

WORLD SCIENCE

PROCEEDINGS OF ARTICLES THE INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE
CZECH REPUBLIC, KARLOVY VARY - RUSSIA, MOSCOW, JUNE 29-30, 2017



World Science

Proceedings of articles the international scientific conference

Czech Republic, Karlovy Vary - Russia, Moscow, June 29-30, 2017

Czech Republic, Karlovy Vary - Russia, Kirov, 2017

UDC 001
BBK 72
M64

Scientific editors:

Medvedeva Irina Aleksandrovna, Doctor of pedagogical sciences, professor of Chuvash State Pedagogical University named I. Ja. Jakovlev

Zaripova Tat'jana Nikolaevna, Doctor of Medical Sciences, professor, leading researcher of the Tomsk Scientific Research Institute of Balneology and Physiotherapy of the Siberian Federal Scientific and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency

Vernigorov Ju.M., Doctor of Technical Sciences, Professor of the Don State Technical University

Sitnikova L.V., Doctor of Economics, Professor of the Department of Business Economics of Ufa State Aviation Technical University

M64 World Science: Proceedings of articles the international scientific conference. Czech Republic, Karlovy Vary - Russia, Moscow, June 29-30, 2017 [Electronic resource] / Editors prof. I.A.Medvedeva, T.N.Zaripova, Ju.M.Vernigorov, L.V.Sitnikova. – Electron. txt. d. (1 file 6,2 MB). – Czech Republic, Karlovy Vary: Skleněný Můstek – Russia, Kirov: MCNIP, 2017. – ISBN 978-80-7534-147-1 + ISBN 978-5-00090-122-9.

Proceedings includes materials of the international scientific conference «World Science», held in Czech Republic, Karlovy Vary-Russia, Moscow, June 29-30, 2017. The main objective of the conference - the development community of scholars and practitioners in various fields of science. Conference was attended by scientists and experts from Belarus, Kazakhstan, Russia, Moldova.

ISBN 978-80-7534-147-1 (Skleněný Můstek, Karlovy Vary, Czech Republic)

ISBN 978-5-00090-122-9 (MCNIP LLC, Kirov, Russian Federation)

Articles are published in author's edition. Editorial opinion may not coincide with the views of the authors

Reproduction of any materials collection is carried out to resolve the editorial board

© Skleněný Můstek, 2017

© MCNIP LLC, 2017

Table of Contents

Section 1. Physics and Mathematics	9
Преснова А.П. Алгоритмический метод решения уравнения Риккати при построении субоптимальных управлений нелинейными объектами	10
Section 2. Biology	21
Балашевич Т.В. Потенцирующее влияние плазминогена на клетки спинного мозга	22
Косян Д.Б. Оценка действия наночастиц на различных тест-объектах...	46
Сметанина М.А., Сипин Ф.А., Севостьянова К.С., Майбородин И.В., Филиппенко М.Л. Экспрессия белков внеклеточного матрикса и сигнальных путей, задействованных в патогенезе варикозного расширения вен	51
Section 3. Technology	58
Вернигоров Ю.М., Лелетко К.К., Фролова Н.Н. Моделирование разрушения частиц ферромагнитных материалов в магнитовибрирующем слое	59
Войнов К.Н., Хилдаяти А., Гхеллаб Я. Методики защиты воздушного бассейна от газов предприятий и выходящих из труб автомобилей	71
Коваль Г.И., Каримова Т.Г. Технология и оборудование для маятниковой зигзагообразной укладки минеральной ваты.....	76
Подобедов П.Н., Масленников П.А. Анализ отказов электрооборудования распределительных подстанций по причине электроизоляционных элементов конструкции и способа их предотвращения.....	96

Передельский Г.И., Плесконос Л.В. Многоветвистые мостовые электрические цепи на основе четырёхполюсников R-L и R-C структур.....	106
Сенченко К.А. Применение информационных моделей BIM для выбора оптимального решения развития районов с социально – экономической сегрегацией.....	117
Раздел 4. Agriculture	122
Ермакова Н.В. Использование природных антиоксидантов для коррекции стресса в животноводстве.....	123
Section 5. History and Archeology.....	128
Арчебасова Н.А. «Разрешено к использованию для ...»: Просветительная печатная деятельность в Российской империи XIX века	129
Шувалов В.И. Дж. Ст. Милль и проблема дедуктивных установок в области исследования социально-психического.....	148
Section 6. Economics.....	157
Александрова М.А., Пахомова Е.А., Рожкова О.В. Основные подходы к эконометрическому моделированию занятости на основе отраслевой специфики.....	158
Вукова А.Е., Onoshko O.U. Currency Wars.....	163
Замулин А.Л., Ивакина М.В. Повышение внутренней интеграции компании: развитие взаимодействия и сотрудничества	174
Исмагилова Л.А., Ситникова Л.В. Планирование технического обслуживания и ремонта оборудования электросетевой компании... ..	195
Каримова Т.Г. Исследование импортозависимости предприятий машиностроения и металлургии Челябинской области	202
Кислая И.А., Мурачева О. Обзор современных направлений совершенствования управления денежными потоками организации	219

Коршунова Л.Н., Машкова А.В. Организация системы учета затрат на производство продукции растениеводства как фактор экономической безопасности предприятия	225
Мальцева Ю.А., Данилова К.А. Оппортунизм розничного покупателя – девиантное поведение или ответная реакция: маркетинговый опыт осмысления проблемы	238
Маркарян В.Р. Производительность труда как важнейший приоритет экономической политики государства	248
Марьяненко А.А. Особенности взаимодействия субъектов венчурной индустрии в Израиле	254
Самохина Е.А. Особенности системы высшего образования (на примере Японии)	260
Смирнов А.В. Экономические предпосылки тэтчеризма	263
Стоянова М.В. К вопросу оценки синергетического эффекта инжиниринговой деятельности	268
Ширинкина Е.В. Модель выпускника в парадигме реформирования высшего образования.....	275
Section 7. Philosophy	278
Плужникова Н.Н., Феденев В.Д. Манипуляция сознанием в современном обществе: общественно-политические и религиозные аспекты	279
Section 8. Philology	284
Иванова П.С. Отрицательная коннотация в объекте оценки сравнений художественного текста	285
Nikishina S.R, Yarullina A.Sh. Language interference in teaching of a foreign language.....	292
Section 9. Pedagogy	296
Дивеева Г.В., Ключова В.В., Слинкин С.В. Адресные программы повышения качества образования как элемент стратегии поддержки образовательных организаций.....	297

Дмитревская Ю.С., Фоломкин А.И. Применение современных САПР при подготовке бакалавров по направлению «Технологические машины и оборудование»	320
Дунаев Д.А., Баранова Н.А. Интеллектуальная информационная система в процессе разрешения конфликта учебно-профессиональной адаптации студентов	325
Живаева Л.Н. Проблема обучения младших школьников электронной переписке	330
Zolotova M.V., Ganyushkina E.V., Kaminskaya N.V. Task-Based Learning as a variable component of standardized language teaching	335
Лопарева А.А. Процесс развития одаренности и исследовательских качеств лицеистов в рамках сетевого взаимодействия образовательных и других организаций.....	341
Медведева И.А., Таймасова Р.М. Принципы модульной технологии в дирижерско-хоровой подготовке педагога-музыканта	361
Смирнова Е.Е. Актуальные вопросы подготовки бакалавров, изучающих налоговые дисциплины в условиях глобальных изменений	366
Ширшова И.А. Содержание и структура курса «Взаимодействие субъектов педагогического процесса» для подготовки молодых ученых-педагогов	371
Юшкова К.В. Роль ценностного отношения к профессии в процессе профессионального самоопределения будущего бакалавра.....	379
Section 10. Medicine	386
Алмуратова А.С. Распространенность и структура рецессии десны.....	387
Гончарова О.М., Сапко Н.Н., Добыш Л.В., Перетолчина О.В., Киреева О.С. Сравнительный анализ качества проведения диспансеризации больных кислотозависимыми заболеваниями в амбулаторных условиях	392
Ермолова Н.В., Маркарьян И.В., Друккер Н.А., Аванесова Т.Г., Левкович М.А., Моисеева Н.Н., Томай Л.Р., Александрова Е.М. Лептин и молекула	

сосудистой клеточной адгезии сыворотки крови и перитонеальной жидкости в формировании стадий наружного генитального эндометриоза у пациенток репродуктивного возраста	397
Ермошкин В. Возможный механизм геморроя и других проблем органов малого таза	409
Зарипова Т.Н., Антипова И.И., Юрьева Н.М. Патогенетическая общность поражения систем дыхания и пищеварения при бронхиальной астме.....	412
Левкович М.А., Ермолова Н.В., Аванесова Т.Г., Маркарян И.В. Генитальный эндометриоз: теории формирования	417
Маркарян И.В., Ермолова Н.В., Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Томай Л.Р., Аванесова Т.Г., Колесникова Л.В. Метаболомные особенности агматина, янтарной и лимонной кислот в сыворотке крови при наружном генитальном эндометриозе	426
Наркевич А.Н. Алгоритмы сегментации цифровых микроскопических изображений мокроты, окрашенной по методу Циля-Нильсена	431
Тихон А.С. Профессиональные факторы, связанные с синдромом выгорания	437
Section 11. Art Criticism	447
Степуленок Я.А. Архитектурные доминанты улично-ландшафтной сети застройки исторического центра Санкт-Петербурга.....	448

SECTION 1.

PHYSICS AND

MATHEMATICS

АЛГОРИТМИЧЕСКИЙ МЕТОД РЕШЕНИЯ УРАВНЕНИЯ РИККАТИ ПРИ ПОСТРОЕНИИ СУБОПТИМАЛЬНЫХ УПРАВЛЕНИЙ НЕЛИНЕЙНЫМИ ОБЪЕКТАМИ

ПРЕСНОВА А.П.

РОССИЯ, НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ВЫСШАЯ ШКОЛА
ЭКОНОМИКИ

Аннотация. Рассматривается проблема построения оптимального управления для класса нелинейных объектов, представимых в виде объектов с линейной структурой и параметрами, зависящими от состояния. Линейность структуры, преобразованной исходной нелинейной системы, и квадратичный функционал качества позволяют при синтезе субоптимального управления, перейти от необходимости поиска решений уравнения Гамильтона-Якоби к уравнению типа Риккати с параметрами, зависящими от состояния. Основная проблема синтеза оптимального управления связана с проблемой поиска решения полученного уравнения в темпе функционирования объекта. В работе предложен алгоритмический метод решения данного уравнения, основанный на использовании необходимых условий оптимальности рассматриваемой системы управления.

Ключевые слова: математическое моделирование, субоптимальное управление, нелинейные динамические системы, уравнение Риккати, уравнение Гамильтона-Якоби-Беллмана.

Abstract. The paper considers the problem of constructing optimal control for a class of nonlinear objects, can be represented as objects with linear structure and parameters, depending on the state. The linearity of the structure, converted the original nonlinear system, and a quadratic cost functional allows the synthesis of

suboptimal control to move from the necessity of finding solutions to equations of Hamilton-Jacobi equation of Riccati type with the parameters depending on the state. The main problem of synthesis of optimal control deals with the problem of finding solutions to the resulting equations in the operation rate of the object. In the work proposed algorithmic method of solving this equation, based on the use of necessary optimality conditions of the considered control system.

Keywords: mathematical simulation, suboptimal control, nonlinear dynamical systems, Riccati equation, the equation of Hamilton-Jacobi-Bellman.

Введение

С развитием науки и техники в теории автоматического управления появилась возможность построения субоптимальных управлений для нелинейных динамических систем с помощью различных методов (линеаризация рядом Тейлора, линеаризация обратной связью, поточечное решение системы). Значительно расширился класс объектов, работающих в условиях неполной априорной и текущей информации об их состоянии, параметрах, взаимодействии со средой. В большинстве практических приложений достоверная априорная информация о модели исследуемого объекта вообще отсутствует, и ее построение связано с большими трудностями, а потому задачу построения управления приходится решать при неполном знании модели, а также в условиях стохастической неопределенности [1, 2].

В последние годы большое внимание уделяется медицинской и биологической сферам приложения идей теории управления. На сегодняшний день, синтезированные математические модели, использующие параметры, полученные из обработки реальных данных, позволяют, например, описывать процессы, происходящие в организме человека при таких заболеваниях как сахарный диабет, рак или при наличии вируса ВИЧ в организме [3,4,5].

В данной работе предложен метод алгоритмического конструирования систем управления с неполной информацией о состоянии, параметрах и

взаимодействии со средой, основанный на применении основных результатов аналитического конструирования [6], а именно, на применении в основе конструкций алгоритмов оптимизации необходимых (достаточных) условий минимума функционалов качества. В настоящей статье в рамках алгоритмического конструирования [7] предложен алгоритм оптимизации нестационарных систем управления с неполной информацией о параметрах, основанный на применении принципа минимума Понтрягина и необходимых условий оптимальности (уравнение Гамильтона-Якоби).

Постановка задачи

Пусть нелинейный управляемый и наблюдаемый объект описывается векторным дифференциальным уравнением

$$\frac{d}{dt}x(t) = f(x) + B(x)u(t), \quad (1)$$

$x \in R^n$ – состояние системы; $x_0 \in X_0$, X_0 – область возможных начальных состояний системы; $u \in R^r$ – управление, подлежащее нахождению. Матрицы $f(x), B(x)$ действительны и непрерывны, пара матриц $\langle f(x), B(x) \rangle$ является управляемой, кроме того будем предполагать матрицы достаточно гладкими, чтобы через любые (t_0, x_0) проходило одно и только одно решение $x(t, t_0, x_0)$. Вектор-функция $f(x)$ – непрерывная дифференцируемая по $x \in \Omega_x$.

