также средовых факторов относится поллиноз. Краснодарский край, в силу природно-географических особенностей региона, имеет широкое произрастание и распространение аллергенных растений, как основных экзогенных источников формирования и развития поллиноза. Важно отметить, по данным эпидемиологических исследований 80% населения с аллергопатологией имеют родственников с отягощенным аллергоanamнезом [9]. Даже у полностью здоровых родителей может быть ребенок с аллергией. Если отец страдает аллергией, риск заболевания может возрасть до 40%, а у матери, страдающей аллергией, риск аллергического заболевания ребенка увеличивается до 50% [9]. И если оба родителя страдают каким-либо аллергическим заболеванием, то необходимо учитывать будущую аллергию у их детей от 70 до 100% [9]. Из вышеуказанного следует, что на этапах беременности женщине с отягощенным аллергоanamнезом уже важно встать на учет на 11–12-й неделе беременности для контроля за состоянием здоровья.

Таким образом, исследование современного состояния вопроса развития и распространения рассматриваемых мультифакториальных патологий является весьма актуальным и требует тщательного анализа.

Цель исследования – ретроспективный анализ статистических данных рождаемости и смертности новорожденных, исследование количественного состава патологий (ГБ и АЗ) от общего числа новорожденных по данным ГБУЗ Родильный дом г. Краснодара МЗ КК в динамике 3 лет.

Материалы и методы

Проведен ретроспективный анализ данных по заболеваемости АЗ и ГБ, указанных в историях развития новорожденных с 01 февраля по 30 марта 2023 г. в подразделении ГБУЗ Родильный дом МЗ КК на ул. Комсомольской, 44. Материалами исследования также стали статистические данные по рождаемости и смертности новорожденных в ГБУЗ Родильный дом г. Краснодара МЗ КК в период с 01 января по 31 декабря 2020-2022 гг. Внесение данных в таблицу, построение графиков осуществлялось в программе «MS Excel 2010».

Полученные результаты

Проведен анализ статистических данных по рождаемости и смертности среди новорожденных, представленных ГБУЗ Родильный дом г. Краснодара МЗ КК в период 2020-2022 гг. (рис.1):

	2020 год	2021 год	2022 год	ВСЕГО
Детей всего, чел	5 788	6 077	5 571	17 436
Рождаемость, чел	5 768	6 050	5 553	17 371
Смертность, чел	20	27	18	65

Установлено, всего за наблюдаемый период было рождено 17436 новорожденных, из них мертворожденными – 65. Зафиксирован максимальный пик рождаемости и смертности в 2021 г. Общее количество новорожденных составило 6077 человек, 27 – мертворожденные. В 2020 г. и 2022 г. наблюдается падение рождаемости в среднем на 6,7% по сравнению с 2021 г. Это, возможно, обусловлено пандемией новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в 2020 г. и мировой обстановкой в 2022 г. По данным изучения литературы и источников СМИ, неуклонное снижение рождаемости фиксируется по всей стране, что требует особого внимания к данной проблеме со стороны государства.

Проведен ретроспективный анализ данных историй развития новорожденных по показателям рождаемости и заболеваемости такими МФЗ, как АЗ и ГБ, среди населения в одном из подразделений ГБУЗ Родильный дом г. Краснодара МЗ КК в период с 01.02 по 30.03.2023. Результаты представлены в табл.1:

Таблица 1 – Показатели статистических данных рождаемости и заболеваемости АЗ и ГБ

Всего новорожденных, чел	Рождаемость, чел.	Мертворожденные, чел	Пол новорожденных		АЗ в анамнезе у родителей, чел.				ГБ новорожденных, чел.	
			Мужской	Женский	Поллиноз	Аллергия на лекарственные средства	Пищевая аллергия	Другое	Физиологическая желтуха новорожденных	Гемолитическая болезнь новорожденных
104	103	1	55	48	5	4	2	1	34	17

в ГБУЗ Родильный дом г. Краснодара МЗ КК с 01.02 по 30.03.2023 г.

Установлено, в наблюдаемый период было рождено 104 ребенка, из них мертворожденные – 1 человек. 53,4% от общего числа рожденных составили мальчики, 46,6% – девочки. Частота встречаемости ГБ среди новорожденных составила 49,52%. При этом, физиологическая желтуха новорожденных преобладает над ГБН, составляя 66,67% от общего числа новорожденных с ГБ. АЗ в анамнезе была зафиксирована у 11,65% рожениц, из них, 5 (41,7%) матерей страдают поллинозом.

Таким образом, можно сказать, что количество новорожденных с патологиями гепатобилиарной системы составляют практически половину от всего количества младенцев, что говорит о высоком риске его возникновения среди рожениц и требует более обширного, тщательного анализа данной проблемы. Отмечается среди лиц с аллергопатологией преобладание заболеваемости поллинозом, что также требует более тщательного, всестороннего исследования данной проблемы, в том числе проведения аэропаллинологического мониторинга в Краснодарском крае.

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

1. Фиксируется снижение рождаемости в 2020 и 2022 г.
2. Наблюдается высокий риск возникновения ГБ новорожденных (49,52%).
3. Заболеваемость поллинозом превалирует среди аллергопатологий у рожениц ГБУЗ Родильный дом г. Краснодара МЗ КК (41,7%).
4. Необходимо дополнительное, всестороннее исследование распространения таких МФЗ, как ГБ и АЗ, в том числе проведение региональных аэропаллинологических исследований, своевременный контроль и реузс-профилактика матерей, входящих в группу риска (реузс-отрицательная кровь) в виде иммунизации на 26-27 неделе беременности.
- 5.

