

Методика

© Коллектив авторов, 2023

УДК 612.285.1

Степанова О.И.¹, Клёсов Р.А.¹, Семёнов Х.Х.¹, Помыткин И.А.¹, Онищенко Н.А.², Каркищенко В.Н.¹

Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей db/db с помощью лазерной доплеровской флуометрии

¹ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России,

143442, МО, Красногорский р-н, п. Светлые горы, д. 1;

²ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, 123182, Москва, Россия, ул. Щукинская, д. 1

Введение. Согласно данным литературы Аппарат лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» не был ранее использован для доклинических исследований тканевых нарушений на мелких лабораторных животных.

Цель исследования – изучение возможности использования аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» на мелких лабораторных животных – мутантных мышах линии C57BL/KsJYLepr^{db/+} (db/db) – в качестве новой тест системы, для оценки тканевых изменений при сахарном диабете 2 типа (СД 2).

Методика. Патологические изменения у мышей с СД изучали на генетической модели СД 2 у мутантных мышей C57BL/KsJYLepr^{db/+} (db/db) (n=40); для контроля использовали группу фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии (db/+m) (n=16). Общее количество животных составляло 56 голов. Исследование проводили на аппарате лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ», который адаптирован приспособлением, ограничивающим подвижность мышей во время измерений. Аппарат «ЛАЗМА СТ» позволяет осуществлять одновременный неинвазивный контроль состояния микроциркуляции крови и лимфы, а также определять уровень активности митохондриальных окислительных коферментов в тканях. Дополнительно измеряли уровень глюкозы в крови фотометрическим методом на приборе Accu-Chek (Швейцария).

Результаты. Использование аппарата ЛАЗМА СТ позволило в реальном времени неинвазивно изучить в динамике нарушения микроциркуляции (крови и лимфы) и окислительного метаболизма (НАДН и ФАД) при СД 2, сопоставить их с нарушениями глюкозы в крови, а также прогнозировать тяжесть выявленных нарушений в условиях компенсации, субкомпенсации и декомпенсации. Аппарат ЛАЗМА СТ позволил одновременно выявить начавшиеся нарушения липидного и белкового обмена (пигменты-липофусцин и порфирин), которые свидетельствуют о тяжести прогноза заболевания.

Выводы. Аппарат ЛАЗМА СТ, адаптированный для применения у мышей с генетической моделью СД 2 типа, представляет собой новую неинвазивную, информативную и безопасную тест-систему, позволяющую в динамике контролировать и прогнозировать тяжесть нарушений микроциркуляции и тканевых окислительно-восстановительных коферментов – НАДН и – ФАД.

Ключевые слова: НАДН; ФАД; мыши db/d; Аппарат лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ»; СД 2 типа

Для цитирования: Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помыткин И.А., Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н. Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей db/db с помощью лазерной доплеровской флуометрии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 118-129.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.118-129

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Степанова О.И., Клёсов Р.А., Помыткин И.А.; сбор и обработка материала – Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х.; техническая подготовка материала, подготовка иллюстративного материала – Степанова О.И., Онищенко Н.А.; написание текста – Степанова О.И.; редактирование – Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Степанова Ольга Ивановна, e-mail: olgsima50@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 21.12.2022

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Stepanova O.I.¹, Klesov R.A.¹, Semenov Kh.Kh.¹, Pomytkin I.A.¹, Onishchenko N.A.², Karkischenko V.N.¹

A method for noninvasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in db/db mice using laser Doppler flowmetry

¹Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Village Svetlye Gory 1, Krasnogorsky District of Moscow Region, 143442, Russian Federation;

²Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Shchukinskaya St. 1, Moscow, 123182, Russian Federation

According to published reports, the LAZMA ST laser diagnostic apparatus has not been previously used for preclinical studies of tissue disorders in small laboratory animals.

The aim of this study was to evaluate a possibility of using the LAZMA ST laser diagnostic apparatus in small laboratory animals, C57BL/KsJYLeprdb/+ (db/db) mutant mice, as a new test system for assessing changes in tissues in type 2 diabetes mellitus (DM2).

Methods. Pathological changes were studied on a genetic model of DM2 in C57BL/KsJYLeprdb/+ (db/db) mutant mice ($n=40$). Phenotypically healthy heterozygous mice of the same strain (db/+m) ($n=16$) were used as a control group. The study was performed with a LAZMA ST laser diagnostic apparatus that was adapted for mice with a device limiting their mobility during measurements. LAZMA ST allows simultaneous noninvasive monitoring of blood and lymph microcirculation along with measurements of tissue activity of mitochondrial oxidative coenzymes. Additionally, blood glucose was measured photometrically with an Accu-Chek (Switzerland) glucometer.

Results. The use of LAZMA ST allowed noninvasive, real-time evaluation of disorders in blood and lymph microcirculation and oxidative metabolism (NADH and FAD) in DM2, comparing them with glycemic disorders, and also predicting severity of these disorders in the conditions of DM2 compensation, subcompensation and decompensation. The LAZMA ST device provided simultaneous detection of the onset of lipid and protein metabolic disorders (lipofuscin and porphyrin pigments) to predict severity of the disease.

Conclusion. The LAZMA ST device adapted for using in a murine genetic model of DM2 is a new, noninvasive, informative, and safe test system that allows to monitor and predict the dynamics of severity of disorders in microcirculation and tissue redox coenzymes, NADH and FAD.

Keywords: NADH; FAD; db/db mice; laser diagnostic device LAZMA ST; type 2 diabetes mellitus

For citation: Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh. Kh., Pomytkin I.A., Onishchenko N.A., Karkischenko V.N. Non-invasive study method of tissue disorders in diabetes mellitus type 2 in db/dbmice using laser Doppler fluometry. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2) 118-129. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02. 118-129

Author's contribution: research concept and design – Stepanova O.I., Klesov R.A., Pomytkin I.A.; Data collection – Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh. Kh.; Technical data preparation, preparation of illustrative material – Stepanova O.I., Onishchenko N.A.; text writing – Stepanova O.I.; editing – Onishchenko N.A., Karkischenko V.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Olga I. Stepanova*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, e-mail: olgsima50@mail.ru

Financing. The study has no sponsorship.

Conflict of interest. The Authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Daniilova G.A., <https://orcid.org/0000-0001-8091-0618>

Received 21.12.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Сахарный диабет 1 и 2 типа – тяжелые хронические заболевания, характеризующиеся нарушением всех видов обмена веществ и в первую очередь, углеводного [1–3]. Развитие СД 1 типа характеризуется снижением выработки инсулина островковыми клетками под-

желудочной железы, а развитие СД 2 типа обусловлено нарушением трансмембранного транспорта инсулина и формированием в организме состояния инсулинорезистентности тканей и гиперинсулинемии. Недостаточность реализации регуляторной роли инсулина