Исходная нелинейная система (1) может быть представлена в виде модели системы [8]

$$\frac{d}{dt}x(t) = A(x)x(t) + B(x)u(t), \quad x(0) = x_0, \quad (2)$$

которая имеет линейную структуру с параметрами, зависящими от состояния $A(x)x(t) = f(x)$. Для синтеза управления $u(t)$ введем функционал качества

$$J(x,u) = \frac{1}{2} \int_{t_0}^{t_f} \{ x^T(t) Q x(t) + u^T(t) R u(t) \} dt. \quad (3)$$

Оптимальное управление определяется соотношением

$$u(t) = -R^{-1} B^T(x) S(x) x(t), \quad (4)$$

где матрица $S(x)$ – решение уравнения Риккати с параметрами, зависящими от состояния,

$$S(x)A(x) + A^T(x)S(x) - S(x)B(x)R^{-1}B^T(x)S(x) + Q = 0. \quad (5)$$

Основная проблема реализации управления вида (4) заключается в сложности нахождения матрицы $S(x)$, как решения уравнения (5) в темпе функционирования объекта.

Необходимые условия оптимальности

Оптимизация системы управления осуществляется соответствующей перестройкой, как параметров объекта, так и параметров регулятора. Этот класс нестационарных систем управления с оптимизацией относят к системам координатно-параметрического управления.

Функционал качества (3) зададим в виде функционала Больца в виде

$$J(x,u) = \Phi(x(T), T) + \int_{t_0}^T L(t, x, u) dt, \quad (6)$$

где

$$\Phi(x(T), T) = K(x(T), T) + \gamma^T \Psi(x(T), T). \quad (7)$$

Здесь $\Psi(x(T), T) = 0$ – заданная область краевых значений состояния системы, $\gamma \in R^q$ – вспомогательная переменная.

Для системы управления с объектом (2), при предположении об отсутствии параметрических возмущений, образуем гамильтониан

$$H(t, x, u, \lambda) = L(t, x, u) + \lambda^T(t) f(x, u), \quad (8)$$

где $\lambda(t)$ - вспомогательная переменная, являющаяся решением дифференциального уравнения

$$\left. \begin{aligned} \frac{d}{dt} \lambda(t) &= - \left\{ \frac{\partial H(t, x, u, \lambda)}{\partial x(t)} \right\} \\ \lambda(T) &= \left\{ \frac{\partial \Phi(x(T), T)}{\partial x(T)} \right\} \end{aligned} \right\} \quad (9)$$

Оптимальное управление отыскивается как:

- в случае, когда ограничения на управление не эффективны, т.е. оптимальное управление достигается внутри области допустимых управлений (не находится на границах замыкания заданного множества допустимых управлений U), то

$$\frac{\partial H(t, x, u, \lambda)}{\partial u(t)} = 0; \quad (10)$$

- в случае, когда ограничения на управление эффективны, т.е. оптимальное управление достигается на границах области допустимых управлений U , то

$$H(t, x^0, u^0, \lambda) = \min_{u(t) \in U} H(t, x^0, u, \lambda), \quad t \in [t_0, T]. \quad (11)$$

Таким образом, оптимальное управление выбирается из условия

$$u^0(t) = \arg \min_{u \in U} H(t, x^0, u, \lambda). \quad (12)$$

Следует отметить, что краевые условия на правом конце для переменной $\lambda(t)$ и поведение гамильтониана зависят от объекта, вида задаваемой области конечных значений состояния системы и задания (или не задания) времени переходного процесса.

Условия оптимальности, сформулированные в виде двухточечной краевой задачи (2), (9) и условий выбора управления (10), (11), являются необходимыми условиями минимума функционала (6).

Продифференцировав $H(t, x, u, \lambda)$ по времени, с учетом возможности перехода к открытой области управляющих воздействий, получим

$$\frac{d}{dt}H(t, x, u, \lambda) = \frac{\partial H}{\partial t} + \frac{\partial H}{\partial x} \frac{dx}{dt} + \frac{\partial H}{\partial \lambda} \frac{d\lambda}{dt} + \frac{\partial H}{\partial u} \frac{du}{dt}.$$

Учитывая, что дифференциальные уравнения (2) и (9) образуют каноническую форму, а также, что $\frac{\partial H}{\partial u} \frac{du}{dt} = 0$ (либо $\frac{\partial H}{\partial u} = 0$, либо $\frac{du}{dt} = 0$, либо

$\frac{\partial H}{\partial u}$ и $\frac{du}{dt}$ - ортогональны), последнее выражение можно переписать в виде

$$\frac{d}{dt}H(t, x, u, \lambda) = \frac{\partial H(t, x, u, \lambda)}{\partial t}. \quad (13)$$

Краевые условия для уравнения (13) задаются на правом конце и зависят от области конечных значений состояния системы управления.

Очевидно, что поведение гамильтониана при оптимальном управлении принимает вполне определенную траекторию, определяемую решением дифференциального уравнения с краевым условием на правом конце (за исключением стационарного случая, когда гамильтониан не зависит от времени). Это поведение положим в основу конструкции алгоритмов оптимизации системы управления.

Алгоритмы оптимизации

Пусть нестационарный управляемый объект описывается векторным дифференциальным уравнением вида

$$\left. \begin{aligned} \frac{d}{dt} x(t) &= f(x, u, \eta, \alpha) \\ x(t_0) &= x_0, \end{aligned} \right\} \quad (14)$$

здесь $x \in R^n$ - вектор состояния объекта, $u \in R^r$ - вектор управляющих воздействий, $\eta \in R^k$ - вектор возмущаемых параметров, $\alpha \in R^p$ - вектор параметров, выделенных для оптимизации функционирования объекта.

Запишем необходимые условия минимума функционала качества, выраженные в поведении гамильтониана на оптимальной траектории, в виде

$$\mathfrak{R}^0(t) = H^0(t) + \varphi(t) = 0, \quad (15)$$

здесь $\varphi(t)$ - поведение гамильтониана на оптимальной траектории.

Рассмотрим вначале случай, когда в (14) $p = k$ и с помощью параметров $\alpha(t)$ предполагается парировать соответствующие параметрические возмущения, т.е. предполагается, что возможно достижение следующего соотношения:

$$\alpha(t) = \eta(t). \quad (16)$$

При выполнении (16) уравнение объекта (14) будет иметь вид

$$\left. \begin{aligned} \frac{d}{dt} x(t) &= f(x, u) \\ x(t_0) &= x_0. \end{aligned} \right\} \quad (17)$$

Если функционал $J(x(\mathcal{U}), u(\mathcal{U}), t)$ гладкий, то оптимальное управление $u^0(t)$ при выполнении соотношения (16) для объекта (17) обеспечивает выполнение уравнения Гамильтона – Якоби. Это уравнение описывает поведение функционала $J(x(\mathcal{U}), u(\mathcal{U}))$ вдоль траектории $x(t)$ данной системы

$$\frac{\partial J(t, x^0)}{\partial t} = -H_{\dot{x}}(t, x^0(t), u^0(t)), \quad \frac{\partial J(t, x^0)}{\partial x^0(t)} = \lambda(t). \quad (18)$$

Для случая, когда, $\alpha(t) \neq \eta(t)$, управление $u(t) = u\left\{x(t), \frac{\partial J(t, x)}{\partial x(t)}\right\}$, уравнение Гамильтона – Якоби будет иметь вид

$$\frac{\partial J(t, x)}{\partial t} + \frac{\partial J(t, x)}{\partial \eta} \frac{d}{dt} \eta(t) + \frac{\partial J(t, x)}{\partial \alpha} \frac{d}{dt} \alpha(t) = -H\left[t, x(t), u\left\{x(t), \frac{\partial J(t, x)}{\partial x(t)}\right\}, \lambda(t)\right]. \quad (21)$$

Учитывая, что $u^0(t) = u\left\{x^0(t), \frac{\partial J(t, x^0)}{\partial x^0(t)}\right\}$ является H -минимальным управлением, т.е.

$$H\left[t, x^0(t), u\left\{x^0(t), \frac{\partial J(t, x^0)}{\partial x^0(t)}\right\}, \lambda(t)\right] \leq H\left[t, x(t), u\left\{x(t), \frac{\partial J(t, x)}{\partial x(t)}\right\}, \lambda(t)\right],$$

сравнивая левые части уравнений (20) и (21), получим следующее условие

$$\frac{\partial J(t, x)}{\partial \eta} \frac{d}{dt} \eta(t) + \frac{\partial J(t, x)}{\partial \alpha} \frac{d}{dt} \alpha(t) \geq 0, \quad (22)$$

$$\text{так как } \frac{\partial J(t, x^0)}{\partial t} = \frac{\partial J(t, x)}{\partial t}.$$

Назначим алгоритм, «парирующий» параметрические возмущения $\eta(t)$, в виде

$$\left. \begin{aligned} \frac{d}{dt} \alpha(t) &= -\frac{\partial J(t, x)}{\partial \alpha(t)}, \\ \alpha(t_0) &= \alpha_0. \end{aligned} \right\} \quad (23)$$

Используя неравенство (22), можно получить условие на максимально возможную скорость изменения возмущенных параметров, при которой алгоритм (23) обеспечит асимптотические свойства процессу параметрической оптимизации. Подставляя (23) в (22), получим

$$\frac{\partial J(t, x)}{\partial \eta(t)} \frac{d}{dt} \eta(t) \geq \frac{\partial J(t, x)}{\partial \alpha(t)} \frac{\partial J(t, x)}{\partial \alpha(t)}.$$

Откуда

$$\left| \frac{\nabla J(t,x)}{\nabla \eta(t)} \frac{d}{dt} \eta^*(t) \right| < \left\| \frac{\nabla J(t,x)}{\nabla \alpha(t)} \right\|^2, \quad t \in [t_0, T], \quad (24)$$

где $\frac{d}{dt} \eta^*(t)$ - наибольшая скорость изменения возмущающих параметров.

Вернемся к поведению гамильтониана на оптимальной траектории (15). Очевидно, что если $\alpha(t) \neq \eta(t)$, то равенство (15) выполняться не будет, т.е. $\mathfrak{R}(t) = H(t, x, u, \lambda) + \varphi(t) \neq 0$. Это обстоятельство положим в основу алгоритмов оптимизации. Введем в рассмотрение функцию Ляпунова

$$V(\eta(\cdot), \alpha(\cdot)) = \frac{1}{2} \{ \mathfrak{R}(t) - \mathfrak{R}^0(t) \}^2 = \frac{1}{2} \{ \mathfrak{R}(t) \}^2. \quad (25)$$

Тогда

$$\frac{d}{dt} V(\eta(\cdot), \alpha(\cdot)) = \mathfrak{R} \left\{ \frac{\partial H}{\partial \eta(t)} \frac{d}{dt} \eta(t) + \frac{\partial H}{\partial \alpha(t)} \frac{d}{dt} \alpha(t) \right\} \leq 0, \quad (26)$$

так как $\frac{\partial H}{\partial t} = \frac{\partial H^0}{\partial t}$, $\frac{\partial \varphi(t)}{\partial \eta(t)} = 0$ и $\frac{\partial \varphi(t)}{\partial \alpha(t)} = 0$.

Пусть алгоритм параметрической оптимизации имеет вид

$$\frac{d}{dt} \alpha(t) = - \frac{\nabla H(t, x, u, \lambda)}{\nabla \alpha(t)} \frac{1}{\mathfrak{R}} B(t), \quad (27)$$

$$\alpha(t_0) = \alpha_0.$$

тогда неравенство (26) примет вид

$$B(t) \frac{\nabla H(t, x, u, \lambda)}{\nabla \eta(t)} \frac{d}{dt} \eta(t) - B^2(t) \left\| \frac{\nabla H(t, x, u, \lambda)}{\nabla \alpha(t)} \right\|^2 \leq 0. \quad (28)$$

Из последнего неравенства следует, что параметрическая оптимизация будет успешной, если будет выполняться следующее неравенство:

$$B(t) \frac{\|H(t, x, u, \lambda)\|}{\|\eta(t)\|} \frac{d}{dt} \eta^*(t) - B^2(t) \left\| \frac{\|H(t, x, u, \lambda)\|}{\|\alpha(t)\|} \right\|^2 < 0,$$

здесь $\frac{d}{dt} \eta^*(t)$ – наибольшая скорость изменения возмущающих параметров.

Назначение алгоритма параметрической оптимизации в виде (27) позволит получить условие успешной параметрической оптимизации:

$$\left\| B(t) \frac{\|H(t, x, u, \lambda)\|}{\|\alpha(t)\|} \right\|^2 > \left| B(t) \frac{\|H(t, x, u, \lambda)\|}{\|\eta(t)\|} \frac{d}{dt} \eta^*(t) \right|, \quad t \in [t_0, T]. \quad (29)$$

Полученное условие (29) является необходимым условием успешного процесса параметрической оптимизации нестационарного объекта вида (14).

Заключение

В данной работе для синтеза субоптимального управления нелинейным объектом были сформулированы условия процесса оптимизации, обеспечивающие асимптотический перевод функционала качества из периферийных его значений в минимум. С помощью методов алгоритмического конструирования, были представлены и исследованы алгоритмы оптимизации нестационарных систем управления с квадратичным функционалом качества в условиях неполной априорной информации. В основу всех полученных алгоритмов положены уравнение Гамильтона-Якоби и принцип минимума Понтрягина. Полученные результаты позволяют находить решение уравнения Риккати с параметрами, зависящими от состояния, алгоритмическим методом. Практическое применение данного метода рассмотрено в работе [9].

Список литературы:

1. Алексеев В.М., Тихомиров В.М., Фомин С.В. Оптимальное управление. М.: Наука, 1979. 430 с.

2. Афанасьев В.Н., Колмановский В.Б., Носов В.Р. Математическая теория конструирования систем управления. М.: Высшая школа, 2003. 615 с.
3. Chang H., Astrofi F. Control of HIV Infection Dynamics by the Enhancement of the Immune System // Proc. 17th World Conf. IFAC, Seoul, Korea, July 6-11. P.12217-12222.
4. Perelson A.S. Dynamics of hiv infection of CD4+T cells // Math.Biosciences. 1993. Vol. 114. P. 81-125.
5. Zurakowski R., Teel A. A model predictive control based scheduling method for HIV therapy // Journal of Theoretical Biology. 2006. Vol. 238. P. 368-382.
6. Афанасьев В.Н. Аналитическое конструирование детерминированных конечномерных систем управления. МИЭМ М., 2003. 160 с.
7. Афанасьев В.Н. Алгоритмическое конструирование систем управления с неполной информацией. МИЭМ М., 2004. 148 с.
8. Афанасьев В.Н. Управление нелинейными неопределенными динамическими объектами. URSS M., 2015. 224 с.
9. Преснова А.П. Метод алгоритмического конструирования в задаче медикаментозного лечения ВИЧ // Качество. Инновации. Образование. 2016. № 5, с. 33-41.