Список использованных источников

1. На каком месте среди регионов РФ оказалась Кубань по рождаемости и смертности [Электронный ресурс] // *Krasnodarmedia.su* URL : <https://krasnodarmedia.su/news/1477594/?ysclid=lgtmk3lj2o511138723> (дата обращения: 23.04.2023)
2. Капура Н.Г., Гнедько Т.В., Рожко Ю.В., Печкурова О.Н. Уровень неонатальной заболеваемости новорожденных, родившихся глубоко недоношенными // *Педиатрия: вчера, сегодня, завтра.* – 2019. - С. 81-83.
3. Казимирова О. В., Газалиева М. А. Перспективы изучения коморбидных состояний в клинической медицине // *Медицина и экология.* – 2017. – № 3. – С. 8-16.
4. Бурак И.И. Экологическая медицина. Учеб. пособие. Рекомендовано Центральным учебно-методическим Советом УО «ВГМУ» в качестве учебного пособия для студентов направления Лечебное дело – Витебск: ВГМУ, 2018. – 189 с.
5. Garudadri S. Targeting Chronic Obstructive Pulmonary Disease Phenotypes, Endotypes,

and Biomarkers // Am Thorac Soc. – 2018. – N 4. – S. 234-238.

6. Профилактика мультифакториальных заболеваний [Электронный ресурс] // Медицина: образование и инновации URL : http://med-obr.info/med-organisation/clear_cache=Y&ysclid=lgtn5kb4vr82751510 (дата обращения: 23.04.2023)

7. Азимова Н. Ш., Адашвиева М. А. Клинико-диагностические аспекты гипербилирубинемий новорожденных различного генеза // Студенческий научный форум – 2018 : материалы X Международной студенческой научной конференции (Москва, с 15 по 20 февраля 2018 г.). 2018. 91 с.

8. Резус-изоиммунизация. Гемолитическая болезнь плода – 2020 [Электронный ресурс] // Клинические рекомендации URL : http://di-suria.ru/_ld/9/993_kr20R55R56mz.pdf?ysclid=lfvbrj36sx864888623 (дата обращения: 22.04.2023)

9. Аллергические заболевания у детей [Электронный ресурс] // АКЦИС URL : <https://ak-sis-med.ru/novosti/polezno-znat/allergicheskie-zabolevaniya-u-detey/?ysclid=lgtniu3xw7751892301> (дата обращения: 22.04.2023)

Сведения об авторах

Яна Владимировна Клименко

Ассистент кафедры биологии с курсом медицинской генетики

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

Краснодар, Россия

Эл. почта: yana.klimenk@mail.ru

Екатерина Юрьевна Плотникова

Врач-неонатолог первой категории отделения новорожденных №1 ГБУЗ "Родильный дом города Краснодара" МЗ КК

Краснодар, Россия

Эл. почта: cat.roll@yandex.ru

Иван Иванович Павлюченко

Д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологии с курсом медицинской генетики ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

Краснодар, Россия

Эл. почта: inter-dekanat@mail.ru

Юрий Анатольевич Васильев

Ассистент кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

Краснодар, Россия

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Анастасия Петровна Столярова

Студентка 5 курса фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

Краснодар, Россия

Эл. почта: astoliarova@internet.ru

Леон Гургенович Акобян

Студент 1 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»

Краснодар, Россия

Эл. почта: LeonHakobyan@mail.ru

Information about author

Yana Vladimirovna Klimenko

Assistant of the Department of Biology with a course in Medical Genetics

Kuban State Medical University

Krasnodar, Russia

E-mail: yana.klimenk@mail.ru

Ekaterina Yurievna Plotnikova

Neonatologist of the first category of the Department of newborns № 1 of the Maternity Hospital of the city of Krasnodar

Krasnodar, Russia

E-mail: cat.roll@yandex.ru

Ivan Ivanovich Pavlyuchenko

Doctor of (Med.) Sciences, Professor, Head of the Department of Biology with the course of Medical Genetics of the Kuban State Medical University

Krasnodar, Russia

E-mail: inter-dekanat@mail.ru

Yuri Anatolyevich Vasiliev

Assistant of the Department of Public Health, Healthcare and History of Medicine of the Kuban State Medical University

Krasnodar, Russia

E-mail: yurii-59@mail.ru

Anastasia Petrovna Stolyarova

5th year student of the Faculty of Pharmacy of the Kuban State Medical University

Krasnodar, Russia

E-mail: astoliarova@internet.ru

Leon Gurgenovitch Hakobyan

1st year student of the Faculty of Medicine of the Kuban State Medical University

Krasnodar, Russia

E-mail: LeonHakobyan@mail.ru

УДК 616.716.8:616.831-005.1
ГРНТИ 76.00.00.
DOI 10.47501/978-5-6044060-3-8.206-212

И.А. Куликова¹, Т.И. Мурашкина², Е.А. Бадеева²,
Е.Ю.Плотникова¹, И.И. Павлюченко¹,
Ю.А. Васильев¹

¹Кубанский государственный медицинский университет,
²Пензенский государственный университет,

АСИММЕТРИИ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МЫШЕЧНОГО АППАРАТА ЧЕЛЮСТНО – ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ ПРИ ИНСУЛЬТАХ

В статье представлен обзор научных исследований, содержание которых отражает связь между челюстно – лицевой патологией, инсультами, причиной их возникновения, современными способами и средствами выявления.

Ключевые слова: челюстно-лицевая патология, асимметрия лица, инсульт, черепно – мозговой нерв

I.A. Kulikova¹, T.I. Murashkina², E.A. Badeeva², E.Yu. Plotnikova¹, I.I. Pavlyuchenko¹, Yu.A. Vasiliev¹

Kuban State Medical University, Krasnodar
Penza State University, Penza

ASYMMETRIES IN THE FUNCTIONING OF THE MUSCULOSKELETAL SYSTEM OF THE MAXILLOFACIAL REGION IN STROKES

The article presents an overview of scientific research, the content of which reflects the relationship between maxillofacial pathology, strokes, the cause of their occurrence, modern methods and means of detection.

Keywords: maxillofacial pathology, facial asymmetry, stroke, cranial nerve

Введение

Литературные данные свидетельствуют о значительной распространённости асимметрий в функционировании мышечного аппарата челюстно – лицевой области при инсультах различной этиологии. Эта проблема требует к себе повышенного внимания в виде поиска путей раннего и эффективного выявления соответствующих клинических проявлений в целях своевременной диагностики, устранения нарушений, возможной коррекции лечения и реабилитационно – оздоровительных мероприятий.

Цель работы.