на углеводный обмен в организме приводит к гипергликемии, развитию оксидативного стресса, за счет накопления супероксидных радикалов, активации полиолового пути метаболизма глюкозы и протеинкиназы C, а также к накоплению конечных токсичных продуктов гликирования [2]. Эти перечисленные факторы становятся при СД ведущими причинами возникновения эндотелиальных дисфункций в сосудах различных органов и систем с развитием микро- и макроангиопатий, которые ведут к возникновению тяжелых осложнений [2, 4–7] и повышают смертность таких больных [8]. Развитие эндотелиальных дисфункций и ангиопатий связано непосредственно со снижением стимуляции оксидом азота (NO) активности мембранной Na^+/K^+ -АТФ-азы, которое обусловлено снижением синтеза NO в эндотелиальных клетках из-за снижения образования в эндотелии Ca^{2+} зависимой NO-синтазы. Между тем дефицит NO-синтазы возникает не только в клетках сосудистого эндотелия, но и в клетках других органов, индуцирующих образование NO-синтазы. В результате наряду с эндотелиальными дисфункциями (диабетическая нефропатия, ретинопатия, диабетическая стопа и др.) снижение синтеза нейрональной и индуцированной NO-синтазы ведет при СД к развитию тяжелых нейропатий (диабетическая нейропатия) [7, 9] и повреждению сердечно-сосудистой системы [3, 5, 6]. Сниженный уровень глюкозы в тканях при СД снижает уровень окислительных процессов в них, что ведет к нарушению транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий клеток. Увеличение доступности электронов и/или насыщенности митохондрий электронами способствует восстановлению кислорода до супероксид-анион-радикалов, которые дополнительно вызывают дегенеративные изменения в митохондриях клеток. Развивающийся дисбаланс редокс – системы митохондрий (нарушение соотношения НАДН и НАД, ФАДН и ФАД) и окислительный стресс (образование свободных радикалов) становятся таким образом ведущими факторами гипоксического (ишемического) повреждения органов при СД. Показано, что вазодилатация и усиление кровотока являются ранними сосудистыми реакциями на острую гликемию и тканевую гипоксию [10–15], а проведенный мета-анализ [16], подтвердил четкую взаимосвязь между патологическими проявлениями сахарного диабета и нарушением кожной микроциркуляции [17].

Относительно недавно для оценки состояния микроциркуляторного русла было предложено использовать методы высокочастотной ультразвуковой доплерографии и лазерной доплеровской флуометрии (ЛДФ) [18, 19], которые обладают несомненными до-

стоинствами, ввиду простоты их использования, неинвазивности, а также отсутствия противопоказаний к применению в клинике при обследовании больных, в том числе с СД.

Метод ЛДФ в настоящее время активно используется в клинике для диагностики диабетической микроангиопатии [15, 20–22]. С помощью этого метода исследуются амплитуды колебательных процессов сосудистой стенки, обусловленные эндотелиальными, миогенными и нейрогенными механизмами в микроциркуляторном русле. В РФ исследование микроциркуляторного русла в клинике проводится на лазерном диагностическом аппарате «ЛАЗМА СТ» (разработчик А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров Технопарк «Строгино» ООО НПП «ЛАЗМА» E-mail: lazma@plusnet.ru) [18].

Аппарат лазерный диагностический «ЛАЗМА СТ», позволяет определять тяжесть заболевания: субкомпенсированные нарушения; декомпенсированные нарушения; признаки диабетической стопы и оценивать эффективность лекарственной терапии при индивидуальном подборе препаратов. Области, используемые для диагностики микроциркуляции у людей – лицо, конечности и палец стопы, которые наиболее чувствительны к диабетическим осложнениям.

В ходе одной диагностической процедуры на этом аппарате одновременно контролируются активность окислительных коферментов способом лазерной флуоресцентной спектроскопии и состояние микроциркуляции крови и лимфы в той же зоне методом лазерной доплеровской флуометрии, а эффективность лекарственной терапии оценивается путем сравнения результатов измерения с контрольными значениями диагностических показателей.

Отсутствие в литературе данных по использованию аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» для экспериментального изучения тканевых нарушений на мелких лабораторных животных, в том числе с моделью сахарного диабета, для контроля тяжести состояния и оценки эффективности терапии, позволило нам сформулировать цель и задачи настоящего исследования.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности использования аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» на мелких лабораторных животных – мутантных мышах линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ (db/db)- в качестве нового диагностического подхода для оценки тканевых изменений при сахарном диабете 2 типа (СД 2).

Для достижения указанной цели нами были поставлены следующие задачи:

– Изучить функциональные возможности лазерного диагностического аппарата «ЛАЗМА СТ» и адапти-

ровать его для экспериментальных исследований на мелких лабораторных животных.

– Оценить эффективность применения подготовленного аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» для контроля тяжести микроциркуляторно-тканевых нарушений у лабораторных мышей с СД 2 типа.

Методика

Лазерный диагностический аппарат «ЛАЗМА СТ» фирмы ООО НПП «ЛАЗМА» Россия включает в себя анализатор периферического кровотока, лимфотока и окислительно-восстановительных коферментов ткани комплект «ЛАЗМА-Д» и блока для температурных и электростимуляционных функциональных проб «ЛАЗМА -ТЕСТ» [18, 19, 23].

Достоинство аппарата «ЛАЗМА СТ» заключается в возможности одновременного контроля состояния микроциркуляции (крови и лимфы) методом лазерной доплеровской флуометрии (ЛДФ) и окислительно-восстановительных процессов методом лазерной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС). При ЛДФ аппарат проводит зондирование ткани лазерным излучением, а затем обработку отраженного от ткани излучения путем выделения доплеровского сдвига частоты отраженного сигнала, пропорционального скорости движения частиц (клеток крови, лимфы) в микроциркуляторном русле. При ЛФС проводится регистрация спектра вторичного излучения (флуоресценция) ткани при ее зондировании способом флуоресцентной спектроскопии на длине вол-

ны, соответствующей длине волны максимального поглощения излучения исследуемым коферментом [24, 25].

Аппарат «ЛАЗМА СТ» (рис. 1) в реальном времени определяет состояние микроциркуляции (уровень периферического кровотока, лимфотока) и обменных процессов (содержание коферментов – кофермент -НАДН -восстановленный никотинамид-адениндинуклеотид, и кофермент -ФАД – окисленный флаavin-адениндинуклеотид, которые являются биомаркерами состояния окислительного метаболизма в ткани). В аппарате применяются источники возбуждения двух длин волн: УФ- 365 нм (для НАДН в диапазоне 460 нм) и Син. – 450 нм (для ФАД в диапазоне 515 нм).

Для оценки флуоресценции исследуемых коферментов применяют отношения нормативных амплитуд: амплитуды их флуоресценции к амплитуде интенсивности обратно-рассеянного излучения, определяемые по формуле: $A_{адн} = A_{фл. (УФ)} / A_{уф}$; $A_{фад} = A_{фл. (Син.)} / A_{син.}$, где: $A_{фл. (УФ)}$ и $A_{фл. (Син.)}$ – максимумы (пики) интенсивности излучения в линиях флуоресценции соответствующих коферментов, $A_{уф}$ и $A_{син.}$ – максимумы интенсивностей обратно-рассеянного излучения. Показатели кровотока и лимфотока определяются косвенными параметрами по оптическим характеристикам области зондирования в относительных единицах, как функция времени, а нормативные амплитуды флуоресценции в ткани определяются в безмерных единицах программного обеспечения прибора.