SECTION 2.

BIOLOGY

ПОТЕНЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА НА КЛЕТКИ СПИННОГО МОЗГА

БАЛАШЕВИЧ Т.В.

БЕЛАРУСЬ, ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ НАН

Введение. Секреция и синтез плазминогена (Pg) в организме млекопитающих осуществляется не только печенью, но и отдельными субпопуляциями нейронов и микроглией. Исследования на культурах нервной ткани показали, что Pg обладает нейротрофическим действием [1, 2, 3]. Являясь нейротрофическим фактором, Pg контролирует выживаемость, рост, пролиферацию, дифференцировку, пластичность и регенерацию клеток-мишеней, их устойчивость к повреждающим внешним и внутренним воздействиям на протяжении всего биологического цикла развития [1, 2, 4, 5]. Он также участвует в процессах миграции клеток, нейритогенеза и канцерогенеза [6, 7, 8, 9].

Синтез Pg, активаторов Pg и их ингибиторов в нервной ткани делает возможным участие этого звена системы протеолиза в физиологических событиях, пластичности и тканевых перестройках, поскольку все компоненты этого каскада присутствуют локально. Доказано, что система белков «плазминоген–плазмин» играет решающую роль в становлении практически всех физиологических систем организма на стадии эмбрионального и раннего постнатального онтогенеза [10].

Исследования свойств компонентов данной протеолитической системы позволяют рассматривать их как полноценные биорегуляторы в системе общего контроля гомеостаза нервной ткани, поскольку они участвуют в реализации экстраклеточного протеолиза, обеспечивают перестройку

межклеточного матрикса, модификацию мембранных рецепторов, активацию предшественников факторов роста и других биологически активных молекул [11, 12]. Между тем, данные литературы о влиянии P_g на состояние клеток нервной ткани при изменении их метаболического статуса малочисленны и фрагментарны.

Несмотря на применение глицина (Gly) в нейрофармакологии и многочисленные исследования гиперполяризующей способности данного агента, мало изучено его влияние на функционально-метаболическое состояние клеток нервной ткани. Существуют даже сведения о нейродегенеративных эффектах глицина в высоких дозах [13, 14], однако механизмы запуска таких реакций до сих пор не расшифрованы. В связи с приведенными выше сведениями целесообразным представляется исследование влияния P_g на функциональную активность клеток первичных культур нервной ткани, а также динамики этой активности на фоне изменения метаболического статуса клеток глицином.

Цель работы – установить закономерности влияния плазминогена на основные характеристики функционально-метаболического состояния клеток нервной ткани на фоне действия глицина. Задачи исследования:

1. Оценить влияние плазминогена, глицина и их совместного воздействия на выживаемость и пролиферативную активность клеток нервной ткани млекопитающих.
2. Изучить влияние плазминогена на морфологические характеристики клеток нервной ткани на фоне действия глицина.
3. Установить динамику содержания нуклеиновых кислот и белка в клетках нервной ткани при влиянии плазминогена, глицина и их совместного воздействия.

Материалы. Очищенные образцы P_g, полученные из фракции β-глобулинов аффинной хроматографией на лизин-Сефарозе (НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РБ). Глицин был приобретен у фирмы

«Applichem» (Германия). NADH, пируват натрия, ЭТС, питательная среда DMEM, трипсин, PBS– «Sigma-Aldrich» (США), остальные реактивы – производства стран СНГ.

Методы исследования

Первичная культура спинного мозга крысы. Работа была выполнена на эксплантатах спинного мозга новорожденных крыс (возраст – 1–2 сут). Стерильно извлеченные эксплантаты спинного мозга подвергали механическому и энзиматическому (0,025% раствор трипсина) диспергированию. Клетки в трипсинизированных культурах сохраняют гистогенетические потенции и частные морфологические, гистохимические, иммунологические особенности, присущие исходному материалу перед эксплантацией, а также позволяют проводить более подробную оценку изменения состояния клеточных сом, отростков и субклеточных структур. Клеточную суспензию высевали в чашки Петри (диаметр дна 35 мм) со специальным покрытием в синтетическую питательную среду, содержащую 15% ЭТС, 25 мкг/мл гентамицина, 0.06% глюкозы. Плотность посева – 25 000 клеток/см² в 2 мл питательной среды. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37 °С со сменой среды каждые 3 суток. К 14 сут культивирования количество клеток возрастало в 4–6 раз, большинство клеток претерпевало дифференцировку, культура становилась гетерогенной. По истечении 14 сут питательную среду клеток заменяли на свежую, содержащую 0.5% ЭТС и изучаемые агенты. Поскольку предварительно в экспериментах с использованием постоянной клеточной линии было установлено, что максимальный по амплитуде ответ наблюдается при действии глицина в концентрациях 0.01; 0.1; 50.0 мМ, то в экспериментах по изучению совместного действия с P_g на первичных культурах использовали только эти концентрации аминокислоты.

До влияния, спустя 24 и 72 ч после введения изучаемых агентов в питательную среду культуры фотографировали в фиксированных зонах монослоя при помощи CCD камеры и изображения сохраняли для

последующей обработки. При проведении измерений цифровое фото спинного мозга обрабатывали в программе ImageJ. В программе ImageJ производили измерение длины сомы и отростков, площади ядра и клеточного тела, подсчет количества отростков и их ветвлений. Определяли количество живых клеток и выживаемость разных типов клеток. Субстанцию Ниссля нейронов микроскопически выявляли при витальном и фиксированном окрашивании. Проводили дифференцировку астроглии и олигоглии по ядрам [15, 16].

Определение пролиферативной активности и выживаемости клеток. Для определения количества клеток и их жизнеспособности 40 мкл суспензии клеток разводили в 2 раза 0.4%-ным раствором трипанового синего (способного избирательно накапливаться только в мертвых клетках) и инкубировали при 37 °С в течение 5 мин. Суспензию помещали в камеру гемоцитометра (камеру Горяева) и подсчитывали количество живых и мертвых клеток. Индекс пролиферации (ИП) рассчитывали как отношение конечной концентрации клеток к исходной (посевной) концентрации.

Дополнительно на фотографиях, полученных с прижизненной микроскопии фиксированных зон монослоя, путем подсчета определяли количество клеток, сохраняющих адгезивность и целостность мембраны (живые) через 24 и 72 ч после влияния, и вычисляли долю живых клеток (выживаемость) в % по сравнению с исходным количеством клеток (до влияния). Различия в параллельных пробах не превышали 10%.

Морфологическое исследование клеток. В настоящей работе проводилась прижизненная микроскопия отмеченных зон монослоя. Фотографировали одну и ту же зону клеток до экспозиции, спустя 24 и 72 ч после влияния изучаемых агентов, изображения сохраняли для последующей обработки. Данный вид исследования позволяет осуществлять наблюдение за поведением клеток, их взаимодействием, реакцией на внешние факторы в условиях, приближенным к естественным. Работу выполняли при помощи светового инвертированного фазово-контрастного микроскопа (OPTON,

Германия). Использовали увеличения объектива $\times 16$, $\times 40$. Аналоговое изображение переводили в цифровое при помощи цифровой камеры DC300 F (Leica, Германия). Морфометрические показатели клеток изучаемых культур, а также динамику их гибели и пролиферации определяли в программе ImageJ.

В работе применяли суправитальное и фиксированное окрашивание клеток. При витальном (0,025% метиленовый синий) [18] и фиксированном окрашивании (0,25% крезильный фиолетовый прочный) [20, 21] культуры спинного мозга определяли нервные элементы. В окрашивании клеток по методу Ниссля участвуют как ядерные структуры, так и вещества, находящиеся в цитоплазме нервных клеток, – тигроидные глыбки или вещество Ниссля. Основу этого высокоспецифического метода составляет способность выявлять с помощью основных красителей специфичный для нейронов нуклеопротеидный комплекс (тигроид), содержащийся в цитоплазме и дендритах, а также другие комплексы РНК и основных белков (ядрышко, хроматин ядра). В результате такого окрашивания на светлом фоне выявляются клетки сине-фиолетового цвета различных оттенков.

На препаратах, окрашенных крезильным фиолетовым, окуляр-микрометрическим методом проводили дифференцировку астроглии и олигоглии по ядрам [15, 16, 17]. Самые крупные округлые и светлые ядра принадлежат астроцитам, мелкие овальные с более интенсивной окраской – олигодендроглии. В ядрах астроцитов отмечается незначительное количество базохроматина, а ядрышки, количество которых чаще всего больше 2–3, имеют неправильную форму.

Количественное определение белка, ДНК и РНК. Содержание РНК, ДНК и белка определяли с помощью двухволновой спектрофотометрии по О. Warburg (1942 г.), описанной Ю. Б. Филипповичем [19]. Измерение содержания нуклеиновых кислот проводили в два этапа путем щелочного и кислотного гидролиза. Определение проводили строго нахолоду в

центрифужных пробирках. К осадку клеток прибавляли 1 мл 0.3 М раствора HClO_4 . Для полноты осаждения кислотонерастворимой фракции пробирки на 15 мин помещали в лед. Затем центрифугировали при 2000–3000 g 10–15 мин. Осадки дважды отмывали 0.2 М раствором HClO_4 . После последнего центрифугирования стенки пробирки тщательно подсушивали фильтровальной бумагой, чтобы избежать загрязнения осажденной фракции кислоторастворимым материалом, имеющимся в надосадочной жидкости. Осадки суспендировали в 0.5 мл воды, затем добавляли при комнатной температуре 0.5 мл 0.6 М раствора КОН. Через 1 ч инкубации при 37 °C пробирки переносили в лед для остановки гидролиза. В каждую пробирку добавляли по 2 мл 0.6 М раствора HClO_4 и оставляли на 15 мин во льду. Центрифугировали 10 мин при 2000–3000 g. Надосадочную жидкость сливали для определения содержания РНК.

Стенки пробирок тщательно подсушивали. К осадку добавляли 2 мл 0.5 М HClO_4 , слегка ресуспендировали и ставили для гидролиза на 20 мин в водяную баню при 80 °C, после чего в подготовленных таким образом пробах определяли содержание ДНК.

Измерение концентрации нуклеиновых кислот и клеточного белка в образцах проводили на спектрофотометре CARY-100 (Varian, Австралия) при длине волны 260/280 нм. Обсчет результатов осуществляли в приложении RNA/DNA к программному обеспечению CaryWinUV. Содержание нуклеиновых кислот и белка выражали в мкг/мл. Разброс значений в параллельных определениях не превышал 10%.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Все результаты представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение не менее трех независимых измерений, выполненных в триплетах. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи критерия Манна–Уитни для непараметрических выборок. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 и Origin 7.0.

Результаты и обсуждение

Выживаемость. Анализ выживаемости клеток культуры спинного мозга показал, что индивидуальное введение Pg в концентрациях 10^{-7} и 10^{-8} M в питательную среду обеспечивало увеличение выживаемости астроцитов и олигодендроцитов в 2–17 раз по отношению к контролю спустя 72 ч (рисунки 1, 2). Значительное (3-кратное) увеличение выживаемости нейронов отмечали при 72-часовой экспозиции клеток с зимогеном в концентрации 10^{-8} M, а при увеличении его концентрации на порядок (10^{-7} M) рост доли живых нейронов не превышал 31% (рисунок 3).

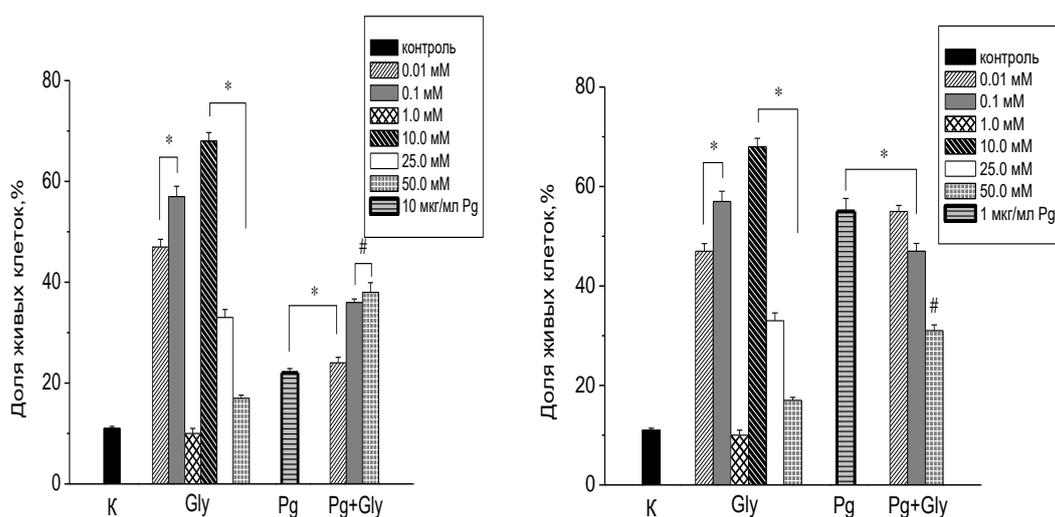


Рисунок 1. Доля живых астроцитов через 72 ч после добавления глицина и плазминогена

(левый график – концентрация плазминогена 10^{-7} M; правый график - 10^{-8} M). Здесь и далее: * отличия от контроля достоверны; # отличия от действия индивидуальных агентов, добавляемых в культуральную среду, и от контроля достоверны ($p < 0.05$)