Установление этиологии различных вариантов лицевой асимметрии и соответствующей клинической симптоматики каждого из них при ишемическом и геморрагическом инсультах, рассмотрение методов их диагностики. Авторы считают актуальным усовершенствование известных и создание новых диагностических средств, рассматривают возможность их разработки и внедрения в практику.

Материалы и методы.

Был проведен анализ источников литературы о факторах возникновения и видах инсульта, способах и средствах его диагностики в базах данных Scopus, Web of Science, MEDLINE/PubMed, CyberLeninka и E-library с использованием ключевых слов «челюстно-лицевая патология», «асимметрия лица», «инсульт», «черепно-мозговой нерв». Из общего числа найденных публикаций отобраны научные работы, содержание которых отражает связь между челюстно – лицевой патологией, инсультами, причиной их возникновения, современными способами и средствами выявления.

Полученные результаты.

Инсульт – это заболевание, проявляющееся локальными, или общемозговыми нарушениями, формирующееся мгновенно в результате острого нарушения мозгового

кровообращения (ОНМК) [14]. Инсульт является лидирующей причиной долгосрочной недееспособности независимо от возраста, пола, расы или страны. Поэтому изучение всех этиологических, патогенетических и диагностических аспектов этого заболевания актуально как для науки, так и для практического здравоохранения [17, 19].

К факторам риска формирования инсультов можно отнести следующие: артериальная гипертензия; атеросклеротический стеноз сонных, позвоночных и других церебральных артерий; гиперхолестеринемия; гипергомоцистеинемия; заболевания сердца, приводящие к церебральной эмболии; мерцательная аритмия; гиперкоагулопатия; гипергликемия; ожирение; недостаточная физическая активность; курение; злоупотребление алкоголем [7].

Существует два основных типа инсульта: ишемический и геморрагический.

Ишемический инсульт обусловлен нарушением проходимости крови через крупные или мелкие сосуды головного мозга. По этиологии различают несколько видов ишемического инсульта, при которых источником закупорки сосудов мозга является их: атеросклеротическое поражение; тромбоз внутримозгового происхождения; тромбоз внемозгового происхождения (возникший в результате кардиальной патологии); эмболия элементами негемического происхождения (паразиты, пузырьки воздуха и др.); деформация с септальными стенозами; спазм [7, 14].

Патофизиология очаговой ишемии головного мозга и патоморфология инфаркта головного мозга заключаются в том, что из-за нарушения процесса поступления крови к участку мозга возникает его ишемия – местное снижение кровоснабжения, приводящее к повреждению ткани. Первый удар на себя берут клетки нейроглии. Повреждение клеточной мембраны глиальной клетки является причиной накопления в ней воды и формирования цитотоксического отёка. А разрушение спустя несколько дней гематоэнцефалического барьера - причиной попадания плазмы во внеклеточное пространство мозга и формирования вазогенного отека. Следовательно, на нервную клетку оказывается действие нескольких повреждающих факторов: совокупность реакций ишемического каскада, приводящих к необратимым патобиохимическим изменениям и повреждению нервной ткани; внутри- и внеклеточный отёк с повышением внутричерепного давления, приводящий к смещению и сдавлению структур мозга; миграция из кровяного русла в межклеточное пространство лейкоцитов, которые вызывают, в том числе, поражение здоровых клеток нервной ткани [1, 5].

Геморрагический же инсульт, в свою очередь, вызван приобретёнными модификациями и/или дефектами развития кровеносного русла, приводящими в последующем к внутричерепным экстравазатам, причиной которых может являться: прорастающая раковая опухоль; отёк мозга; травма; истончение и ломкость по различным физиологическим причинам стенок сосудов, которые в дальнейшем не переносят нагрузки при увеличении кровяного и внутричерепного давления и прорываются [9].

По мере кровоизлияния в мозг образуется внутричерепная гематома, сдавливающая окружающие отделы и вызывающая перифокальный отек с последующим повышением внутримозгового давления, которое вызывает механическое передвижение друг относительно друга соседних структур головного мозга, сдавление ствола и развитие ишемии прилежащих участков. Этот процесс может затрагивать сосудодвигательный и дыхательный центры, что влечёт за собой нарушение кровотока и дыхания, а иногда и смерть [10].

Таким образом, ишемический и геморрагический инсульты оказывают повреждающее действие на различные отделы и структуры головного мозга. Выход из строя каждого из таких звеньев приводит к соответствующей клинической картине. Так, повреждение ствола мозга, который даёт начало основной массе черепно-мозговых нервов (ЧМН), может породить симптомы, обусловленные дефектом данных нервов. К ним относится и лицевая асимметрия, которая является одним из признаков клинического проявления как ишемического, так и геморрагического инсульта [11].

Далее представлен морфо – функциональный разбор ЧМН и соответствующая визуально различимая клиническая симптоматика их повреждения, имеющая особое значение для быстрой, неинвазивной и эффективной диагностики возможного инсульта и контроля динамики его развития, на которых акцентировано внимание данной работы.

Глазодвигательный нерв (III пара ЧМН) по своей природе является смешанным. Его двигательное ядро располагается в покрышке ножек мозга. Нижняя ветвь осуществляет иннервацию нижней и медиальной прямых и нижней косой мышц глаза, а верхняя – верхней прямой мышцы и мышцы, поднимающей верхнее веко [20]. Если такая патология, как инсульт, затрагивает глазодвигательный нерв, то можно наблюдать следующие видимые невооруженным глазом дефекты:

1. Расходящееся косоглазие образуется из-за отсутствия противодействия верхней косой мышце (IV пара ЧМН) и латеральной прямой мышце (VI пара ЧМН), которые работают в норме и располагают глаз в положении слегка вниз и кнаружи.

2. Птоз – патологическое опущение века из-за нарушения иннервации мышцы, поднимающей верхнее веко (Рис. 1).



Рис. 1 Птоз и прозоплегия

3. Мидриаз - расширение зрачка с пропажей реакции на свет за счёт паралича мышцы, суживающей зрачок

4. Затруднение поворота глазного яблока внутрь, вверх и вниз [4].