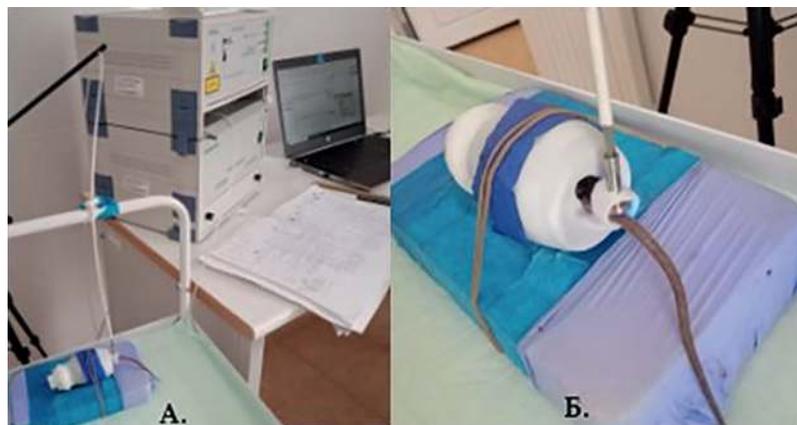


Рис. 1. Аппарат «ЛАЗМА СТ» для исследования состояния микроциркуляции (кровоток, лимфоток) и окислительных коферментов -НАДН и -ФАД. в ткани животного.

А.– Аппарат «ЛАЗМА СТ» с подключённой камерой в работе; Б. – Камера для мышей с массой тела 40–50 г, обеспечивающая состояние покоя животного.

Fig. 1. Apparatus «LAZMA ST» for studying the state of microcirculation (blood flow, lymph flow) and oxidative coenzymes -NADH and -FAD. in animal tissue

A.– Apparatus «LAZMA ST» with a connected camera in operation.; B. – A chamber for mice with a body weight of 40–50 g, providing a resting state of the animal.

Патологические изменения в организме мышей с СД 2 типа изучали на генетической модели сахарного диабета на мутантных мышах C57BL/KsJYLepr^{db}/+(B/Ks-Lepr^{db}/+) – (db/db), которые несут рецессивный ген leptinreceptor-Lepr^{db} – (db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома). Ген db в гомозиготном состоянии вызывает диабет, сходный с diabetesmellitus, с дегрануляцией β-клеток в островках поджелудочной железы (ПЖ), но без дефицита инсулина. Мыши – диабетика B/Ks-Lepr^{db}/Lepr^{db} (db/db) (n=40) обоих полов бесплодны. Для контроля динамики развития СД 2 типа использовали группу фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии B/Ks-Lepr^{db}/+ (db/+m) (n=16). Общие количество животных, задействованных в эксперименте, составляло 56 голов.

Кроме динамического изучения показателей микроциркуляции и тканевых окислительно-восстановительных коферментов изучали динамику изменения глюкозы в крови фотометрическим методом на приборе Ассу-Чек (Швейцария) с использованием тест-полосок.

В ходе работы нами была адаптирована платформа для размещения животных. Платформа ограничивала их подвижность (обеспечивала состояние покоя) (рис. 1, Б) для устранения помех и получения точных показаний микроциркуляции (периферического кровотока, лимфотока) и обменных процессов (содержания окислительных коферментов в ткани). Платформа была подобрана по массе тела мышей (20–70 г), для чего использовали специально подготовленные съемные камеры и фиксатор зонда, который фиксируется на хвосте у мыши.

После размещения животного в съёмной камере, прибор ЛАЗМА СТ выводил показатели на компьютер по установленной специальной программе, которая позволяет оценивать не только состояние тканевых изменений, но и одновременно дает оценку сосудистого тонуса и окислительного метаболизма в ткани хвоста в соответствии с протоколом программы прибора (в режиме реального времени). Согласно протоколу, длительность изучения записи ведется в течение 4 минут: из них 2 минуты (в УФ)- запись показателей кровотока, лимфотока и амплитуды флуоресценции НАДН и 2 минуты (в Син.) продолжается регистрация показателей кровотока, лимфотока, а также регистрируются амплитуды флуоресценции ФАД. После завершения 4 минут регистрации записей выдаются следующие результаты исследований: Анадн – нормированная амплитуда флуоресценции кофермента НАДН; Афад – нормированная амплитуда флуоресценции кофермента ФАД; Мпк – среднее ариф-

метическое значение показателя микроциркуляции кровотока; Мпл – среднее арифметическое значение показателя микроциркуляции лимфотока; ПОМ – показатель окислительного метаболизма, это комплексный диагностический показатель, характеризующий состояние связанных между собой компартментов микроциркуляторно-тканевой системы кожи: микроциркуляции крови и биомаркеров окислительного метаболизма – коферментов НАДН и ФАД; определяется по формуле $ПОМ = M_{\text{нутр}} / (A_{\text{надн}} + A_{\text{фад}})$, где $M_{\text{нутр}}$ – среднее значение нутритивного кровотока ($M_{\text{нутр}} = A_m / (A_n + A_c)$); где A_m , A_n – амплитуды колебаний кровотока, обусловленные миогенными и нейрогенными механизмами регуляции сосудистого тонуса; A_c – амплитуда сердечных колебаний кровотока); ФС МТС – суммарный параметр обследования функционального состояния микроциркуляторно – тканевой системы, объединяющий микроциркуляцию и окислительный метаболизм; позволяет судить о степени тяжести заболевания. Эти показатели определяются автоматически программным обеспечением.

Измерение показателей НАДН, ФАД и ПОМ у мышей с СД 2 типа и в группе контроля производили после предварительной подготовки и адаптации аппарата ЛАЗМА СТ к работе на мышах. Полученные результаты в сравниваемых группах были подвергнуты статистической обработке на персональном компьютере с предварительным использованием теста Шапиро-Уилкса на небольшом количестве выборок (n>5), для доказательства нормальности распределения экспериментальных данных. Достоверность различий определялась с помощью t-критерия Стьюдента (стандартный программный пакет Microsoft Excel 2007). Различия считались статистически значимыми, при p<0,05.

Результаты

С помощью показателей, измеряемых на приборе ЛАЗМА СТ, у мышей db/db (генетическая модель СД) с разными сроками жизни (n=24), была выявлена разная степень тяжести состояния, усиливающаяся по мере увеличения прожитого ими срока. Измерение НАДН, ФАД, ПОМ и ФС МТС позволило по степени тяжести развивающихся нарушений выявить 3 группы животных (рис. 2) с СД 2: с декомпенсацией (n=10), с повышенной активностью и субкомпенсацией (n=8), а также с повышенной активностью и компенсацией (n=6). Группу 4 составляли фенотипически здоровые мыши db/+m – гетерозиготы (n=6), которые были приняты за норму.

Из рисунка 2 видно, что в группе СД2 с декомпенсацией амплитуды коферментов были высокими: для

кофермента НАДН – амплитуда составляла $4,37 \pm 1,85$, для кофермента – ФАД $1,45 \pm 0,36$, а показатель окислительного метаболизма (ПОМ) был достоверно низким по сравнению с нормой и другими группами исследования и составлял $1,78 \pm 0,52$ ($p < 0,05$).

В группе с СД 2 с субкомпенсацией коферментов амплитуды НАДН ($1,03 \pm 0,16$) ФАД ($1,42 \pm 0,42$) и ПОМ ($7,29 \pm 1,45$) также достоверно отличались от контроля ($p < 0,05$).

В группе с компенсацией были выявлены не достоверные изменения амплитуд коферментов и ПОМ.