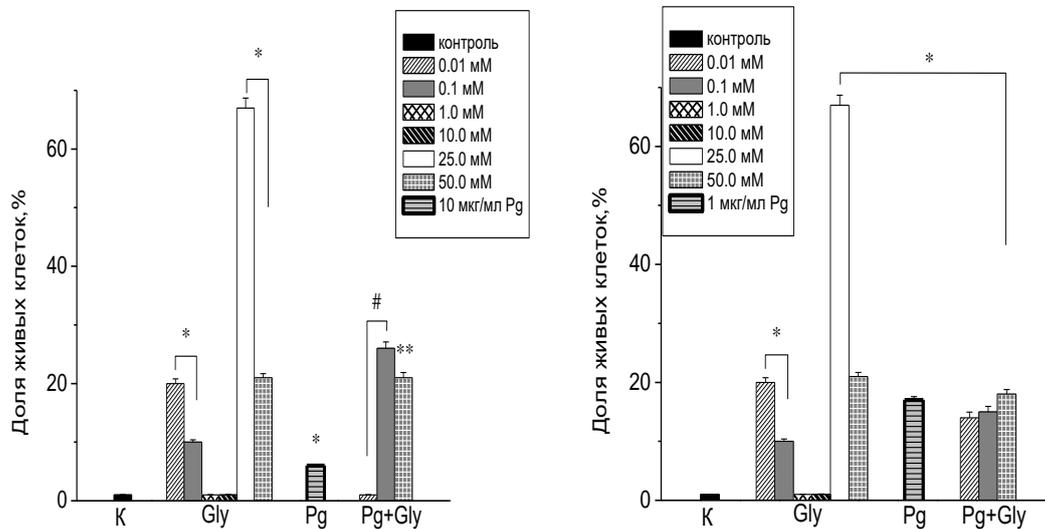


Рисунок 2. Доля живых олигодендроцитов через 72 ч после добавления глицина и плазминогена

Примечание – график слева – концентрация плазминогена 10⁻⁷ М; график справа - 10⁻⁸ М

При добавлении глицина в концентрациях 0.01 и 0.1 мМ в питательную среду первичной культуры спинного мозга крысы через 72 ч наблюдали статистически достоверное увеличение выживаемости нейронов, астроцитов и олигодендроцитов. Более высокие концентрации аминокислоты (25.0 и 50.0 мМ) обеспечивали значительное увеличение жизнеспособности только глиальных элементов спинного мозга. Важно отметить, что максимальная выживаемость (67±1.69%) олигодендроглиоцитов регистрировалась при добавлении глицина в концентрации 25.0 мМ (рисунок 2), в то время как на нейроны наилучший эффект глицин оказывал (83±4.05%) в концентрации 0.1 мМ (рисунок 3).

Эффект Pg на жизнеспособность клеток спинного мозга существенно изменялся на фоне действия глицина. Так, при одновременном добавлении в культуральную среду Pg (10⁻⁷ М) и аминокислоты в концентрации 50.0 мМ наблюдали полный коагонизм действия изучаемых агентов в отношении выживаемости нейронов, астро- и олигодендроглии (рисунок 3), когда

суммарный эффект в 2–5 раз превышал индивидуальный эффект каждого агента.

Следует отметить, что при всех сочетаниях глицина с зимогеном в концентрации 10^{-7} или 10^{-8} М в исследовании наблюдалось четкое сохранение жизнеспособности клеток первичной культуры. При совместном введении Pg (10^{-7} М) с концентрацией аминокислоты 0.1 или 0.01 мМ выживаемость нейронов (рисунок 3) достигала значения 71 ± 3.48 или $64 \pm 2.51\%$.

Совместное влияние Pg (10^{-8} М) с глицином в концентрации 0.01 или 0.1 мМ содействовало получению самой высокой выживаемости нейронов по сравнению с остальными влияниями в данном исследовании за счет эффекта потенцирования. При этих двух вариантах доля выживших нейронов 3-кратно превышала контрольные значения (рисунок 3), а количество выживших астроцитов – 4–5-кратно (рисунок 1).

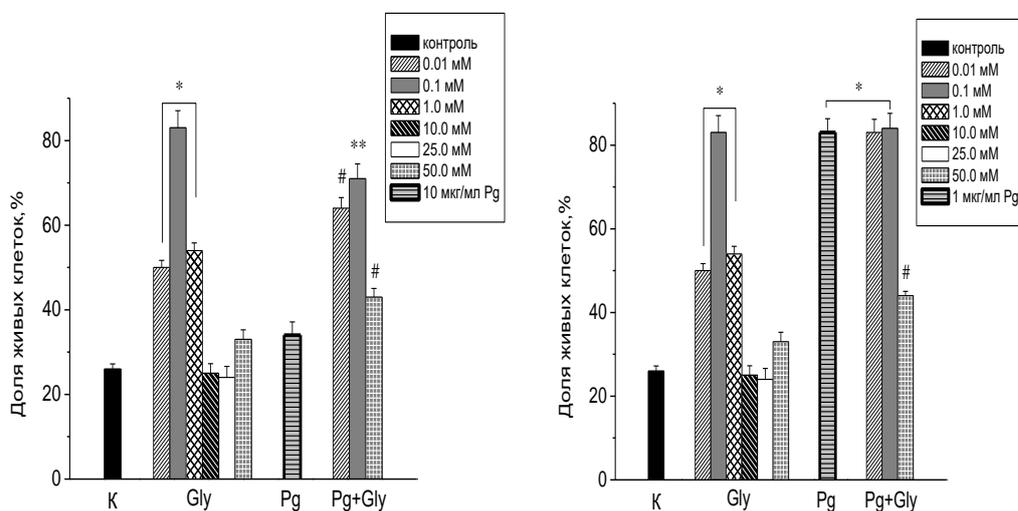


Рисунок 3. Доля живых нейронов через 72 ч после добавления глицина и плазминогена

Примечание – график слева – концентрация плазминогена 10^{-7} М; график справа - 10^{-8} М

Из выше сказанного можно заключить, что добавление в питательную среду Pg в концентрациях 10^{-7} , 10^{-8} M и глицина в диапазоне концентраций 0.01–50.0 mM обеспечивает сохранение выживаемости клеток глиального и нейронального происхождения, как при индивидуальном, так и при их комбинированном воздействии. Следует отметить, что совместное влияние зачастую носит более выраженный положительный эффект на жизнеспособность клеток обозначенных культур за счет эффекта потенцирования.

Пролиферация. Частное введение Pg в высокой концентрации или его совместные влияния не вызвали значительных изменений в количестве клеток или ИП первичной культуры нервной ткани (таблица 1).

Таблица 1 – Изменения общего количества клеток культуры спинного мозга крысы через 72 ч после добавления глицина и плазминогена

Условия эксперимента	Общее количество клеток через 72 ч после добавления
<i>Контроль</i>	500 000 _± 22 000
+ 0.01 мМGly	531 500 _± 48 821
+ 0.1 мМGly	570 000 _± 28 411*
+ 1.0 мМGly	500 000 _± 23 100
+ 10.0 мМGly	511 000 _± 56 210
+ 25.0 мМGly	500 000 _± 21 490
+ 50.0 мМGly	500 000 _± 19 675
+ 10^{-7} M Pg	525 000 _± 46 200
+ 10^{-7} M Pg + 0.01 мМGly	545 000 _± 50 690
+ 10^{-7} M Pg + 0.1 мМGly	530 000 _± 46 110
+ 10^{-7} M Pg + 50.0 мМGly	555 000 _± 43 845
+ 10^{-8} M Pg	735 000 _± 24 255*
+ 10^{-8} M Pg + 0.01 мМGly	650 000 _± 30 550*
+ 10^{-8} M Pg + 0.1 мМGly	695 000 _± 29 885*
+ 10^{-8} M Pg + 50.0 мМGly	530 000 _± 48 037

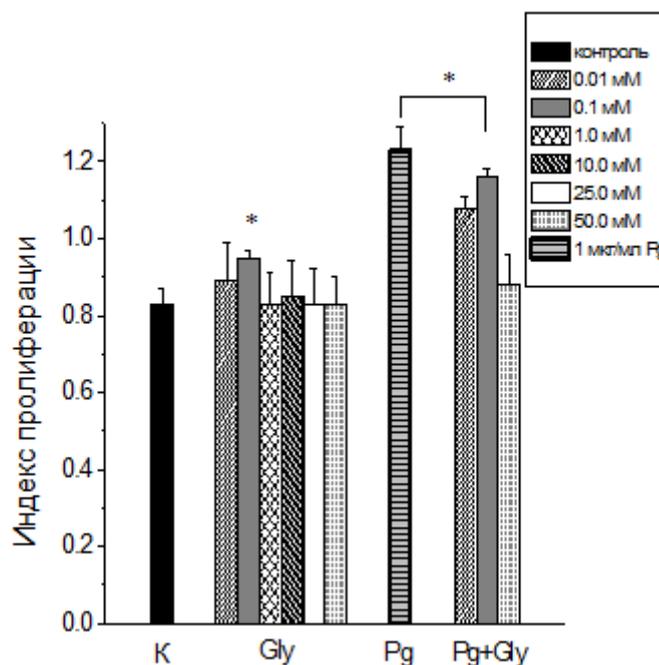


Рисунок 4. Индекс пролиферации клеток культуры спинного мозга через 72 ч после добавления глицина и плазминогена 10^{-8} М

Что касается глицина, то он достоверно увеличивал общее количество клеток спинного мозга (на 14% относительно контроля) только в концентрации 0.1 мМ. При микроскопическом анализе поведения различных типов клеток первичной культуры под действием изучаемых концентраций медиатора было обнаружено, что низкие концентрации глицина оказывают стимулирующее влияние на деление нейронов. Данная способность медиатора может иметь огромное значение с точки зрения изучения первичных культур нервной ткани в питательной среде, дефицитной по белкам сыворотки крови. Обычно проблема поддержания жизнеспособности нейрональных клеточных элементов в первичных культурах стоит на первом месте, так как питательной среды даже с 10–45% сыворотки зачастую недостаточно для поддержания выживаемости нейронов в течение нескольких недель, не говоря уже о пролиферации этих клеток [17]. Поэтому в питательную среду дополнительно добавляют ряд

факторов, обеспечивающих рост и развитие нейрональных элементов (например гормоны, витамины, нейроростовой фактор) [17].

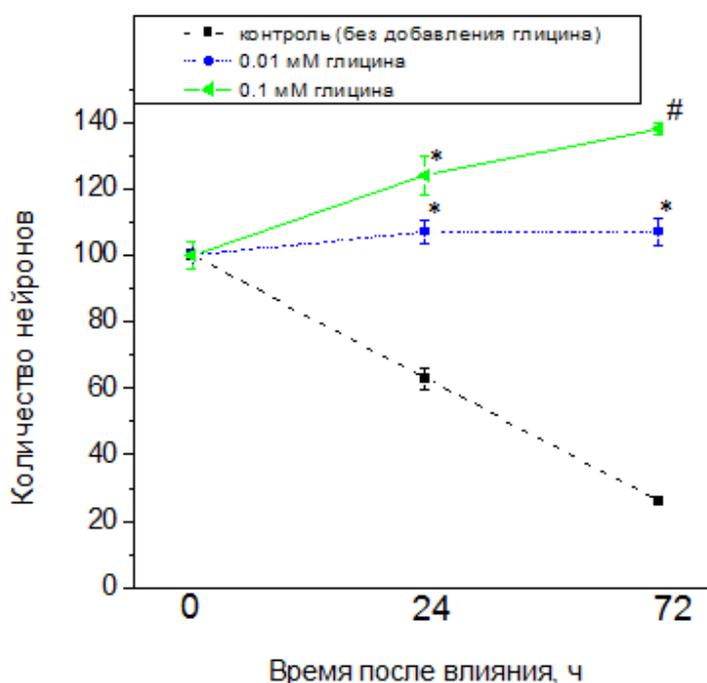


Рисунок 5. Влияние добавления глицина на количество нейронов в первичной культуре спинного мозга (n = 15)

Из данных рисунка 5 видно, что деление нейронов 14-суточной первичной культуры спинного мозга возможно на питательной среде с дефицитом по белкам сыворотки крови только в присутствии глицина. Через 24–72 ч после влияния методом световой микроскопии регистрировали появление юных нейронов с короткими отростками, большими ядрами и четкими ядрышками. Данный тип клеток при витальном и фиксированном окрашивании демонстрировал наличие субстанции Ниссля, которая является характерным признаком нейрональных клеток. В контроле в условиях дефицита белков сыворотки крови клеточная пролиферация отсутствовала.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что P_g оказывает митогенное действие на изучаемые культуры нервной ткани, а иногда обеспечивает его в присутствии другого метаболита (глицина). Тем не менее, конечный результат совместного влияния зимогена на культуру зависит главным образом от метаболического и функционального состояний клеток, которые способны изменяться в присутствии глицина. Это подтверждает тезис о зависимости эффекта плазминогена (как и других субстанций) от состояния клеток нервной ткани.

Морфологические особенности. В первичной культуре спинного мозга крысы депривация сыворотки в контроле заметно сказывалась уже на вторые сутки культивирования в дефицитной по белкам сыворотки крови среде, когда клеточная гибель достигала 44%. Следует отметить, что клеточная гибель, которая зачастую носила апоптический механизм, в первую очередь затрагивала олигодендроглию спинного мозга. По данным литературы этот вид нейроглии характеризуется высокой чувствительностью к негативным факторам окружающей среды, например к гипоксии [22, 23], и наиболее быстрым протеканием клеточного цикла [24], а депривация сыворотки в культуре клеток вызывает фрагментацию ДНК, которая является типичной для апоптической гибели клеток. Поэтому, не удивительно, что к окончанию третьих суток в контроле (рисунок 6, таблица 2 в Приложении) в условиях депривации сыворотки в культуре практически не оставалось олигодендроцитов, не принявших шарообразную форму. Более устойчивыми к данным негативным условиям оказались нейроны и астроциты, однако их выживаемость через 72 ч в среде дефицитной по белкам сыворотки крови составляла в контроле не более 11–26%, а начавшаяся дифференцировка клеточных элементов иногда завершалась преждевременной их гибелью (рисунок 6).

Плазминоген в концентрации 10^{-7} М при индивидуальном воздействии не оказал заметного влияния на жизнеспособность клеток культуры спинного мозга, а при одновременном воздействии с низкими концентрациями (0.01 или 0.1 мМ) аминокислоты увеличивал жизнеспособность и поддерживал

дифференцировку клеток данной культуры (рисунок 6, таблица 2 в Приложении).