Блоковый нерв (IV пара ЧМН) иннервирует верхнюю косую мышцу глаза, отводящий нерв (VI пара ЧМН) – латеральную прямую мышцу глаза. Двигательное ядро первого расположено на уровне нижних холмиков крыши среднего мозга, двигательное ядро второго – на дне ромбовидной ямки. Данные нервы вместе с глазодвигательным (III пара ЧМН) выходят в полость глазницы через верхнюю глазничную щель [20]. При поражении обоих возникает сходящееся косоглазие, когда на поражённой стороне не получается отвести глазное яблоко кнаружи [8].

Нижнечелюстной нерв - третья ветвь тройничного нерва (V пара ЧМН), которая в отличие от первых двух, содержащих только чувствительные волокна, несёт в себе и чувствительные, и двигательные волокна [4, 20]. При поражении двигательной части нижнечелюстного нерва наблюдается периферический паралич жевательных мышц [18]. По причине атрофии возможна асимметрия их контуров [3].

Двигательное ядро лицевого нерва (VII пара ЧМН) находится в передней части покрышки моста. Этот ЧМН отвечает за иннервацию всех мимических мышц (кроме мышцы, поднимающей верхнее веко), заднего брюшка двубрюшной мышцы, шилоподъязычную мышцу, мышцы черепа и ушной раковины, стремянную и подкожную мышцу шеи [4, 20].

В результате повреждения данного ЧМН могут наблюдаться следующие варианты асимметрии в функционировании мышечного аппарата челюстно-лицевой области:

1. Прозопарез – парез (снижение силы) мускулатуры лицевого отдела.
2. Прозоплегия – паралич мускулатуры лицевого отдела (Рис. 1).
3. Лагофтальм – нарушение возможности сомкнуть веки, сопровождающееся патологическим мигательным рефлексом и уменьшением продукции слёзной железы.
4. Симптом «ракетки» – при желании оскалить зубы на здоровой стороне это получается сделать нормально, а на стороне ослабленной круговой мышцы рта они оказываются прикрыты губами. Таким образом, ротовая щель становится похожей на теннисную ракетку: поражённая сторона – ручка ракетки, здоровая – её головка.
5. Симптом паруса (чаще наблюдается в коматозном состоянии) – вздувание щеки на здоровой стороне в такт вдоха и выдоха.
6. Симптом Руссецкого – при поднятии обоих углов рта посторонним предметом без приложения усилий самого больного, на парализованной стороне приподнятые наблюдаются сильнее, нежели на здоровой. Это объясняется отсутствием сопротивления мускулатуры, иннервируемой поражённым ЧМН.
7. Симптом Белла – у больного не получается сомкнуть веки на поражённой стороне, а глазное яблоко при этом усилии направляется кнаружи и кверху [4].

Находящееся в продолговатом мозге двигательное ядро (общее с X и XI парой ЧМН) языкоглоточного нерва (IX пара ЧМН) отвечает за работу шилоглоточной мышцы [20]. При нарушении его функционирования можно наблюдать отсутствие нёбного и (или) глоточного рефлекса.

Блуждающий нерв (X пара ЧМН) предоставляет двигательную иннервацию мышцам: мягкого нёба (кроме мышцы, напрягающей нёбную занавеску (V пара ЧМН)); глотки (кроме шилоглоточной мышцы (IX пара ЧМН)); гортани; пищевода [20]. В связи с этим, его повреждение приводит к таким расстройствам двигательных функций, как нарушение глотания и изменение произношения звуков [3, 4].

Исключительно двигательный добавочный нерв (XI пара ЧМН) анатомически связан с грудино-ключично-сосцевидной и трапециевидной мышцами [20]. При нарушении его целостности у больного наблюдается кривошея – заболевание, при котором обнаруживается наклон головы с её совместным загибом в противоположную сторону при одностороннем параличе (если паралич двусторонний, то голова откинута назад) и, как следствие, ограничение подвижности в шейном отделе позвоночника из-за расстройства тонуса соответствующих мышечных тканей. Также возможны судороги и фибриллярные подёргивания данных мышц [6].

Также полностью двигательный подъязычный нерв (XII пара ЧМН) осуществляет двигательную иннервацию всех внутренних и внешних мышц языка (кроме нёбной мышцы) [20]. В случае дефекта возможна глоссоплегия – паралич языка или гемиглоссоплегия – паралич половины языка, как следствие этого появляется дизартрия и анартрия – нарушения речи [6, 8].

Частные случаи периферического паралича XII пары ЧМН:

1. Атрофия мышечного аппарата половины или всего языка.
2. Дисфагия и дизартрия.
3. Органические подвижности языковых мышц.
4. В ротовой полости, находясь в спокойном состоянии, при одностороннем поражении наблюдается отклонение языка в здоровую сторону, а при напряжении и выдвигании – в нездоровую.
5. Фибриллярные подергивания языковых мышц (при ядерном поражении).

Если повреждается сразу несколько ЧМН, то наблюдается смешанная симптоматика [4].

Инструментальные и лабораторные методы исследования инсульта:

I. Нейровизуализационные исследования головного мозга:

1. Перфузионная КТ

Перфузионная КТ отличается от неконтрастной КТ тем, что в процессе неё количественно измеряют величину мозгового кровотока на капиллярном уровне за счёт пропускания внутривенно введённого контрастного вещества [1, 15]. Благодаря этому первые признаки инфаркта мозга можно выявить уже в течение первого часа [21].

2. Диффузионно – взвешенная МРТ

Диффузно – взвешенная МРТ выявляет самые первые отклонения от хаотичного Броуновского движения воды между внутри- и внеклеточным пространством мозговой ткани из-за возникновения цитотоксического отёка [12]. Стандартная МРТ и рентгеновская КТ такой эффективностью не обладают.

Также, оба метода с достоверностью помогают отличить ишемический инсульт от геморрагического и других патологий с похожей клинической симптоматикой [15].

II. Исследование сосудов головного мозга

1. Рентгеновская церебральная ангиография

Лидирующий по результативности метод исследования, дающий возможность установить: аневризму, окклюзию, стеноз и другие патологии сосудистого русла благодаря введению в просвет артерий головного мозга контрастного вещества [13]. В нём есть и свои минусы – это высокий риск осложнений после манипуляции, поэтому проводится в исключительных случаях, когда без этого обойтись нельзя [3, 8].