Среди группы животных с декомпенсацией было установлено, что 3 мыши db/db после измерения показателей (НАДН, ФАД и ПОМ), имели особенно выраженную тяжесть течения СД 2 типа: амплитуда кофермента -НАДН была высокой и составляла $4,48 \pm 1,18$ при норме $0,54 \pm 0,15$ ($p < 0,05$), амплитуда кофермента – ФАД составляла $1,74 \pm 0,06$ (норма $0,77 \pm 0,13$) ($p < 0,05$) и ПОМ их имел низкие значения $1,62 \pm 0,22$ (норма $13,95 \pm 4,98$) ($p < 0,05$). Т.е. у этих 3-х мышей был выявлен достоверно выраженный низкий уровень окислительных процессов в тканях организма на фоне высокого уровня глюкозы в крови (более 33 ммоль/л). В результате в течение 3–6 последующих дней эти мы-

ши погибли от гипергликемической комы, в возрасте 105, 151 и 167 дней.

В группе мышей db/db с декомпенсацией было выявлено животное с массой тела 40 г (рис. 3, А) и с мокнущей язвенной мацерацией кожи в области холки и ушей (срок жизни 169 дней). До возникновения мацерации масса животного составляла 54 г. Аппарат ЛАЗМА СТ позволил в реальном времени определить у этого животного состояние декомпенсированного окислительного метаболизма: амплитуды: – НАДН = 2,283, – ФАД = 1,358 и ПОМ = 1,939 (рис. 3, Б); уровень глюкозы в крови у этой мыши во время исследования составлял 31 ммоль/л.

В ходе данного исследования нами было установлено, что в графиках (рис. 3, Б), где отображались амплитуды коферментов НАДН (УФ) и ФАД (Син.) было выявлено формирование пиков при возбуждении с длиной волны 440 нм – первый пик в диапазоне 545 нм – 2-й пик – основной. Появление таких пиков характерно при накоплении в крови животного пигмента Липофусцина (рис. 3, Б, указан красными стрелками), который служит дополнительным доказательством тяжести нарастания патогенетических изменений в организме при данном заболевании.

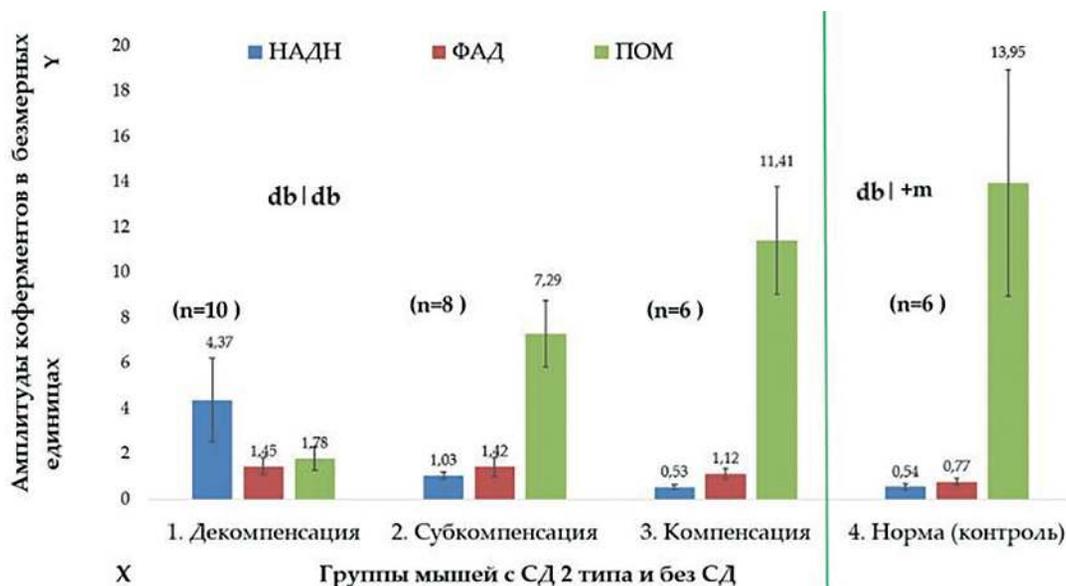


Рис. 2. Результаты измерения показателей коферментов НАДН, ФАД и ПОМ (средние значения) в ткани хвоста у мышей db/db (генетическая модель СД) и у мышей db/+m (контроль). На осях координат: X – разные группы мышей по степени выраженности тканево-метаболических нарушений (автоматическая оценка прибором): 1. Декомпенсация; 2. Субкомпенсация; 3. Компенсация; 4. Норма (контроль); Y – амплитуды коферментов в безмерных единицах.

Fig. 2. Measurement results of NADH, FAD and POM coenzymes (mean values) in tail tissue in db/db mice (genetic model of DM) and in db/+m mice (control). On the coordinate axes: X – different groups of mice according to the severity of tissue-metabolic disorders (automatic assessment by the device): 1. Decompensation; 2. Subcompensation; 3. Compensation; 4. Norm (control); Y – amplitudes of coenzymes in dimensionless units.

Липофусцин – известен как пигмент старения (или тяжести патологии); пигмент липидной и/или глюкопротеиновой природы, накапливается в пост – митотических клетках разных тканей и органов. Накопление липофусцина в клетке приводит к ее апоптозу или некрозу; в УФ – излучении 365 нм наблюдается эмиссия в области 530–650 нм [26–29]. Полученные данные как клинические (мокнущая язвенная мацерация) и биохимические (высокий уровень глюкозы в крови), так и данные по неинвазивной оценке микроциркуляторно-тканевых нарушений у декомпенсированных животных с СД, полученные на аппарате ЛАЗМА СТ, указывают на выраженную тяжесть патологии, что отражается на качестве и длительности срока жизни данной мыши db/db.

В ходе изучения тканевых изменений с помощью аппарата ЛАЗМА СТ при СД 2 типа у другой мыши db/db

с субкомпенсацией, массой тела 51 г и с уровнем глюкозы в крови 24 ммоль/л, были также выявлены повышенные амплитуды показатели – НАДН – 1,189 (норма 0,54±0,15); – ФАД – 1,669 (норма 0,77±0,13) и ПОМ 4,987 (норма 13,95±4,98). В реальном времени аппарат выявил у этой мыши не только формирование пиков Липофусцина, (рис. 4 красная стрелка – при возбуждении с длиной волны 440 нм – первый пик и в диапазоне 545 нм – 2 пик – основной), но также и формирование новых пиков – пиков Порфирина. Пики Порфирина формируются при возбуждении с длиной волны 770 нм – первый пик и в диапазоне 811 нм – 2 пик (рис.4 синяя стрелка) и свидетельствуют о прогрессирующем развитии заболевания.