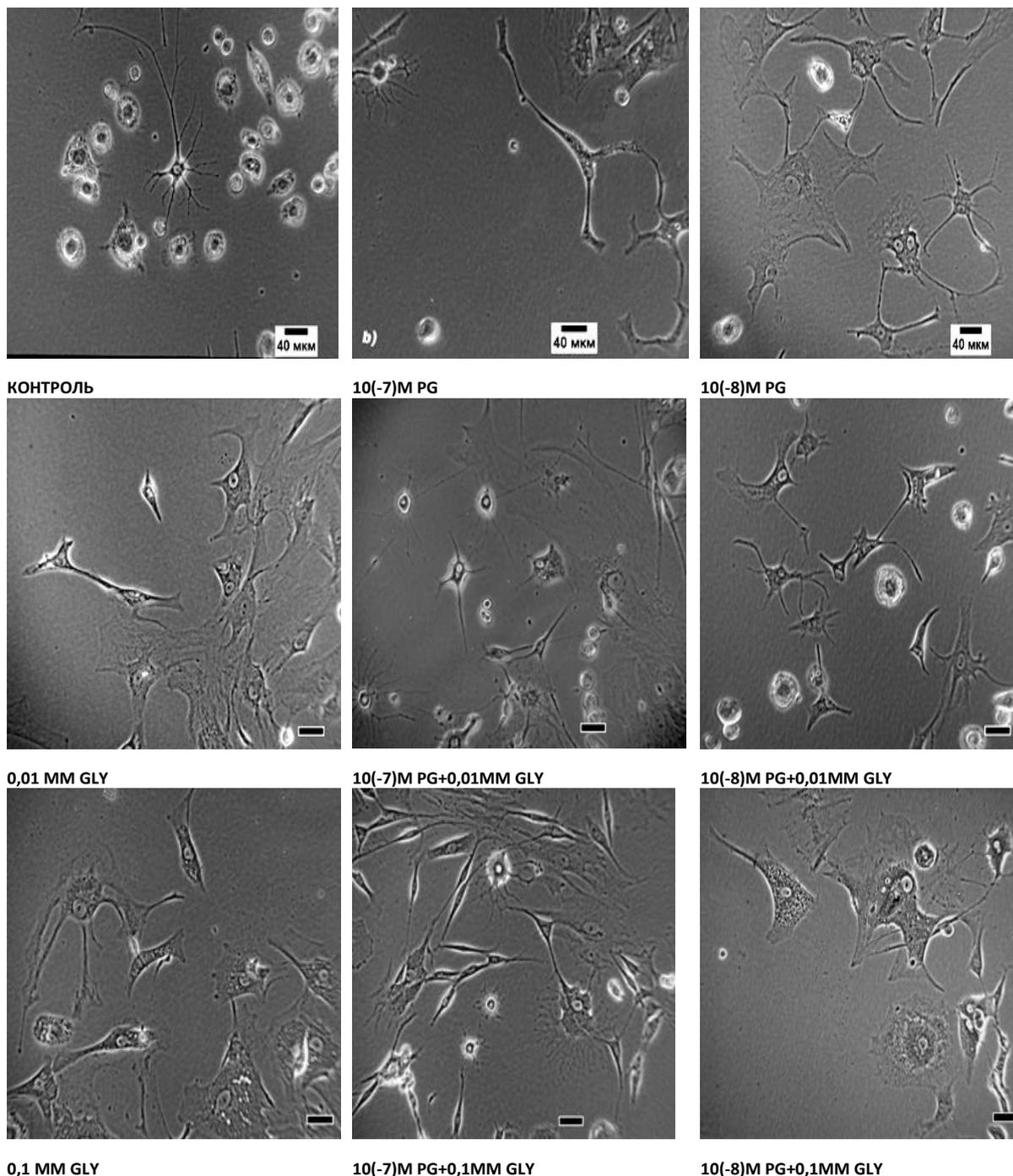


Рисунок 6. Влияние глицина и плазминогена на состояние диссоциированной культуры клеток спинного мозга через 72 ч при росте в дефицитной по белкам сыворотки крови среде

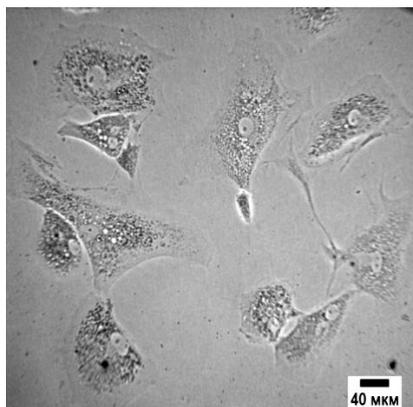
Примечание – контроль (0.5% сыворотки в питательной среде). Масштабная линейка – 40 мкм

Введение в культуральную среду глицина в концентрации 0.01 или 0.1 мМ, или плазминогена (10^{-8} М), или одновременно их обоим замедляло развитие дегенеративных изменений в клеточном пласте в 3–5 раз (рисунок 6). В культуре отмечали активное протекание дифференцировки клеточных элементов (особенно нейронов и астроцитов), заключающееся в увеличении количества отростков, их ветвлений, образовании межклеточных контактов (таблица 2 в Приложении). Увеличение площади клеточной сомы и ядра сменялось на элонгацию отростков, их арборизацию (преимущественно дихотомическую и древовидную), увеличение плотности цитоплазмы в перинуклеарной зоне и уменьшение площади клеточного тела.

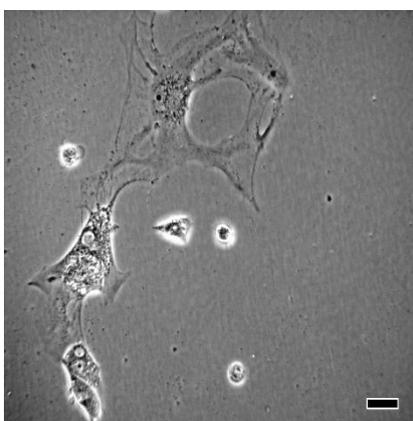
В контроле нервные клетки в условиях истощения биологически активной субстанции гибли на 74–89% на 3 сут, а клеточная пролиферация отсутствовала.

В результате прижизненной микроскопии и анализа пролиферативной активности клеток было показано, что глицин в концентрации 0.1 мМ в условиях депривации сыворотки достоверно вызывал деление нейронов первичной культуры спинного мозга. Через 24–72 ч после влияния регистрировали появление юных нейронов с короткими отростками (нейробласты), большим светлым ядром и четкими круглыми (чаще одним) ядрышками (рисунок 7). Данный тип клеток при витальном окрашивании метиленовым синим и фиксированном окрашивании крезильным фиолетовым прочным (рисунок 8) демонстрировал наличие субстанции Ниссля, которая является характерным признаком нейрональных клеток. Дальнейшее исследование уровня нуклеиновых кислот в клетках спинного мозга показало, что в концентрации 0.1 М Gly вызывал увеличение содержания ДНК в данных клетках.

а



б



в

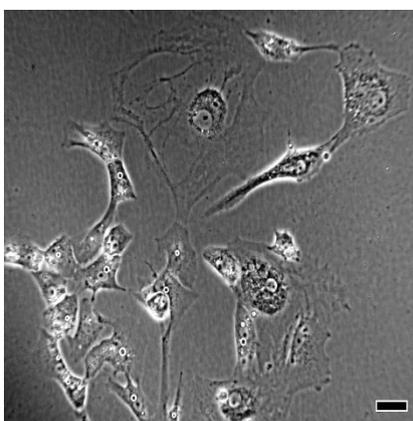


Рисунок 7. Влияние глицина в концентрации 0.1 мМ на состояние диссоциированной культуры клеток спинного мозга при росте в дефицитной по белкам сыворотки крови среде

Примечание – а – контроль (0.5% сыворотки в питательной среде); б – через 24 ч после внесения глицина; в – через 72 ч после внесения глицина. Фазовый контраст (увеличение объектива 16х). Масштабная линейка – 40 мкм

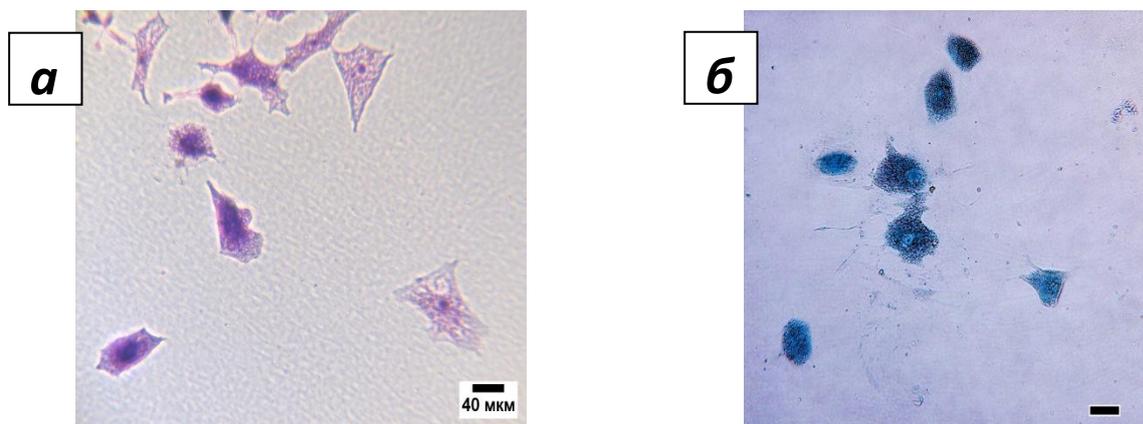


Рисунок 8. Окраска на выявление субстанции Нисслядиссоциированной культуры клеток спинного мозга

Примечание – а – окраска крезильовым фиолетовым прочным; б – окраска метиленовым синим. Фазовый контраст (увеличение объектива 16х). Масштабная линейка – 40 мкм

Анализ содержания ДНК, РНК, белка. Изучение динамики клеточной пролиферации, выживаемости и активности гликолитического фермента ЛДГ, показало, что в первичной культуре спинного мозга крысы первые существенные изменения данных функционально-метаболических показателей регистрируются только после 72-часового влияния изучаемых агентов, поэтому содержание биополимеров в клетках данной культуры определяли после 72-часовой экспозиции.

Добавление P_g в концентрации 10^{-8} М вызывало сильное (на 82%) увеличение количества внутриклеточного белка в клетках первичной культуры (рисунок 9), в то время как в более высокой концентрации зимогена (10^{-7} М) изменение было незначительным. Подобный характер изменений регистрировали при изучении содержания нуклеиновых кислот, где значения ДНК и РНК достоверно превышали контрольные (на 92 и 40%, соответственно) только при концентрации P_g 10^{-8} М (рисунок 9). Данные согласуются с изменениями количества клеток изучаемой культуры после 72-часового влияния P_g, при которых статистически значимое увеличение пролиферации наблюдали только при концентрации зимогена 10^{-8} М.

Анализ динамики внутриклеточного содержания биополимеров под действием глицина выявил значительное увеличение количества общего белка в клетках культуры спинного мозга при добавлении аминокислоты в диапазоне концентраций 0.01–1.0 мМ (рисунок 9). Максимальная концентрация Gly (50.0 мМ) напротив вызывала достоверное понижение уровня белка в клетках.

Во всем диапазоне концентраций изучаемой аминокислоты регистрировали увеличение содержания нуклеиновых кислот. При этом статистически значимое увеличение уровня ДНК отмечали при концентрации Gly 0.1 мМ, а уровня РНК – при концентрациях 1.0 и 10.0 мМ (рисунок 9). Существенное увеличение содержания ДНК в клетках спинного мозга крысы при добавлении Gly в концентрации 0.1 мМ очередной раз подтверждает митогенный эффект изучаемого метаболита в условиях культуры.

Несмотря на то, что индивидуальное введение зимогена в концентрации 10^{-7} М не вызывало существенных изменений в уровне биополимеров, его совместное введение с аминокислотой в большинстве случаев приводило к эффекту потенцирования. Так на фоне действия Gly в концентрациях 0.01 и 0.1 мМ данный зимоген значительно увеличивал количество общего белка, а на фоне Gly в концентрациях 0.1 и 50.0 мМ – количество РНК (рисунок 9).