2. Ангиография с помощью аппаратов КТ и МРТ

Данные методы являются более безопасными, чем рентгеновская церебральная ангиография, но они подходят для выявления патологий крупных внутри- и внечерепных артерий. Окклюзию или стеноз мелких и средних сосудов обнаружить не удастся [15].

3. Ультразвуковые методы исследования внечерепных и внутричерепных мозговых артерий

Менее информативны, чем рентгеновская церебральная ангиография [2].

III. Исследование сердца

Проводится для исключения или подтверждения роли кардиальной патологии в развитии инсульта (в случае тромбоза внемозгового происхождения).

С помощью ЭКГ можно выявить ишемию сердечной ткани, изменение частоты и ритма, какие-либо другие повреждения мышечных клеток сердца или проводящей системы. С помощью ЭХОКГ – морфофункциональные изменения сердца и его клапанного аппарата [15].

IV. Лабораторные исследования

– общий анализ крови для выявления нарушения процесса свёртываемости крови, уровня гемоглобина, состояние иммунной системы организма;

– биохимический анализ крови (холестерин общий, ЛПНП, ЛПВП, С – реактивный белок, гомоцистеин) [16];

– анализ крови на ЭДС и ВИЧ;

– дополнительное исследование уровня протеина С и S, антифосфолипидных антител (в случае инсульта неопределённой этиологии);

– общий анализ мочи [1, 15].

Выводы.

Распространённость и выраженность асимметрии в функционировании мышечного аппарата челюстно-лицевой области при инсультах указывает на актуальность изученной проблемы. Но большинство инструментальных и лабораторных методов исследования не уделяют должного внимания данному составляющему клинической симптоматики инсультов.

Заключение

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: возможно и необходимо модернизирование уже известных и создание новых, неинвазивных, результативных, доступных для практического применения, не

оказывающих отрицательного воздействия на пациента способов и устройств выявления и многократного контроля отклонений от нормы, учитывается перспектива их конструирования и введение в практическое использование. Такой контроль тенденции внешних проявлений патологии позволит судить о состоянии внутренних систем, что даст возможность иметь полную картину предполагаемых исходов и эффектов заболевания в процессе диагностики, лечения и реабилитации пациента.

Благодарность

Исследование выполнено в рамках гранта Российского Научного Фонда и Кубанского Научного Фонда № 22-15-20069.

Литература.

1. Алифирова В.М., Антухова А.М. *Инсульт: Эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика.* -Томск, 2009. – 292 с.
2. Атьков О.Ю. *Ультразвуковое исследование сердца и сосудов.* 2-е изд., доп. и расшир. — Москва: Эксмо, 2015. — 456 с.
3. Белкин А.А., Волкова Л.И., Лейдерман Н.Н. *Инсульт: Клинико-организационное руководство.* – Екатеринбург, 2004.
4. Бразис Пол У., Джозеф К. Мэсдюю, Хосе Биллер. *Топическая диагностика в клинической неврологии.* пер. с англ.; под общ. ред. проф. О.С.Левина. – 3-е изд. – Москва: МЕД-прессинформ, 2020. – 736 с.
5. Верецагин Н.В., Суслина З.А. *Современное представление о патогенетической гетерогенности ишемического инсульта // Очерки ангионеврологии.* М, 2005, С. 12-37.
6. Виленский Б.С. *Инсульт: профилактика, диагностика и лечение.* -СПб., 2002. –397 с.
7. Грабовски А. *Неотложная неврология.* Пер. с нем.; Под ред. Ю.В. Алексеенко – М.: Издательство Панфилова, 2016. – 592 с.
8. Гусева Е. И., Коновалова А. Н., Гехт А. Б. *Неврология. Национальное руководство. Краткое издание.* - М.: ГЭОТАРМедиа, 2018. - 688 с.
9. Гусейнов Т.В., Измалёнова А.Н., Волевач О.В., Курбатский П.И. *Геморрагический инсульт. Оценка и тактика оперативного лечения.* Студенческий вестник. 2019. № 27-2 (77). С. 8-10.
10. Калашикова Л.А. *Диссекция (расслоение) церебральных артерий и ишемический инсульт. Научная статья в журнале «Нервные болезни», 2011. с.2-5*
11. Касьянов А.А., Горячкин А.М., Кожевников А.М. *Асимметрия лица: основные виды и методы коррекции. Статья в журнале «Инъекционные методы в косметологии».* 2017. № 4. С. 78-84.
12. Ковалева М.В., Мартынов М.Ю., Горина Т.П., Щукин И.А., Авдеев С.А. *Магнитно – резонансная томография в диагностике геморрагического инсульта. Лечебное дело.* 2008. № 1. С. 47-51.
13. Матвиец В.С., Куташов В.А. *Современный взгляд на диагностику и дифференциальную диагностику геморрагического инсульта. Молодой ученый.* 2015. № 19 (99). С. 291-294.
14. Парфенов В.А., Хасанова Д.Р. *Ишемический инсульт.* – Москва, 2012. С – 288.
15. Парфенов В.А., Яхно Н.Н., Евзиков Г.Ю. *Нервные болезни.* Москва, 2018. – 496 с.
16. Пономарев Г. В., Полякова А.В., Прохорова М.В., Вознюк И. А. *Биомаркеры инсульта: вопросы диагностики и медицинской реабилитации. Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация.* 2022. Т. 4. № 4. С. 259-270.
17. Попова Е.Н., Шерман Л.А., Маратканова Т.В., Исакова Е.В., Вишняков М.В., Котов С.В. *Оценка состояния мозговой гемодинамики у пациентов с ишемическим инсультом и врождёнными аномалиями Виллизиева круга. Альманах клинической медицины.* 2011. № 25. С. 30-36.
18. Савчук Е.А., Савчук Е.О., Шевченко И.В. *Виды болевых синдромов у больных, перенёсших инсульт: клиника, диагностика, лечение. Вестник физиотерапии и*

курортологии. 2018. Т. 24. № 1. С. 127.