Порфирины – это предшественники гема, азотосодержащие пигменты, лишенные железа. Избыточное накопление их крови у животных сопровождается

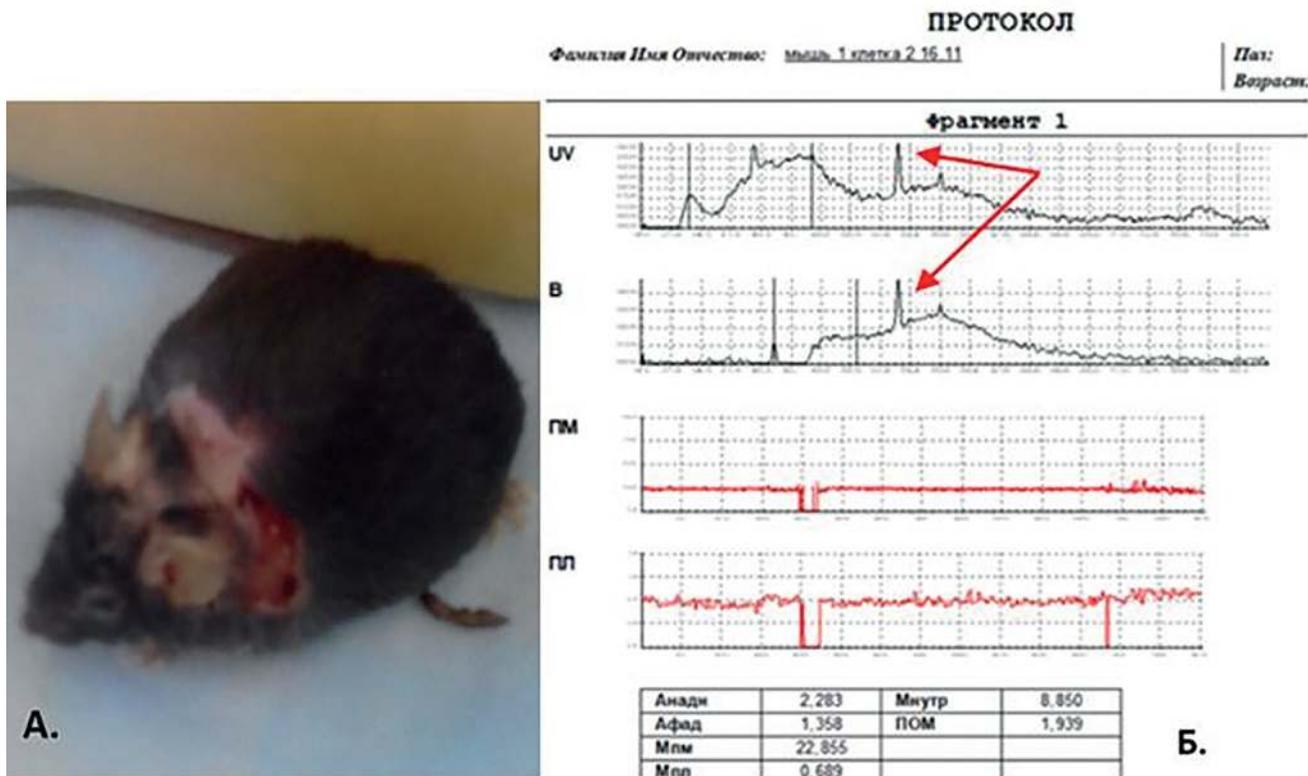


Рис. 3. Исследование микроциркулярно-тканевых процессов у мыши db/db с СД в стадии декомпенсации.

А. – Мышь с мацерацией кожи в области холки.; Б.- Регистрация НАДН, ФАД, кровотока и лимфотока в области хвоста. Обозначения на мониторе: UV – амплитуда НАДН; В – амплитуда ФАД; ПМ – кровотока; ПЛ – лимфотока. Стрелками обозначены пики пигмента липофусцина на кривой UV и В.

Fig. 3. Study of microcirculatory tissue processes in a db/db mouse with DM in the decompensation stage.

A. – A mouse with maceration of the skin in the region of the withers.; B.- Registration of NADH, FAD, blood flow and lymph flow in the tail area. Designations on the monitor: UV-amplitude of NADH; B is the FAD amplitude; PM – blood flow; PL – lymph flow. The arrows indicate the peaks of the lipofuscin pigment on the UV and B curve.

развитием гемолитической анемии и спленомегалии. Нарушение порфиринового обмена ухудшает течение сердечно-сосудистых заболеваний, неблагоприятно влияет на углеводный метаболизм и утяжеляет течение заболевания СД 2 типа [30–35]. В УФ – излучении 365 нм наблюдается эмиссия в области 700–900 нм.

Новая диагностическая тест-система для оценки тканевых изменений при СД 2 типа у мышей db/db была использована нами также в длительных опытах в течение 220 дней, параллельно с измерением глюкозы, начиная с возраста 1–1,5 мес. До 6,5 мес мыши db/db ($n=40$) и db/+m ($n=16$).

Нами установлено (рис. 5), что в возрасте 1,5 мес организм мыши db/db, активно адаптируется (компенсируется) к нарастающей гликемии $10,3 \pm 2,4$ ммоль/л (норма для здоровых мышей db/+m $5,4 \pm 0,5$ ммоль/л).

При одновременной оценке активности тканевых коферментов на аппарате ЛАЗМА СТ: были установлены амплитуды: – НАДН= $0,77 \pm 0,21$ (норма $0,54 \pm 0,15$), – ФАД= $1,27 \pm 0,45$ (норма $0,77 \pm 0,13$) и ПОМ= $9,42 \pm 3,15$ (норма $13,95 \pm 4,98$), Аппаратом ЛАЗМА СТ формирование первых пиков Липофусцина было отмечено уже в возрасте 1,5 мес у 30% животных, однако состояние декомпенсации по окислительно-восстановительным процессам не было выявлено.

Формирование в организме животных первых признаков декомпенсаций обнаруживается в возрасте 2–2,5 мес у 14% голов, когда идет активно набор веса и уровень гликемии растет (до $18,7 \pm 3,83$ ммоль/л); появляются выраженные клинические признаки полиурии, а показатели микроциркуляции (активность трофики) медленно снижаются, амплитуды коферментов