Таким образом, при одновременном введении в питательную среду с Pg (в концентрации 10^{-7} М) глицин оказывал благоприятное воздействие на жизнедеятельность клеток культуры спинного мозга, что проявлялось в увеличении содержания в них ДНК и общего белка,

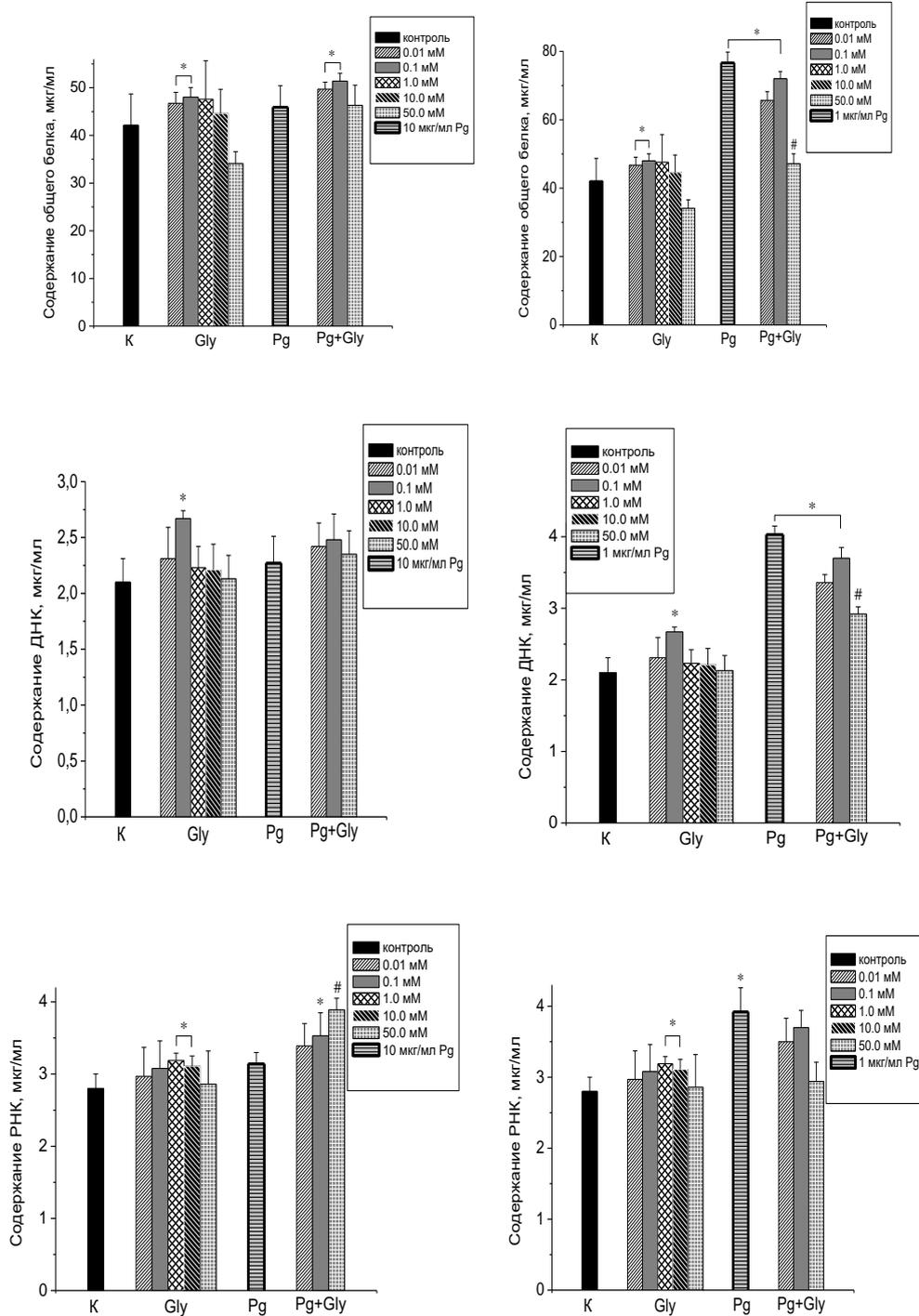


Рисунок 9. Содержание белка, ДНК и РНК в клетках спинного мозга через 72 ч после добавления глицина и плазминогена (графики слева – концентрация плазминогена 10^{-7} М; графики справа - 10^{-8} М)

увеличении выживаемости и их пролиферативной активности. При совместном введении с нейротрофическим фактором в концентрации 10^{-8} М (рисунок 9) глицин напротив снижал содержание биополимеров в клетках спинного мозга.

Заключение. 1. Установлено влияние плазминогена, глицина и их совместного воздействия на выживаемость, пролиферативную активность клеток, содержание ДНК, РНК и белков в клетках первичной культуры спинного мозга. 2. Изучено влияние плазминогена на морфологические характеристики клеток нервной ткани на фоне действия глицина. Установлено увеличение жизнеспособности, пролиферативной активности и дифференцировки, адгезионной способности клеточных элементов спинного мозга крыс при комбинированном воздействии глицина и плазминогена. 3. Выявлено потенцирующее влияние плазминогена на действие глицина по отношению к глиальным и нейрональным клеткам культуры спинного мозга крыс.

Таблица 2 – Морфологические изменения клеток спинного мозга под действием изучаемых агентов через 72 ч

Условия эксперимента	Тип клеток		
	астроциты	нейроны	олигодендроциты
1	2	3	4
<i>Контроль</i>	Началась дегенерация клеток; потеря клеточной адгезии и большинства отростков; редко – вакуолизация цитоплазмы.	Началась дегенерация клеток; утрата отростков 4–6 порядка; площадь (S) и длина (l) сом уменьшились (\downarrow) на 42%.	Гибель большинства клеток; утрата отростков; низкая адгезия клеток.
+ 0.01 mM Gly	Рост и дифференцировка клеток: увеличилась (\uparrow) S и l сом и отростков, плотность (ρ) цитоплазмы \uparrow , число отростков \uparrow на 47%; иногда – арборизация отростков.	Рост клеток; $\uparrow S$ сом (на 10%), S ядер (на 35%), l отростков (в 2 раза); число отростков – до 5; появление юных форм нейронов.	Выживаемость сохранялась у 20% клеток; короткие славетвистые отростки.
+ 0.1 mM Gly	Высокая выживаемость клеток (4-кратно превышала контроль); рост и дифференцировка клеток (l отростков \uparrow на 84%); иногда – арборизация отростков.	Рост клеток; $\uparrow S$ сом (на 38–63%), S ядер (на 20%), l отростков (в 2–4 раза); появление юных нейронов. При витальном и фиксированном окрашивании юных клеток – субстанция Ниссля.	Выживаемость сохранялась у 10% клеток; короткие славетвистые отростки.
+ 1.0 mM Gly	Адгезия клеток к пластику и способность к формированию отростков \downarrow ; l отростков и S сом \downarrow на 27%.	Дифференцировка клеток; $\uparrow S$ сом и ядер несущественно \downarrow , ρ цитоплазмы \uparrow ; l отростков \uparrow на 20–43%; число отростков \downarrow до 2–3; арборизация отростков преимущественно – дихотомическая.	Утрата отростков; низкая клеточная адгезия.

1	2	3	4
+ 10.0 mM Gly	Высокая выживаемость клеток (5-кратно превышала контроль); рост и дифференцировка клеток (<i>l</i> отростков ↑ на 115%); иногда – арборизация отростков.	Дифференцировка клеток; число отростков ↓ до 2–3, а их <i>l</i> ↑ на 65%; арборизация отростков – дихотомическая.	Утрата отростков; низкая клеточная адгезия.
+ 25.0 mM Gly	Рост и дифференцировка клеток (<i>l</i> отростков ↑ на 41%).	Дифференцировка клеток останавливается дегенеративными процессами; <i>S</i> , <i>l</i> сом и отростков ↓ на 35–47%.	Выживаемость клеток в 67 раз выше контроля; арборизация отростков; иногда – отростки 4 порядка.
+ 50.0 mM Gly	Дифференцировка слабо выражена (число отростком, их <i>l</i> ↑ на 15%); иногда – утрата ветвистости.	Дегенерация клеток; утрата большинства отростков; <i>S</i> сом и ядер ↓ в 3 раза.	Выживаемость клеток в 21 раз выше контроля; арборизация отростков.
+ 10 ⁻⁷ M Pg	Дифференцировка клеток; иногда – арборизация отростков.	Дифференцировка клеток останавливается дегенеративными процессами; <i>S</i> сом и ядер ↓ на 38%; <i>p</i> цитоплазмы ↑; <i>l</i> отростков ↓ на 23%; число отростков ↓ до 2–3; арборизация (чаще дихотомическая) отростков сохранилась.	Выживаемость клеток в 6 раз выше контроля; частично сохранена арборизация отростков.
+ 10 ⁻⁷ M Pg + 0.01 mM Gly	Рост и дифференцировка клеток (<i>l</i> отростков ↑ на 46%); образование новых межклеточных контактов; иногда – арборизация отростков.	Дифференцировка клеток; <i>l</i> сом незначительно ↓; <i>l</i> отростков ↑ на 46%; арборизация отростков – дихотомическая и древовидная.	Утрата отростков; низкая клеточная адгезия.

1	2	3	4
+ 10 ⁻⁷ M Pg + 0.1 mM Gly	Рост и дифференцировка клеток (<i>l</i> отростков ↑ на 55%); образование новых межклеточных контактов; иногда – арборизация отростков.	Дифференцировка клеток; <i>S</i> сом незначительно ↓; <i>l</i> отростков ↑ на 53%; арборизация отростков – дихотомическая и древовидная.	Выживаемость клеток в 26 раз выше контроля; арборизация отростков; иногда – отростки 3–4 порядка.
+ 10 ⁻⁸ M Pg	Высокая выживаемость астроглии (4-кратно превышала контроль); рост и дифференцировка клеток (<i>l</i> отростков ↑ на 91%); образование новых межклеточных контактов; иногда – арборизация отростков.	Дифференцировка клеток; <i>S</i> и <i>l</i> сом ↓ на 36%; <i>l</i> отростков ↑ на 80%; арборизация отростков дихотомическая и древовидная; образование новых межклеточных контактов.	Выживаемость клеток в 17 раз выше контроля; клетки дифференцированы; отростки ветвистые.
+ 10 ⁻⁸ M Pg + 0.01 mM Gly	Высокая выживаемость астроглии (4-кратно превышала контроль); рост и дифференцировка клеток (<i>l</i> отростков ↑ на 102%); образование новых межклеточных контактов; иногда – арборизация отростков.	Дифференцировка клеток; <i>S</i> и <i>l</i> сом ↓ на 42%; <i>l</i> отростков ↑ на 76%; арборизация отростков древовидная; образование новых межклеточных контактов.	Выживаемость клеток в 14 раз выше контроля; клетки дифференцированы; иногда – отростки 3 порядка.
+ 10 ⁻⁸ M Pg + 0.1 mM Gly	Рост и дифференцировка клеток (<i>l</i> отростков ↑ на 98%); образование новых межклеточных контактов; иногда – арборизация отростков.	Дифференцировка клеток; <i>S</i> и <i>l</i> сом ↓ на 38%; <i>l</i> отростков ↑ на 83%; арборизация отростков чаще древовидная; образование новых межклеточных контактов.	Выживаемость клеток в 15 раз превышала контроль; клетки дифференцированы; выявлены отростки 2–4 порядка.

Список литературы:

1. Никандров В.Н. [и др.] // *Materials, methods and technology J. Scientific articles.* – 2007. – P. 48–66.
2. Nagata K. [et al.] // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 1993. – Vol. 75, № 1. – P. 31–37.
3. Nakajima K. [et al.] // *Eur. Neurol.* – 1994. – Vol. 34 (suppl. 3). – P. 10–16.
4. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. // *Новости биомед. наук.* – 2003. – № 3. – С. 75–89.
5. Nakajima K. [et al.] // *J. Neurochem.* – 1996. – Vol. 66, № 6. – P. 2500–2505.
6. Bell W.R. // *Semin. Thromb. Hemostasis.* – 1996. – Vol. 22, № 6. – P. 459–478.
7. Duffy M.J. // *Blood Coagul. Fibrinolysis* – 1990. – Vol. 1, № 6. – P. 681–687.
8. Kalderon N. // *Serine Proteases and Their Serpin Inhibitors in the Nervous System:* Plenum Press, 1990; ed.: B.W. Festoff [et al.]. – New York, 1990. – P. 209–217.
9. Magata N. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 11. – P. 7717–21.
10. Friedman G.C., Seeds N.W. // *J. Comp. Neurol.* – 1995. – Vol. 360, № 4. – P. 658–670.
11. Rifkin D.B. [et al.] // *Cell. Differ. Dev.* – 1990. – Vol. 32, № 3. – P. 313–18.
12. Wang N. [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2004. – Vol. 21, №5. – P. 785–96.
13. Barth A. [et al.] // *Exp Brain Res.* 2005 Mar; 161(3) – P. 351–7.
14. McNamara D1, Dingledine R. // *J Neurosci.* 1990 Dec; 10(12) . – P. 3970–6.
15. Глиоархитектоника коры большого мозга. Цитоархитектоника коры большого мозга человека / П.Е. Снесарев [и др.]; под общ. ред. С.А. Саркисова. – М.: Медгиз, 1949. – С.138–154.
16. Оржеховская Н.С. // *Неврол. вестн.* – 2008. – Т. 40 (Вып. 3). – С. 65–7.
17. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В.Н. Вепринцев [и др.]; под общ. ред. В.Н. Вепринцева. – М.: Наука, 1976. – С. 30–139.
18. Волкова О.В. [и др.] *Основы гистологии с гистологической техникой.* 2-е издание / под ред. Л.С. Сутулова. – М.: Медицина. – 1982. – С. 251–4.
19. Филиппович Ю.Б. [и др.] *Практикум по общей биохимии* / под общ. ред. Ю.Б. Филипповича. – М.: Просвещение, – 1982, – С. 182–4.
20. Adams, J.H. [et al.] // *Brain.* – 2000. – Vol. 123 (Pt 7). – P. 1327–38.
21. Sriram K. [et al.] // *J. Neurosci.* – 1998. – Vol. 18, № 24. – P. 10287–96.
22. Korey S.R., Orchen H. // *J. Neurochem.* – 1959. – Vol. 3, № 3. – P. 277–85.
23. Pope A. [et al.] // *Prog. Neurobiol.* – 1957. –Vol. 2. – P. 182–91.
24. Nagamatsu S. [et al.] // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 319 (Pt 2). – P. 477–82.

ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ НА РАЗЛИЧНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТАХ

Косян Д.Б.

Россия, ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЯСНОГО
СКОТОВОДСТВА

Аннотация. Активное развитие исследований в области наноматериалов оставляет открытым вопрос об их безопасности. Оценка безопасности наноструктур для объектов окружающей среды и здоровья человека становится первостепенной задачей токсикологии. Немаловажным является поиск адекватных тест-организмов, позволяющих получать достоверные результаты. Исходя из этого, целью данного исследования является сравнительная оценка действия наночастиц (на примере наночастиц серебра) на различных модельных объектах. В качестве модели прокариотической клетки была выбрана генно-инженерный люминесцирующий штамм *Escherichia coli* K12 TG1 pF1, содержащий плазмиду pF1 с кассетой *luxCDABE*-генов *Vibrio fischeri* МГУ-6. В качестве эукариотической клетки - культуру клеток пресноводной инфузории *S. mytilus* (дикий штамм) в фазе экспоненциального роста. В роли модельного токсиканта был использован нанопрепарат серебра (НЧ Ag). Исследования действия НЧ Ag на модели прокариотической клетки (*Escherichia coli* K12 TG1 pF1) показали полное подавление свечения в диапазоне концентраций до 0,025 М через 10 минут. Результаты исследований воздействия НЧ Ag на эукариотические клетки простейших показали, подобный эффект также через 10 минут инкубации тест-объекта с токсикантом, однако при концентрации 0,00625 М. Полученные данные показывают достаточно высокую чувствительность обоих модельных организмов к действию токсиканта, в концентрационном отношении клетки *Stylonychia mytilus* были более показательны.