19. Скворцова В.И., Стаховская Л.В., Айриян Н.Ю. Эпидемиология инсульта в Российской Федерации // *Consilium medicum*. 2005. Приложение №1. С.10-12.

20. Уилсон – Паувелс Л. И др.; пер. с англ. под редакцией А. А. Скоромца – М.: Издательство Панфилова; БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 272 с.

21. Чайкина Т.А., Новичихина О.Е., Святкина Е.В., Булатова Е.М., Конюхов В.А. Возможности перфузионной КТ в ранней дифференциальной диагностике инсульта и опухоли на основе клинического случая. *Многопрофильный стационар*. 2018. Т. 5. № 2. С. 131-133.

Сведения об авторах

Куликова Ирина Александровна

студентка лечебного факультета
Кубанский государственный медицинский университет
Краснодар, Россия

Эл. почта: dockulikowa@yandex.ru

Мурашкина Татьяна Ивановна

д.т.н., профессор, профессор кафедры
«Приборостроение»
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия

Эл. почта: timurashkina@mail.ru

Бадеева Елена Александровна

д.т.н., доцент, профессор кафедры «Радиотехника и радиоэлектронные системы»
Пензенский государственный университет
Пенза, Россия

Эл. почта: badeeva_elen@mail.ru

Плотникова Екатерина Юрьевна

Врач-неонатолог первой категории отделения новорожденных №1 ГБУЗ "Родильный дом города Краснодара" МЗ КК
Краснодар, Россия

Эл. почта: cat.roll@yandex.ru

Павлюченко Иван Иванович

Д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологии с курсом медицинской генетики ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»
Краснодар, Россия

Эл. почта: Pavluchenkoi@ksma.ru

Васильев Юрий Анатольевич

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

Эл. почта: yurii-59@mail.ru

Information about author

Kulikova Irina Aleksandrovna

student of the Faculty of Medicine Kuban State Medical University
Krasnodar, Russia

E-mail: dockulikowa@yandex.ru

Murashkina Tatiana Ivanovna

Doctor of Technical Sciences, Professor, Professor of the Department of "Instrument Engineering"
Penza State University
Penza, Russia

E-mail: timurashkina@mail.ru

Badeeva Elena Aleksandrovna

Doctor of Technical Sciences, Associate Professor, Professor of the Department of Radio Engineering and Radio Electronic Systems
Penza State University
Penza, Russia

E-mail: badeeva_elen@mail.ru

Ekaterina Yurievna Plotnikova

Neonatologist of the first category of the Department of newborns № 1 of the Maternity Hospital of the city of Krasnodar
Krasnodar, Russia

E-mail: cat.roll@yandex.ru

Pavluchenko Ivan Ivanovich

Doctor of (Med.) Sciences, Professor, Head of the Department of Biology with the course of Medical Genetics of the Kuban State Medical University
Krasnodar, Russia

E-mail: Pavluchenkoi@ksma.ru

Vasiliev Yuri Anatolyevich

Assistant of the Department of Public Health, Healthcare and History of Medicine
Kuban State Medical University
Krasnodar, Russia

E-mail: yurii-59@mail.ru

УДК 616.314: 572.087
 ГРНТИ 760000
 DOI
 10.47501/978-5-6044060-3-8.213-217

¹Плотникова Е.Ю., ²Мурашкина Т.И., ²Бадеева Е.А.,
¹Оленская А.В., ¹Сухинин А.А., ¹Волобуев В.В.,
¹Аюпова Ф.С., ¹Арутюнов А.В., ¹Оноприев В.В.
¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский
 университет»
²ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»

ФОРМИРОВАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИХ И ПАРАМЕТРИЧЕСКИХ ВЕЛИЧИН ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

*В статье приводится пример методики проведения экспериментальных пара-клинических исследований по референтным точкам челюстно-лицевой области. Методика включает: процедуру измерения на лице определённых точек у новорождённых и взрослых при помощи измерительного инструмента в виде рулетки-сантиметра. Другой метод измерения фотографии пациента при помощи линейки и циркуля. Профиль нёба изучается и измеряется на диагностической гипсовой модели – циркулем и линейкой. В настоящее время разрабатывается новый подход к антропометрическому измерению. **Ключевые слова:** антропометрия, средства измерения, референтные точки, челюстно-лицевая область.*

Е.Yu. Plotnikova¹, T.I. Murashkina², E.A. Badeeva²,
 A.V.Olenskaya¹, A.A.Sukhinin¹, V.V.Volobuev¹, F.S.Ayupova¹,
 A.V.Arutyunov¹, V.V.Onopriev¹
¹FSBEI HE "Kuban State Medical University"
²FSBEI HE Penza State University

FORMATION OF A DATABASE OF ANTHROPOMETRIC AND PARAMETRIC VALUES OF THE MAXILLOFACIAL REGION

The article provides an example of a methodology for conducting experimental para-clinical studies on the reference points of the maxillofacial region. The technique includes: the procedure for measuring certain points on the face of newborns and adults using a measuring tool in the form of a tape measure. Another method is to measure a photograph of a patient using a ruler and compass. The palate profile is studied and measured on a diagnostic plaster model - with a compass and a ruler. A new approach to anthropometric measurement is currently being developed.

Keywords: anthropometric measurements, reference points, maxillofacial area, objective means of measurement.

Введение.

Симметрия лица служит своеобразной нормой гармоничного развития организма. Черепно-лицевая структура ребенка особенно быстро меняется в течение первого года жизни, и эти данные могут использоваться для создания стандартных эталонных моделей роста и развития анатомических структур лица у детей. При этом, морфологические изменения лицевого скелета играют решающее значение для оценки тяжести челюстно-лицевых аномалий, планирования лечения и анализа результатов [1].

В структуре врожденной патологии челюстно-лицевой области у детей наиболее часто встречаются несращения губы и/или неба. Деформация вызвана отсутствием сращения носового и верхнечелюстного отростков во время внутриутробного развития плода. Как правило, односторонние расщелины имеют неодинаковую степень выраженности, что может способствовать развитию асимметрии лица [2].

При нормальном питании и состоянии здоровья основные антропометрические данные (рост, вес и окружность головы) являются существенно взаимосвязаны, и общая пропорциональность отражается во всех возрастных группах [3,4].