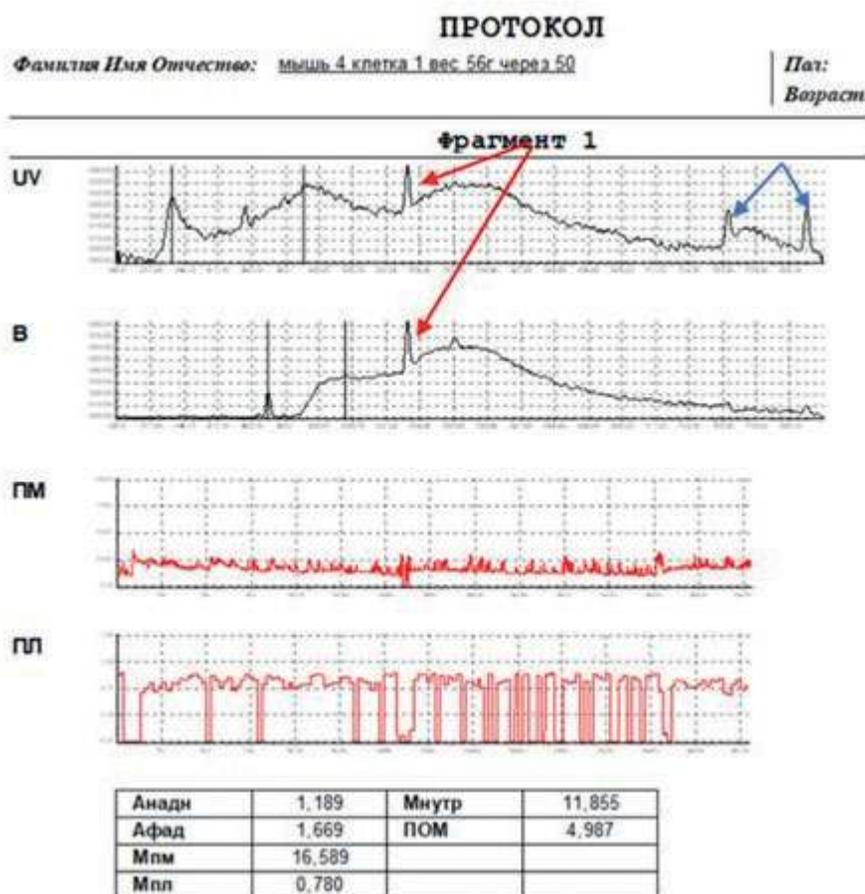


Рис.4 Регистрация НАДН, ФАД, кровотока и лимфотока у мыши db/db с СД в стадии субкомпенсации. Обозначения на мониторе: UV- амплитуда НАДН; В – амплитуда ФАД; ПМ – кровотока; ПЛ – лимфоток. Красные стрелки – пики пигмента липофусцина и синие стрелки – пики порфирина.

Fig. 4 Registration of NADH, FAD, blood flow and lymph flow in db/db mice with DM in the subcompensation stage. Designations on the monitor: UV-estimation of NADH; B is the FAD value; PM – blood flow; PL – lymph flow. Red arrows are lipofuscin pigment peaks and blue arrows are porphyrin peaks.

повышаются – НАДН=1,16±0,47, – ФАД=1,51±0,44 и понижается уровень ПОМ=6,26±2,36. Полученные данные указывают на снижение интенсивности окислительных процессов и развитие тканевой гипоксии в организме на этом сроке.

С увеличением возраста у животных повышаются: инсулинорезистентность – гипергликемия (глюкозо-токсичность), полиурия, полифагия, что введет к снижению адаптивных процессов, а также к снижению резистентности организма и усилению тяжести патофизиологических признаков болезни. В возрасте 6–6,5 мес. у мышей db/db (рис. 5) наблюдается гипергликемия 27,4±2,09 ммоль/л (норма 5,7±0,65 ммоль/л $p<0,05$) и высокие амплитуды коферментов: -НАДН=1,42±0,75 (норма 0,65±0,01 $p<0,05$), – ФАД=1,51±0,33 (норма 0,97±0,02 $p<0,05$) и низкий уровень ПОМ=3,97±1,39 (норма 10,912±2,04 $p<0,05$). На этом сроке аппаратом ЛАЗМА СТ было выявлено появление пиков пигмента Липофусцина у 40% животных и у двух мышей (5%) экспериментальной группы отмечено появление пиков пигмента Порфирина, а также состояния декомпенсации у 35% животных.

Обсуждение

Заболеваемость СД 2 типа с развитием тяжелых метаболических нарушений в организме и опасных для жизни осложнений неуклонно увеличиваются во всем мире. Это указывает на актуальность продолжения по-

иска эффективных методов лечения под контролем доступных, системных и нормативных показателей, позволяющих оценивать микроциркуляторные и метаболические нарушения, а также прогнозировать результаты применяемой терапии.

В настоящее время в клиниках РФ при СД используется диагностический аппарат ЛАЗМА СТ, который позволяет исследовать микроциркуляцию методом лазерной доплеровской флуометрии [18,19], окислительно-восстановительные процессы в тканях методом лазерной флуоресцентной спектроскопии [15, 20-22], а также позволяет автоматически, с помощью программного обеспечения, определять степени тяжести нарушений и прогнозировать течение заболевания. Между тем, диагностические возможности аппарата ЛАЗМА СТ не исследовались на мелких лабораторных животных (мышях), в том числе при СД.

Ставя своей целью применить аппарат ЛАЗМА СТ для диагностики микроциркуляторно- метаболических нарушений у мутантных мышей db/db с генетической моделью СД 2 типа нам необходимо было прежде всего устранить помех на датчике, ограничить подвижность животного во время измерения. Для этих целей была подготовлена платформа, соответствующая массе тела мышей (20–70 г), а также использованы специально подготовленные съемные камеры и фиксатор зонда, который фиксировался на участке хвоста (рис.1, А, Б).

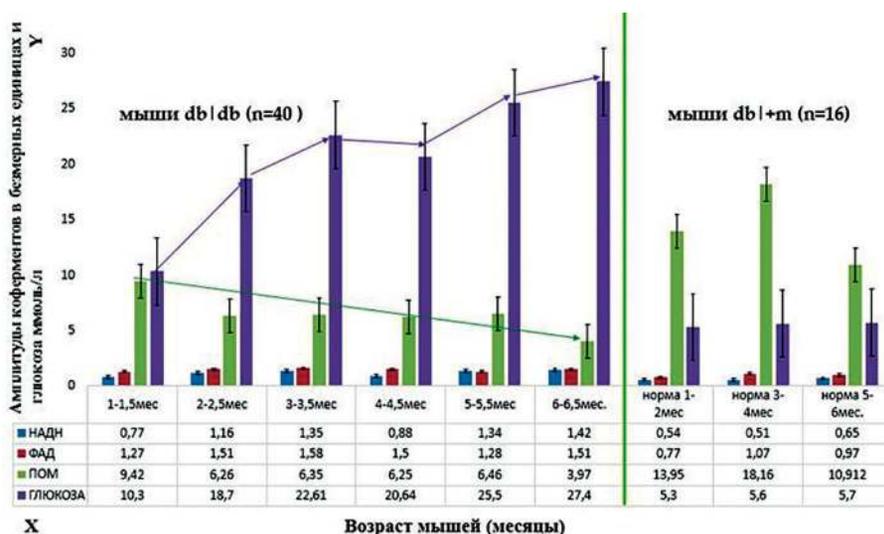


Рис. 5. Динамика изменения гликемии и микроциркуляторно – тканевых показателей у мышей db/db с СД и у мышей без СД db/+m (норма) в разном возрасте (возраст мышей указан под амплитудами и измеряемых показатели: НАДН; ФАД; ПОМ и Глюкоза). На осях координат: X- возраст мышей (месяцы); Y- амплитуды коферментов в безмерных единицах и глюкоза ммоль/л.

Fig. 5. Dynamics of changes in glycemia and microcirculatory-tissue parameters in db/db mice with DM and in mice without DM db/+m (normal) at different ages (the age of mice is indicated under the amplitudes and measured parameters: NADH; FAD; POM and Glucose). On coordinate axes: X- age of mice (months); Y- amplitudes of coenzymes in measureless units and glucose mmol / l.

С помощью аппарата ЛАЗМА СТ проводилось исследование показателей микроциркуляции (кровоток и лимфоток), активности окислительных – восстановительных процессов (коферментов НАДН и ФАД), а также ПОМ – показатель окислительного метаболизма и ФС МТС – показателя, автоматически рассчитываемого программным обеспечением аппарата и характеризующего степень тяжести состояния животных с СД.