Ключевые слова: наночастицы серебра, *Stylonychia mytilus*, биолюминесценция, *Escherichia coli*, токсичность.

Abstract. The active development of research in the field of nanomaterials, it leaves open the question of their security. Safety evaluation of nanostructures for environmental objects and human health as the primary objective of toxicology. Also important is the search for an adequate test organisms, allowing to obtain reliable results. On this basis, the aim of this study is the comparative evaluation of the effects of nanoparticles (for example silver nanoparticles) in different model objects. As a model prokaryotic cells were selected with genetically engineered luminescent strain *Escherichia coli* K12 TG1 pF1, pF1 containing a plasmid with the cassette luxCDABE genes of *Vibrio fischeri* MSU-6. As eukaryotic cell - culture cells of freshwater ciliate *S. mytilus* (wild strain) in the exponential phase of growth. In the role of a model toxicant was used nanopreparations of silver (Ag LF). Studies on the action of NCH Ag on the model of a prokaryotic cell (*Escherichia coli* K12 TG1 pF1) showed complete suppression of luminescence in the range of concentrations up to 0.025 M in 10 minutes. The results of researches of influence of NCH Ag on the eukaryotic cells of protozoa showed a similar effect also after 10 minutes of incubation the test object with the toxicant, but at concentrations 0,00625 M. the data Obtained show a high sensitivity of both model organisms to the action of the toxicant in a concentration with respect to cells of *Stylonychia mytilus* was more revealing

Key words: nanoparticles Ag, *Stylonychia mytilus*, bioluminescence, *Escherichia coli*, toxicity

Масштабное увеличение производства наноматериалов способствовало активному развитию исследований в области токсикологии, поскольку остается открытым вопрос о безопасности продуктов наноиндустрии. Благодаря своим свойствам, наноматериалы быстрее образуют различные комплексы в ходе ряда превращений, при этом появляются новые свойства [1].

Особое внимание необходимо уделить оценке биологического действия наноматериалов, поскольку их воздействие на живые организмы, характеризуется высокой химической и каталитической активностью поверхности наночастиц, которая отсутствует у данного вещества с более крупной дисперсностью [2]. Для абсолютного большинства наноматериалов не известны механизмы поступления в организм,

биосовместимости, биотрансформации, транслокации в органах и тканях и механизмы элиминации. В связи с этим, немаловажным является и выбор объекта в качестве модельного организма, который позволил бы проводить быструю оценку действия того или иного наноматериала и получать достоверные результаты [3,4].

Цель исследования: Сравнительная оценка действия наночастиц (на примере наночастиц серебра) на различных модельных объектах.

Материалы и методы

В качестве модели прокариотической клетки была выбрана генно-инженерный люминесцирующий штамм *Escherichia coli* K12 TG1 рF1, содержащий плазмиду рF1 с кассетой *luxCDABE*-генов *Vibrio fischeri* МГУ-6. Для проведения данного биотестирования лиофилизированный препарат *lux*-биосенсора («Эколюм») был регидратирован с помощью дистиллированной воды, охлажденной до 8°C, после чего выдержан при 2-4 °C в течение 30 мин. Проведение теста ингибирования бактериальной люминесценции осуществлялось в измерительном блоке микропланшетного анализатора Infinite PROF200 (TECAN, Австрия).

В качестве модели эукариотической клетки использовали культуру клеток пресноводной инфузории *Stylonychia mytilus* (дикий штамм) в фазе экспоненциального роста. В число оцениваемых параметров включались выживаемость и численность (биомасса).

В роли модельного токсиканта был использован нанопрепарат серебра (НЧ Ag), обладающий высокой токсичностью по отношению к клетке. Оценка токсических эффектов исследуемых образцов наночастиц металлов осуществлялась в широком спектре эквимольных концентраций (4 М - 6×10^{-6} М).

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения ANOVA и критерия Тьюки (SPSS вер. 17,0). Значения с $P < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты

Исследования действия НЧ Ag на модели прокариотической клетки (*Escherichia coli* K12 TG1 pF1) показали, что полное подавление свечения отмечается в диапазоне концентраций от 4 до 0,025 М в течение 10 минут контакта и в дозе 0,0125 М через 145 мин контакта с клеткой. Разведения концентраций от 0,00625 до 0,000195 М демонстрировали отсутствие токсического действия.

Результаты исследований воздействия НЧ Ag на эукариотические клетки простейших показали, что максимальная гибель клеток наблюдалась также через 10 минут инкубации тест-объекта с токсикантом. Токсичность наблюдалась вплоть до концентрации 0,00625 М.

Оценка токсикологического параметра EC50 относительно модельных организмов выявила большую чувствительность клеток простейших в сравнении с *Escherichia coli* K12 TG1 pF1 (Таблица 1).

Таблица 1 – Биологический эффект наночастиц Ag при контакте тест-организма *E.coli* K12 TG1 pF1 и клеток *Stylonychia mytilus* с наночастицами

Тест-объект	Концентрация, М		
	Tox	EC50	NOEC
<i>E.coli</i> K12 TG1 pF1	3,2 - 0,025 ±0,0001	0,0125 ±0,00002	0,00625±0,0001
<i>Stylonychia mytilus</i>	3,2-0,0125±0,00002	0,00625±0,000001	0,003125±0,000001

Полученные данные показывают, что, несмотря на достаточно высокую чувствительность обоих модельных организмов к действию токсиканта, клетки *Stylonychia mytilus* оказались более показательны при получении результата. Однако, можно отметить, что совместное использование данных тест-объектов позволит получить более обширные результаты для понимания биологического действия исследуемого вещества.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования (Грант президента МК-3631.2017.11)

Список литературы:

1. Zou X, Shi J, Zhang H. «Coexistence of silver and titanium dioxide nanoparticles: enhancing or reducing environmental risks?», *Aquat Toxicol.*, Vol. 154, Sep. 2014, pp. 168-75.
2. Borm P, Robbins D, Haubold S, «The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried out for ECETOC, Particle», *Fibre Toxicol.*, Vol. 3(1), 2006, pp. 1743–8977.
3. Luo J, «Toxicity and Bioaccumulation of Nanomaterial in Aquatic Species», *J. U.S. SJWP*, Vol. 2, 2007, pp. 1–16.
4. Ikuma K, Decho AW, Lau BL., «When nanoparticles meet biofilms-interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles», *Front Microbiol.*, Vol. 16, Jun. 2015, pp. 560-591

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫХ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВАРИКОЗНОГО РАСШИРЕНИЯ ВЕН

СМЕТАНИНА М.А.^{1,2}, СИПИН Ф.А.², СЕВОСТЬЯНОВА К.С.^{1,2}, МАЙБОРОДИН И.В.¹,
ФИЛИППЕНКО М.Л.^{1,2}

¹Россия, Институт химической биологии и фундаментальной медицины

²Россия, Новосибирский государственный университет

Аннотация. Варикозная болезнь вен – серьёзное заболевание, снижающее работоспособность человека. Морфология варикозных вен (ВРВ) описана хорошо и подробно, однако это не обеспечило понимания патогенеза этого заболевания. В последние десятилетия при изучении варикозного расширения вен большое внимание уделялось его генетической составляющей. Были установлены некоторые важные гены, которые могут быть задействованы в патогенезе ВРВ, и даже были попытки построить гипотетические схемы сигнальных путей, участвующих в этом процессе. Нами в этой работе было выбрано три потенциально важных в патогенезе ВРВ гена (*MFAP5*, *COMP* и *HRC*), экспрессия которых отличается в варикозных венах, по сравнению со здоровыми, для проведения иммуногистохимического анализа их продуктов в стенке варикозной и здоровой вены с целью подтверждения или опровержения гипотезы об изменении их экспрессии на уровне белка.

Ключевые слова: варикозное расширение вен, ремоделирование стенки вены, внеклеточный матрикс, экспрессия белка.

Введение

Варикозное расширение вен (ВРВ) – основная нозологическая форма хронических заболеваний вен – поражает до четверти взрослого населения, в основном жителей индустриальных стран. Варикозные вены (ВВ) извилисты, изогнуты или чрезмерно удлинены. Гистология варикозных вен описана хорошо, и основное понимание патогенеза этой болезни возникает из морфологических и патофизиологических описаний. Вена состоит из трёх слоёв: интимы (состоит из слоя эндотелиальных клеток и подлежащих коллагена и эластина), меди (состоит из нескольких слоёв гладкомышечных клеток (ГМК), разделённых коллагеновыми и эластиновыми волокнами) и адвентиции (состоит из коллагена и фибробластов) [1]. При варикозном расширении вены ГМК часто приобретают эллиптическую форму, в клетках появляются коллагенсодержащие вакуоли, что характеризует смену фенотипа клеток от сократительного к секреторному. Разбухание и набухание клеток интимы происходит предположительно за счёт миграции внутреннего слоя ГМК и разрастания соединительной ткани [2]. Также в ВВ наблюдается гиперплазия интимы, субэндотелиальный фиброз и увеличение количества ГМК [3].

Первые исследования ВРВ начинались с морфологических описаний, изучения гистологии стенки ВВ (в сравнении со здоровой), и на этом этапе были установлены первые важные факты о строении стенки ВВ, в том числе об изменении относительной представленности слоёв и изменении состава внеклеточного матрикса (в частности, коллагеновой составляющей) [4-5].

По результатам проведенного нами ранее пилотного объединенного анализа транскриптома и метилома варикозных вен (в сравнении со здоровыми) были получены профили дифференциально экспрессируемых и метилированных генов, которыми обогащены несколько биологических процессов, важных для морфологии формирования органа [6-7]. С целью определения экспрессии нескольких из этих генов на уровне белка в данной

работе нами был выполнен иммуногистохимический анализ срезов здоровых и варикозных вен с использованием антител к белковым продуктам генов *MFAP5*, *COMP* и *HRC*.

Объекты и методы

Объекты

В настоящем исследовании были использованы биоптаты здоровых и варикозных вен от трёх пациентов с ВРВ. Исследование одобрено этическим комитетом Института химической биологии и фундаментальной медицины (протокол № 15 от 13.09.2013) и проведено согласно принципам декларации Хельсинки.

Методы

Срезы вен фиксировали в забуференном формалине, дегидратировали, заключали в парафиновые блоки, используемых для нарезания на микротоме срезов толщиной 5 мкм, которые помещали на обработанные полизином стекла. Иммуногистохимическое окрашивание срезов стенок вен проводили согласно протоколу производителя (антитела к *MFAP5* – Proteintech, к *COMP* – Sino Biological Inc, к *HRC* – Aviva Systems Biology). Была сделана попытка оценить полученный сигнал окрашивания антителами с помощью программы Image Studio Lite, но количественно оценить окраску, полученную именно антителами, но не гематоксилином, не удалось. Таким образом, анализ проводили на качественном уровне.

Результаты

Выбор изучаемых в настоящей работе генов (*MFAP5*, *COMP* и *HRC*) обусловлен результатами наших предыдущих исследований.

1. MFAP5

Белок MFAP5 является компонентом внеклеточного матрикса (ВКМ), который способствует прикреплению клеток к микрофибриллам через интегрины.

Микрофотографии окрашенных антителами к MFAP5 срезов вен представлены на рисунке 1.

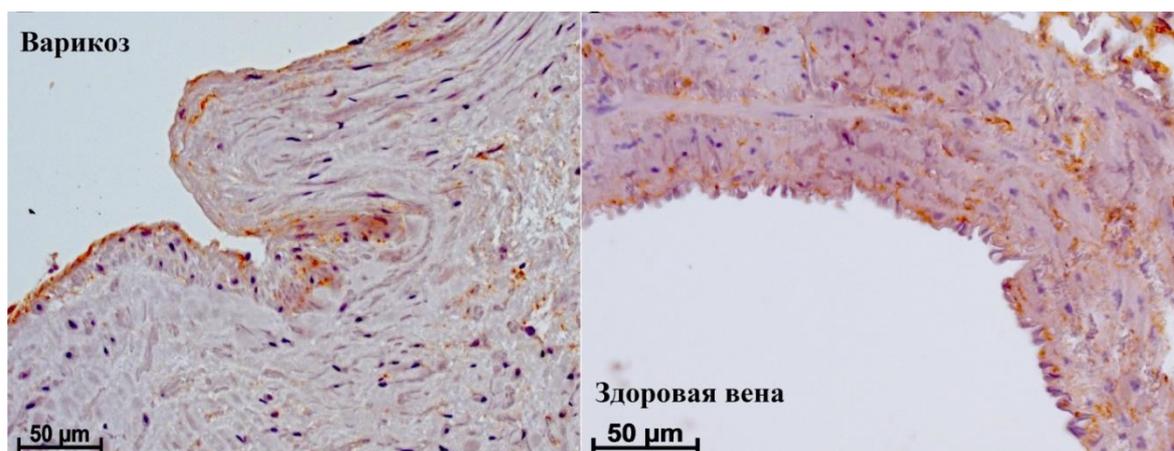


Рисунок 1. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к MFAP5 парафиновых срезов здоровых и варикозных вен

Слева – срез ВВ, справа – срез ЗВ

Из рисунка видно, что у данного пациента видимой разницы в общем содержании белка MFAP5 между здоровой веной (ЗВ) и ВВ не наблюдается. Однако можно заметить накопление этого белка ВКМ во внутреннем слое варикозной вены, по сравнению со здоровой. В случае другого пациента качественно наблюдалось заметно большее накопление это белка в стенке ВВ по сравнению с ЗВ.

2. COMP

Белок COMP является белком неколлагенового ВКМ. Он состоит из пяти гликопротеиновых субъединиц, каждая из которых имеет кальций-связывающие домены. Связывание этого белка с другими белками ВКМ (например, с коллагеном) зависит от присутствия двухвалентных катионов.