Достаточное число публикаций указывает, что для полноты антропометрического исследования лучше всего использовать рентгенологические методы, однако они имеют определенные противопоказания по частоте применения. Поэтому использование неинвазивных методик существенно расширяет границы исследования, как по частоте применения, так и по функциональности [5].

С ортодонтической точки зрения асимметрии могут быть собраны в основные клинические проявления: боковые отклонения нижней челюсти, зубные асимметрии без вовлечения скелета, скелетные асимметрии, а так же связанные с костными аномалиями развития и соединительной ткани асимметрии у новорожденных, возникающие за счет внутриутробных, либо родовых травм, патологических предлежаний плода (лицевое, ягодичное, косое, поперечное), кривошеи, вследствие перенесенной внутриутробной инфекции (например, поздний врожденный сифилис манифестирующий у детей более старшего возраста с клиническими проявлениями в виде гуммозных язв, что ведет к вовлечению в патологический процесс костей носа, носовой перегородки и твердого неба деформирующихся и разрушающихся со временем и без должного лечения). У ортодонтических пациентов эстетика лица нарушается при выраженных зубочелюстных аномалиях [6]. Эстетические улучшения стоматологического характера по-прежнему требуются при «кривых» улыбках или фронтальных отклонениях окклюзионной плоскости. Кроме того, асимметричные межчелюстные отношения приводят к функциональным аномалиям: нарушениям ВНЧС, повышенной стираемости зубов или дисфункциям языка [7].

Существуют сложности в объективной оценке результатов антропометрии в медицине. Многие задачи в этом направлении остаются не решёнными: сложность измерения, точность показателей, эталон параметров измерений и др. В своей работе мы показываем возможности применения эмпирических исследований (известных методик измерения, параклинических методов исследования) в челюстно-лицевой области.

Пациенты, получающие медицинскую помощь с последующей медико-социальной реабилитацией, часто имеют различные анатомо-физиологические нарушения, которые существенно снижают результаты лечения. Раннее выявление анатомо-физиологических нарушений и своевременная их коррекция позволят в более ранние сроки завершить реабилитацию, как медицинскую, так и социальную. Объективных с точки зрения доказательной медицины исследований анатомо-физиологических отклонений у пациентов, получающих медицинскую помощь, и их функциональной реабилитации в настоящее время фактически нет.

Цель работы.

Разработка и внедрение диагностических методик антропометрии в практическое здравоохранение для установления диагноза, контроля на этапах лечения и в период реабилитации детей с патологией челюстно-лицевой области.

Материалы и методы.

Исследование проводилось на клинических базах ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России: МБУЗ Родильный дом г. Краснодара, детское отделение; челюстно-лицевое отделение ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» г. Краснодара; детское стоматологическое отделение Клиники КубГМУ.

После получения добровольного информированного согласия пациенты были сформированы в несколько групп: новорождённые дети; дети с врождённым несращением губы и/или нёба разного возраста; дети, обратившиеся за стоматологической помощью в стационар ДККБ и детское стоматологическое отделение Клиники КубГМУ.

В основу антропометрических измерений была положена оценка расстояния между референтными точкам на лице. Были выделены три точки: 1) tr (трагион) – точка на козелке уха, 2) sn (субназале) – точка соединения кожной перегородки носа с верхней губой, 3) gn (гнатион) – срединная точка по нижнему краю подбородка (рис. 1).

Во второй и третьей группах детей измерения проводились при поступлении в стационар / при обращении за стоматологической помощью. В первой группе детей (новорождённые) – измерение проводили на 2-3 сутки после рождения. Для измерения применялась мягкая, гибкая лента с миллиметровым делением.

В первой группе обследуемых дополнительно проводили анкетирование рожениц, с сбором информацией о кормлении новорождённого (объём и время), для определения активности врождённого инстинкта ребёнка в родильном отделении при грудном или искусственном кормлении. Известно движение языка при кормлении повторяется с интервалом приблизительно 0,8 секунд 800-1000 раз в одно кормление [О.А. Мальгина], при этом сила давления доходит до 500 г. Для анализа результатов анкетирования определялось среднее значение полученного питания ребёнком за единицу времени в сутки и сопоставлялось с нормативными показателями. При изменении результатов от нормы, можно считать, что давление языка снижена или повышена.

Полученные данные вносятся в базу данных пациентов. При этом, в форму вносят следующие данные пациента: ФИО, пол, возраст (год и месяц рождения), регион проживания, данные антропометрических измерений лица, наличие у пациента основной и сопутствующей патологии. База данных может включать ресурсы как регионального, так и федерального уровня [8,9].



Рис. №1. Измерение лицевых точек новорождённого: *A* - общий вид измерения; *B* - *tr* (трагус); *C* - *sn* (субназале); *D* - *gn* (гнатион)

Полученные результаты.

Уточнена методика проведения антропометрии челюстно-лицевой области у детей в норме и патологии.

Выводы.

По нашему мнению, уточненная методика антропометрии для выявления отклонений от нормы параметров ЧЛЮ может быть использована в клинической стоматологической практике, в педиатрии, судебной медицине.

Заключение.

Авторы считают, что в данной работе новыми являются следующие положения и результаты: впервые в Краснодарском крае будет сформирована база данных по антропометрии ЧЛЮ у новорожденных, пациентов с врожденными пороками развития лица, с зубочелюстными аномалиями.

Благодарности

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-15-20069.

Литература.