Было выполнено две серии опытов, в которых оценивалась возможность определения степени тяжести состояния животных с СД 2, а также зависимость нарастания степени тяжести и повышения уровня глюкозы в крови по мере увеличения срока жизни мышей с СД 2 типа. Мы показали, что одновременное измерение НАДН, ФАД и ПОМ позволяет выявить 3 группы животных, различающихся по степени отклонения их показателей от контроля: компенсация, субкомпенсация и декомпенсация (рис. 2). Именно у мышей в состоянии декомпенсации метаболические показатели тяжести состояния подтверждались критически высоким уровнем глюкозы, мацерацией кожи в области холки (рис. 3) и гибелью животных на фоне гипергликемической комы. Исследование связи тяжести нарушения микроциркуляторно-метаболических показателей у мышей с СД 2 типа в зависимости от увеличения сроков жизни животных – подтвердило связь прогрессирующих в организме циркуляторно-метаболических нарушений с неуклонно повышающимся уровнем глюкозы в крови (рис. 5). Примечательно, что у животных в декомпенсированном и субкомпенсированном состоянии при регистрации амплитуд НАДН и ФАД появляются дополнительные пики активности, соответствующие появлению в тканях свободных пигментов – липофусцина (у 40% мышей) и порфирина (у 5%) (рис. 4). Выявления свободных пигментов – липофусцина и порфирина, которые в норме входят в состав тканей, образуя соединения с белками, липидами и включаются в структуры клеточных мембран и клеточных ферментов, свидетельствуют о развитии тяжелых деструктивных процессов организма и прогнозируют не благоприятный исход.

Таким образом, использование аппарата ЛАЗМА СТ позволяет не только изучать в динамике нарушения тканевого метаболизма у мышей с СД и сопоставлять их с нарушениями глюкозы в крови, но также прогнозировать тяжесть нарушения микроциркуляции и окислительного метаболизма в условиях субкомпенсации и декомпенсации, выявляя начавшиеся нарушения липидного и белкового обмена, прогнозирующие тяжелый исход заболевания.

Выводы:

1. Заводской Аппарат лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» пригоден для выполнения доклинических исследований НАДН, ФАД и ПОМ на мелких лабораторных животных с СД, но должен быть адаптирован для использования на мышах: должны быть созданы съёмные камеры для животных разной массы тела и подобран фиксатор зонда на хвосте для ограничения его подвижности во время измерения.

2. Аппарат ЛАЗМА СТ, адаптированный для применения, позволяет в динамике контролировать и прогнозировать тяжесть микроциркуляторно – тканевых нарушений в организме мышей с генетической моделью СД 2 типа и расширенно характеризовать тяжесть состояния животного при одновременном измерении уровня глюкозы в крови.

3. Аппарат ЛАЗМА СТ при регистрации активности НАДН и ФАД позволяет выявить в ткани у животных с СД 2 типа в состоянии декомпенсации и субкомпенсации характерные – пики амплитуд пигмента Липофусцина у 40% животных и пики амплитуд пигмента Порфирина у 5% животных, в качестве дополнительных маркеров тяжести метаболических изменений при СД 2 типа.

4. Преимуществом использования аппарат ЛАЗМА СТ в качестве тест-системы, является не только её высокая информативность и безопасность применения, но и возможность неинвазивного получения в реальном времени данных о динамике коферментов окислительно-восстановительных процессов в тканях организма (-НАДН и -ФАД).

Авторы выражают глубокую благодарность Сидорову В.В. (Технопарк «Строгино» ООО НПП «ЛАЗМА», e-mail: lazma@plusnet.ru) за помощь в адаптации и интерпретации полученных результатов у мелких лабораторных животных.

Литература

(п.п. 6–9; 11–17; 20–22; 24; 25; 28; 29; 31–35 см. References)

1. Нурдинова Г.У., Авезова С.Г., Бердиева Д.Б., Шеркузиева Г.Ф. Эпидемиология сахарного диабета. *International scientific review*. 2016; 7(17): 93–5.
2. Стаценко М.Е., Деревянченко М.В., Титаренко М.Г., Пастухова О.Р. Нарушения микроциркуляции кожи у больных с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа в зависимости от стадии хронической болезни почек. *Нефрология*. 2015; 19(5): 57–63.
3. *Осложнения сахарного диабета: лечение и профилактика* / под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. 2017: 78–82.
4. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. *Биологическая химия: учеб.*, 3-е изд., стереотипное. М.; Медицина, 2008.

5. Мкртумян А.М., Егшатын Л.В. Субетта – новый активатор рецептора инсулина. *Эффективная фармакотерапия*. 2019; 15(12): 12–7.
10. Подколodный Н.Л., Твердохлеб Н.Н., Подколodная О.А. Математическая модель циркадного осциллятора млекопитающих: взаимодействие с системой NAD⁺/S Биологическая химия IRT1 и возрастные изменения экспрессии генов циркадного осциллятора. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016; 20(6): 848–56.
18. *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови*/ Под ред. А.И. Крупаткина, В.В. Сидорова: Руководство для врачей. 2005.
19. Петрищев Н.Н. Медицинская технология. Способ определения реактивности сосудов микроциркуляторного русла и вазомоторной 138 функции эндотелия с использованием высокочастотной доплерографии. 2009.
23. Тучин В.В. *Оптическая биомедицинская диагностика*, в 2-х томах/Пер. с англ. под ред. В.В. Тучина. 2007; 2.
26. Ефимов А.А., Маслякова Г.Н. О роли липофусцина в инволютивных и патологических процессах. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2009; 5(1): 111–5.
27. Лугин И.А., Игнатенко В.В., Прокофьева К.С. Современные представления о липофусцине как о биомаркере старения. *Синергия наук*. 2017; 18: 1147–56.
28. Чаплыгина А.В., Векшин Н.Л. Липофусцин и митолитофусцин в органах молодых и взрослых крыс. *Успехи геронтологии*. 2018; 31 (2): 197–202
30. Пуховская С.Г., Иванова Ю.Б., Семейкин А.С., Сырбу С.А., Крук Н.Н. Исследование кислотных и координационных свойств октабром-замещенных порфиринов в системе 1,8-диазабисцикло [5,4,0] ундец-7-ен – ацетонитрил. *Российский химический журнал (Журн. Рос. хим. общества имени Д.И. Менделеева)*. 2017; LXI (1): 56–66.
8. Roglic G., Unwin N., Bennett P.H. The burden of mortality attributable to diabetes: Realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. 2005; 28(9): 2130–5.
9. Vinik A.I., Nevoret M.L., Casellini C., Parson H. Diabetic Neuropathy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2013; 42(4): 747–87.
10. Podkolodny N.L., Tverdokhle N.N., Podkolodnaya O.A. Mathematical model of the mammalian circadian oscillator: interaction with the NAD⁺/S system Biological chemistry of IRT1 and age-related changes in circadian oscillator gene expression. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2016; 20(6): 848–56. (In Russian)
11. Fernyhough P., McGavock J. Mechanisms of disease: mitochondrial dysfunction in sensory neuropathy and other complications in diabetes. *Handb. Clin. Neurol.* 2014; 126; 353–77.
12. Klonizakis M., Manning G., Lingam K., et al. Effects of diabetes on the cutaneous microcirculation of the feet in patients with intermittent claudication: *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015; 61(3): 439–44.
13. Kabbani M., Rotter R., Busche M., et al. Impact of diabetes and peripheral arterial occlusive disease on the functional microcirculation at the plantar foot. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open*. 2013; 1(7): 48.
14. Luo X., Li R., Yan L.J. Roles of pyruvate, NADH, and mitochondrial complex I in redox balance and imbalance in β cell function and dysfunction. *J. Diabetes Res*. 2015; 2: 1–12.
15. Shinkin M.V., Mkrumyan A.M., Zvenigorodskaya L.A., Sidorov V.V. Methods of laser Doppler flowmetry and fluorescence spectroscopy for assessing the state of the microcirculatory channel and oxidative metabolism in people with diabetes mellitus. *Methodological recommendations*. 2019.
16. Fuchs D., Dupon P.P., Schaap L.A., Draijer R. The association between diabetes and dermal microvascular dysfunction noninvasively assessed by laser Doppler with local thermal hyperemia: A systematic review with meta-analysis. *Cardiovascular Diabetology*. 2017; 16(1): 1–12.
17. Jörneskog G., Kalani M., Kuhl J. Early microvascular dysfunction in healthy normal-weight males with heredity for type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005; 28(6): 1495–7.
18. *Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation. [Lazernaya dopplerovskaya fluometriya mikrotsirkulyatsii krovi]*. Ed. A.I. Krupatkin, V.V. Sidorov: A guide for doctors. 2005. (In Russian)
19. Petrishchev N.N. *Medical technology. A method for determining the reactivity of the vessels of the microvasculature and the vasomotor function of the endothelium using high-frequency dopplerography. [Meditsinskaya tekhnologiya. Sposob opredeleniya reaktivnosti sudov mikrotsirkulyatornogo rusla i vazomotornoy 138 funktsii endoteliya s ispol'zovaniem vysokochastotnoy doplerografii]*. N.N. Petrishchev, E.Yu. Vasina. 2009. (In Russian)
20. Bruno R.M. Advances in the non-invasive assessment of vascular dysfunction in metabolic syndrome and diabetes: Focus on endothelium, carotid mechanics and renal vessels/ R.M. Bruno, K.D. Resink, L. Ghiadoni. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2017; 27: 121–8.
21. Clark M.G. Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008; 295(4): 732–50.
22. Hsui H. Differences in laser-Doppler indices between skin-surface measurement sites in subjects with diabetes. *Microvasc. Res.* 2018; 115: 1–7.

References

1. Nurdinova G.U., Avezova S.G., Berdiev D.B., Sherkuziev G.F. Epidemiology of diabetes mellitus International scientific review. 2016; 7(17): 93–5. (In Russian)
2. Statsenko M.E., Derevyanchenko M.V., Titarenko M.N., Pastukhov O.R. Skin microcirculation disorders in patients with arterial hypertension and type 2 diabetes depending on the stage of chronic kidney disease. *Nephrology*. 2015; 19(5): 57–63. (In Russian)
3. *Complications of diabetes mellitus: treatment and prevention [Oslozheniya saharnogo diabeta: lechenie i profilaktika]*. Ed. I.I. Dedova, M.V. Shestakova. 2017: 78–82. (In Russian)
4. Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biological chemistry: textbook, 3rd ed. [Biologicheskaya himiya: ucheb., 3-e izd.]*. stereotypical. Moscow; Meditsina Publ., 2008. (In Russian)
5. Mkrumyan A.M., Egshatyan L.V. Subetta is a novel insulin receptor activator. *Effective pharmacotherapy*. 2019; 15(12): 12–7. (In Russian)
6. Greenman R.L., Panasyuk S., Wang X., et al. Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot. *Lancet*. 2005; 366(9498): 1711–7.
7. Head K.A. Peripheral neuropathy: pathogenic mechanisms and alternative therapies. *Alternative medicine review: a journal of clinical 106 therapeutic*. 2006; 11(4): 294–329.

23. Tuchin, V.V. Optical biomedical diagnostics. in 2 volumes / Per. from English. ed. V.V. Tuchin. 2007; 2. (In Russian)
24. Mayevsky A. Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292(2): 615–40.
25. Mokry M., Gal P. and et.al. Experimental study on predicting skin flap necrosis by fluorescence in the FAD and NADH bands during surgery. *Photochem. Photobiol.* 2007; 83(5): 1193–6.
26. Efimov A.A., Maslyakova. G.N. On the role of lipofuscin in involutive and pathological processes. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2009. 2009; 5(1): 111–5. (in Russian)
27. Lugin I.A., Ignatenko V.V., Prokofieva K.S. Modern concepts of lipofuscin as a biomarker of aging. *Sinerhiya nauk.* 2017; 18: 1147–56. (In Russian)
28. Chaplygina, A. V., Vekshin N.L. Lipofuscin and mitolipofuscin in organs of young and adult rats. *Advances in gerontology. Uspekhi gerontologii.* 2018: 31 (2): 197–202.
29. Radu R.A., et al. Treatment with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt's macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003; 100: 4742–7.
30. Pukhovskaya S.G., Ivanova Yu. B., Semeikin A.S., Syrbu S.A., Kruk N.N. Acidic and coordination properties the oktabrom-substituted porphyrins in the system 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undets-7-ene-acetonitrile. *Rossiyskiy khimicheskiy jurnal (Jurn. Ros. Him. Obshestva imeni D.I. Mendeleeva).* 2017; LXI (1): 56–66. (In Russian)
31. Bonnett R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy.* Gordon and Breach Science Publishers, 2000; 305.
32. Chaplygina, A. V., and N.L. Vekshin. Lipofuscin and mitolipofuscin in organs of young and adult rats. *Advances in gerontology. Uspekhi gerontologii.* 2018: 31(2): 197–202.
32. Ivanova Yu. B., Pukhovskaya S.G., Mamardashvili N.Zh., Koifman O.I., Kruk M.M. Rate-acidity hysteresis and enthalpy-entropy compensation upon metalloporphyrin formation: implication for the metal ion coordination mechanism. *Journal of Molecular Liquids.* 2019; 275 issue 3: 491–8.
33. Kadish K.M., Smith K.M., Guilard R. *Handbook of porphyrin science.* Acad. Press: New-York: World Scientific. 2010–2019: Vol. I–XX.
34. Nam D.T., Ivanova Yu. B., Pukhovskaya S.G., Kruk M.M and Sergei A. Syrba Acid-base equilibria and coordination chemistry of the 5,10,15,20-tetraalkyl-porphyrins: implications for metalloporphyrin synthesis. *RSC Advances.* 2015; 5 (33): 26125–31.
35. Pukhovskaya S.G., Nam D. T, Ivanova Y.B., Liulkovich L.S., Semeikin A.S. Porphyrin acidity and metal ion coordination revisited: electronic substitution effects. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 2017; 89 (issue 3–4): 325–32.

Сведения об авторах:

Степанова Ольга Ивановна, канд. биол. наук, зав. лаб. № 5 ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: olgsima50@mail.ru;

Клёсов Роман Алексеевич, науч. сотр., лаб. № 5 ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: klesrom@mail.ru;

Семёнов Хызыр Хыйсаевич, канд. биол. наук, зав. лаб. № 10 ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России;

Помыткин Игорь Анатольевич, канд. хим. наук, зам. дир. по науке, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: ipomytkin@mail.ru;

Онищенко Нина Андреевна, доктор мед. наук, проф., гл. спец. Отдела биомед. Технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Каркищенко Владислав Николаевич, доктормед. наук, проф., директор, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: scbmt@yandex.ru