1. Lo, A.-L. *Craniofacial Growth and Asymmetry in Newborns: A Longitudinal 3D Assessment* / A.-L. Lo; R.R. Hallac; S.-H. Chen; K.-H. Hsu; S.-W. Wang; C.-H. Chen et al. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2022. – №19. – P. 12133. DOI:10.3390/ijerph191912133
2. Santana, N. *Breaking symmetry: a quantitative analysis of facial skeleton disharmony in children born with bilateral cleft lip and palate* / N. Santana, J.M. Starbuck // *The Anatomical Record*. – 2019. – №302. – P. 1726–1732. DOI: 10.1002/ar.24111
3. Плотникова, Е.Ю. *Кривошея новорождённых как фактор асимметрии лицевого черепа: этиология, клиника, лечение, прогноз* / Е.Ю. Плотникова, Т.И. Мурашкина, Е.А. Бадеева [и др.] // *Актуальная биотехнология*. – 2022. – № 1. – С. 286–290. – EDN AXHYNW.
4. Scheffler, C. *The association between weight, height, and head circumference reconsidered* / C. Scheffler; H. Greil; M. Hermanussen // *Pediatr. Res*. – 2017. – №81. – P. 825–830. DOI: 10.1038 / pr.2017.3
5. Tartaglia, G.M. *Non-invasive 3D facial analysis and surface electromyography during functional pre orthodontic therapy: a preliminary report* / G.M. Tartaglia, G. Grandi, F. Mian, C. Sforza, V.F. Ferrario // *J. Appl. Oral Sci*. – 2009. – №17(5). – P. 487–494.
6. Аюпова, Ф.С. *К вопросу о взаимосвязи патологий осанки и прикуса у детей и способах их выявления* / Ф.С. Аюпова, Т.И. Мурашкина, Т.В. Гайворонская [и др.] // *Вопросы практической педиатрии*. – 2022. – Т. 17, № 6. – С. 89–96. – DOI 10.20953/1817-7646-2022-6-89-96. – EDN CKHZAK.
7. Bardinet, E. Orthodontic approach to asymmetry / E. Bardinet, P. Baron, C. Bazzert, M.-J. Boileau, R. Bougues, F. de Brondeau et al. // *Orthod. Fr.* – 2002. – №73(3). – P. 243–315. PMID: **12064070** [in French]
8. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023620507 Российская Федерация. Организация регистра пациентов с расщелиной нёба, нуждающихся в медицинской реабилитации крупного региона РФ : № 2022623860 : заявл. 20.12.2022 : опубл. 08.02.2023 / Ю. А. Васильев, И. Г. Удина, А. С. Грачева [и др.] ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – EDN PLDZFG.
9. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022620874 Российская Федерация. Организация регистра детей с врождёнными аномалиями развития челюстно-лицевой области крупного региона РФ: № 2022620678 : заявл. 01.04.2022 : опубл. 19.04.2022 / Ю. А. Васильев, И. Г. Удина, И. А. Белоглядова, А. Н. Редько ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – EDN NHXQTI.

Сведения об авторах

Плотникова Екатерина Юрьевна

Врач-неонатолог первой категории отделения новорожденных №1 ГБУЗ Роддом г.Краснодара МЗ КК Краснодар, Россия

Эл.почта: cat.roll@yandex.ru

Мурашкина Татьяна Ивановна доктор техн.наук, профессор кафедры «Проиборостроение», Пензенский Государственный Университет Пенза, Россия

Эл.почта: timurashkina@mail.ru

Бадеева Елена Александровна

доктор техн.наук, доцент кафедры «Радиотехника и радиоэлектронные системы», Пензенский Государственный Университет Пенза, Россия

Эл.почта: badeeva_elena@mail.ru

Оленская Александра Владимировна

Старший преподаватель кафедры общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России Краснодар, Россия

Эл.почта: alexzobenko@mail.ru

Сухинин Андрей Анатольевич

к.м.н., доцент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Краснодар, Россия

Эл.почта: SukhininAA@ksma.ru

Волобуйев Владимир Викторович

к.м.н., доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии Краснодар, Россия

Эл.почта: vladimir.volobueff@yandex.ru

Аюпова Фарида Сагитовна

к.м.н., доцент кафедры детской стоматологии, ортодонтии и челюстно-лицевой хирургии Краснодар, Россия

Эл.почта: corpus@ksma.ru

Арутюнов Арменак Валерьевич

д.м.н., доцент, зав.кафедрой стоматологии общей практики КубГМУ, Краснодар, Россия

Эл.почта: armenak@mail.ru

Оноприев Владимир Владимирович

д.м.н., профессор кафедры клинической фармакологии и функциональной диагностики ФПК и ППС, начальник научно-организационного управления

ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России

Краснодар, Россия

Эл.почта: onopriev1704@gmail.com

Эл.почта: onopriev1704@gmail.com

Information about author

Plotnikova Ekaterina Yurievna

Neonatologist of the first category of the department of newborns No. 1 GBUZ Maternity Hospital of Krasnodar MZ KK, Krasnodar, Russia

E-mail: cat.roll@yandex.ru

Murashkina Tatiana Ivanovna

Dr. tech.of Sciences, Professor of the Department of "Proiborostroenie",

Penza State University Penza, Russia

E-mail: timurashkina@mail.ru

Badeeva Elena Aleksandrovna

Dr. tech.Associate Professor of the Department of Radio Engineering and Radio Electronic Systems, Penza State University Penza, Russia

E-mail: badeeva_elena@mail.ru

Olenskaya Alexandra Vladimirovna

Senior Lecturer of the Department of Public Health, Healthcare and History of Medicine of the Federal State Budgetary Educational Institution of the Ministry of Health of the Russian Federation Krasnodar, Russia

Email: alexzobenko@mail.ru

Sukhinin Andrey Anatolyevich

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy Krasnodar, Russia

E-mail: SukhininAA@ksma.ru

Volobuev Vladimir Viktorovich

PhD, Associate Professor of the Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Maxillofacial Surgery Krasnodar, Russia

E-mail: vladimir.volobueff@yandex.ru

Ayupova Farida Sagitovna

PhD, Associate Professor of the Department of Pediatric Dentistry, Orthodontics and Maxillofacial Surgery Krasnodar, Russia

E-mail: corpus@ksma.ru

Arutyunov Armenak Valerievich

MD, Associate Professor, Head of the Department of Dentistry of General Practice of KubSMU, Krasnodar, Russia, E-mail: armenak@mail.ru

Onopriev Vladimir Vladimirovich

Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Functional Diagnostics of the FPC and PPS, Head of the Scientific and Organizational Department of the FSBEI IN KubSMU of the Ministry of Health of Russia

Krasnodar, Russia

E-mail: onopriev1704@gmail.com

E-mail: onopriev1704@gmail.com