Микрофотографии окрашенных антителами к COMP срезов вен представлены на рисунке 2. Из рисунка видно, что содержание белка COMP выше в ВВ, по сравнению с ЗВ.

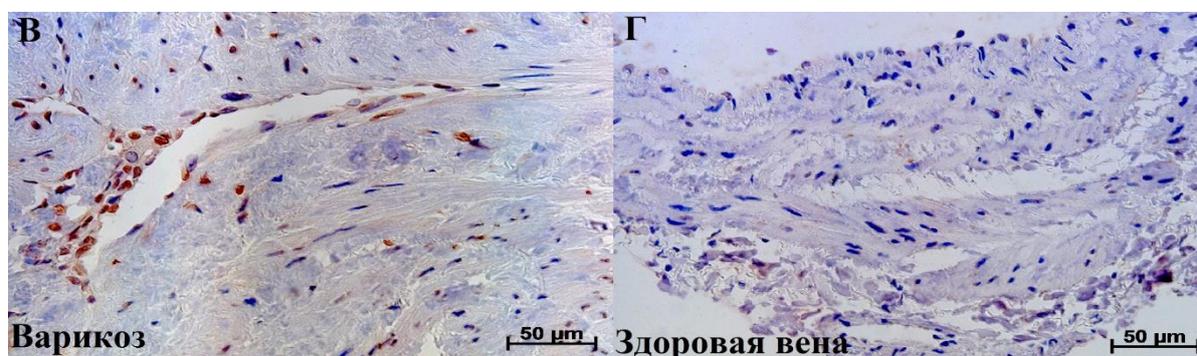


Рисунок 2. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к COMP парафиновых срезов здоровых и варикозных вен

Слева – срез ВВ, справа – срез ЗВ

3. HRC

HRC – саркоплазматический ретикулярный белок, локализован в просвете саркоплазматического ретикулума (СР), функционирует в регуляции высвобождаемого кальция в СР.

Микрофотографии окрашенных антителами к HRC срезов вен представлены на рисунке 3. Исходя из полученных микрофотографий, существенной разницы в содержании белка HRC в ВВ по сравнению с ЗВ нами обнаружено не было. Однако на срезе биоптата вены от одного из пациентов мы наблюдали разницу (увеличение) в накоплении белка в варикозной вене по сравнению со здоровой.

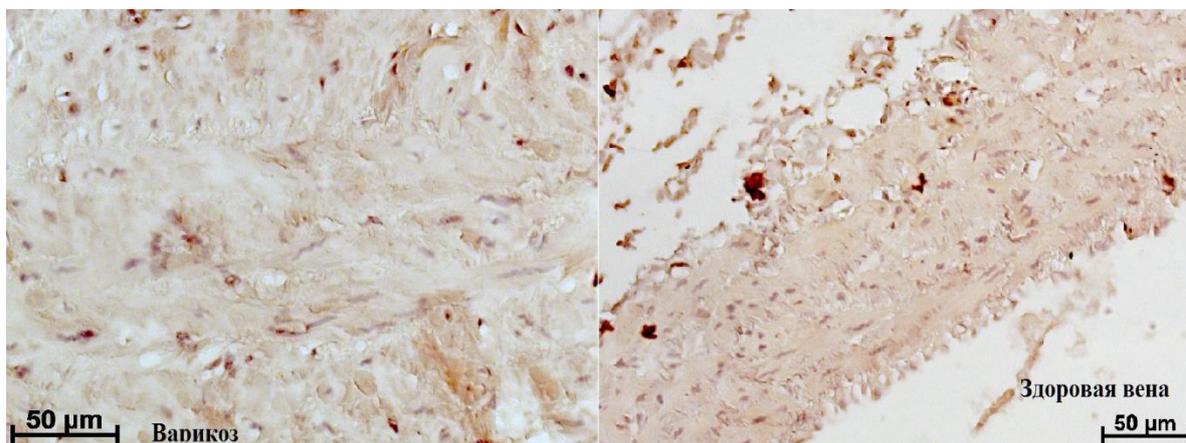


Рисунок 3. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к HRC парафиновых срезов здоровых и варикозных вен

Слева – срез ВВ, справа – срез ЗВ

Заключение

В последнее время появляется всё больше свидетельств в пользу того, что процесс ремоделирования стенки вены начинается в эндотелиальном слое, где могут накапливаться и впоследствии передаваться на следующие слои ключевые молекулы патогенеза ВРВ, возможно, такие как белок MFAP5. Белки семейства MFAP могут опосредованно через активацию транскрипционных факторов приводить к нарушениям в молекулярном составе ВКМ, таким как дисрегуляция коллагенов и дисбаланс в синтезе матричных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов. Таким образом, увеличение уровня экспрессии белка MFAP5 может являться одним из основных событий в развитии ВРВ. Также была показана коэкспрессия генов *MFAP5* и *COMP* (http://glados.ucd.ie/Coexpression/display_network.php?gene_name=COMP). *COMP* – структурный компонент ВКМ, образующий пятидоменные конгломераты, возможно, участвует в изменении архитектоники ВКМ.

Хотя белок HRC не показал на качественном уровне оценки изменения экспрессии белка в ВВ, однако его более глубокое изучение может

представлять интерес, исходя из его функции, которая может оказывать влияние на течение ВРВ. Показано, что высвобождение Ca^{2+} , индуцированное кофеином, и деполяризация СР были значительно увеличены в кардиомиоцитах с повышенной экспрессией гена *HRC*. Возможно, гипотетическое понижение экспрессии *HRC* может быть связано с переходом фенотипа ГМК от сократительного к секреторному.

Исследование было поддержано комплексной программой СО РАН № II.2П/VI.62-5 МКБ (проект 0309-2015-0028).

Список литературы:

1. Naoum J.J., Hunter G.C., Woodside K.J., Chen C. Current advances in the pathogenesis of varicose veins. // J Surg Res. 2007. Vol. 141, № 2. P. 311-316.
2. Porto L.C., da Silveira P.R., de Carvalho J.J., Panico M.D. Connective tissue accumulation in the muscle layer in normal and varicose saphenous veins. // Angiology. 1995. Vol. 46, № 3. P. 243-249.
3. Oklu R et al. Pathogenesis of varicose veins. // J Vasc Interv Radiol. 2012. Vol. 23, No1, P. 33-39.
4. Sansilvestri-Morel P., Rupin A., Badier-Commander C. et al. Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. // J Vasc Res. 2001. Vol. 38, №6 P. 560-568.
5. Degiorgio-Miller A.M., Treharne L.J., McAnulty R.J. et al. Procollagen type I gene expression and cell proliferation are increased in lipodermatosclerosis. // Br J Dermatol. 2005. Vol. 152, №2 P. 242-249.
6. Сметанина М.А., Кель А.Э., Майбородин И.В., Севостьянова К.С., Шевела А.И., Золотухин И.А., Филипенко М.Л., Стегмайер Ф. Изучение роли системы ремоделирования внеклеточного матрикса в патогенезе варикозной болезни вен. // В сборнике: Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии. 2016. С. 95-96.
7. Smetanina M.A. DNA methylation and gene expression profiling reveals MFAP5 as a regulatory driver of extracellular matrix remodeling in varicose vein disease. // Int Angiol. 2015. Vol. 34 – Suppl. 1 to issue №. 4. P. 108.

SECTION 3.

TECHNOLOGY

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗРУШЕНИЯ ЧАСТИЦ ФЕРРОМАГНИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ В МАГНИТОВИБРИРУЮЩЕМ СЛОЕ

ВЕРНИГОРОВ Ю.М., ЛЕЛЕТКО К.К., ФРОЛОВА Н.Н.

Россия, ДОНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Аннотация. В статье рассмотрен механизм разрушения частиц ферромагнитного материала в неоднородном магнитном поле при разной порозности слоя. Ударные нагрузки, приводящие к разрушениям, могут возникнуть, например, при столкновении летящей частицы с неподвижной стенкой или при взаимных соударениях. Рассматриваемая частица должна обладать достаточным количеством кинетической энергии для преодоления внутренних связей. Предложена модель разрушения частиц в магнитовибрирующем слое, основанная на балансе энергии разрушения и энергии, получаемой частицей или агрегатом от магнитного поля. Получены аналитические зависимости размеров частиц ферромагнитного материала при их разрушении в магнитовибрирующем слое от градиента индукции магнитного поля, которые позволяют прогнозировать гранулометрический состав при размоле порошка за счет ударного взаимодействия частиц как между собой, так и при ударе о стенки рабочей камеры.

Ключевые слова: ферромагнетик, магнитное поле, дисперсная система.

В 21 веке механическое диспергирование не только не утратило своего значения, но и приобрело статус базового передела, результаты которого в конечном итоге и определяют основные свойства конечного продукта. Производство высокодисперсных порошков, которое связано с высокими энергетическими затратами, не может позволить себе использование недостаточно эффективных способов диспергирования. Эффективность

механического диспергирования, оцениваемая по оптимальному гранулометрическому составу порошка и минимальному удельному расходу электроэнергии, тем выше, чем быстрее и полнее выделяются из материала наиболее тонкие фракции, тормозящие процесс измельчения.

Очевидно, что для поддержания высокого уровня эффективности ударного диспергирования кинетическая энергия мелющих тел, частиц и т.д. не должна уменьшаться. Это не означает, что ударное измельчение ограничено диспергированием только мягких, малоабразивных веществ. Это указывает на необходимость создания других типов мельниц, способных реализовать все преимущества разрушающего удара [1].

Ударные нагрузки могут возникнуть в самых разнообразных условиях и обстоятельствах. Например, при столкновении летящей частицы с неподвижной стенкой или взаимные соударения частиц. В любом случае частица должна обладать таким количеством кинетической энергии, которой хватило бы для преодоления внутренних связей между частицами, обеспечивающих частицу или агрегат как целое. Разрушающий эффект зависит от массы тела и его скорости. Чем больше вес куска материала и выше его скорость, тем эффективней работа ударного разрушения. Если уменьшить массу тела, для достижения тех же результатов нужно увеличить его скорость и наоборот.

Цель работы: рассмотреть механизм разрушения частиц ферромагнитного материала в неоднородном магнитном поле при разной порозности слоя.

1. Определим параметры магнитного поля, приводящие к разрушению частицы магнитовибрирующего слоя [2] высокой порозности при ударе о стенку рабочего объема.

Предположим:

- диссипацией энергии за счет взаимодействия частиц сферической формы с непрерывной фазой пренебрегаем;

- магнитное поле является суперпозицией двух полей: постоянного \vec{B}_c и переменного неоднородного поля \vec{B}_v частотой ω ;
- подкачка энергии от поля происходит через поступательные степени свободы частиц;
- $B_c \ll B_v$, в противном случае дисперсная система переходит в структурированное состояние, ($\vec{B}_c \perp \vec{B}_v$).

С учетом вышесказанного уравнение движения ферромагнитной частицы можно записать в виде:

$$m\ddot{y} = P \frac{\partial B_v}{\partial y} \sin \varphi_0 \cos(\omega t), \quad (1)$$

где \ddot{y} – ускорение движения частицы, m – масса частицы, \vec{P} – ее магнитный момент $\varphi = \varphi_0 + \varphi_1$ – угол между векторами \vec{B} и \vec{P} , φ_0 – угол между этими векторами в начальный момент времени? $\partial B_v / \partial y$ – градиент индукции переменного поля.

Интегрируя уравнение (1) с учетом $|\vec{B}| = \sqrt{B_c^2 + B_v^2 \cos^2(\omega t)}$, получим выражение для энергии, передаваемой полем частице [3] в единицу времени при поступательно – колебательном движении:

$$E_{n-k} = \frac{1}{2\pi} \frac{(P \partial B_v / \partial y)^2}{m\omega}, \quad (2)$$

Предположив, что порозность частиц в слое высока, следует ожидать разрушения частиц только при соударении со стенками объема, в который они помещены. Кроме того, считаем, что размеры рабочего объема и частота поля таковы, что время пролета частиц между стенками соответствует времени $T/2$.

При измельчении ударом затраты энергии E_p на разрушение сферической частицы следуют гипотезе В. Л. Кирпичёва [4], согласно которой:

$$E_p = \frac{\pi \sigma^2 d_k^3}{12 E} (Z_u^3 - 1), \quad (3)$$

где σ – предел прочности материала; d_k – конечный диаметр частицы; d_H – начальный диаметр частицы; E – модуль Юнга материала; $Z_u = \frac{d_H}{d_k}$ – степень измельчения материала.

Разрушение частиц будет наблюдаться при условии:

$$E_p = E_{n-k} \cdot \frac{T}{2}. \quad (4)$$

После несложных преобразований (4) приобретет вид:

$$\frac{\partial B}{\partial y} = \sqrt{\frac{1 - \left(\frac{d_k}{d_H}\right)^3}{A}}, \quad (5)$$

Принято, что $P = \frac{J \pi d_H^3}{6}$, где J – намагниченность материала частицы;

$$m = \frac{\rho \pi d_H^3}{6}, \quad \rho - \text{плотность материала частицы}, \quad \frac{E J^2}{\rho \omega^2 \sigma^2} = A, \quad \frac{T}{2} = \frac{\pi}{\omega}.$$

Коэффициент A зависит от механических и магнитных характеристик материала частиц, а также от частоты переменного поля.

2. Определим параметры магнитного поля, приводящие к разрушению частицы при ударе о другую частицу. Допустим, что топология магнитного поля не изменилась и выполняются принятые выше допущения. Рассмотрим полидисперсную среду ферромагнитного

материала. Предположим, что при соударении разновеликих частиц разрушается одна из частиц.

С учетом соотношений (2) и (3) разрушение частиц происходит при выполнении следующего условия:

$$\frac{1}{2\pi} \frac{(P_m \partial B_V / \partial y)^2}{m\omega} \cdot \frac{\pi}{\omega} + \frac{1}{2\pi} \frac{(P_M \partial B_V / \partial y)^2}{M\omega} \cdot \frac{\pi}{\omega} = \frac{\pi\sigma^2 D_K^3}{12E} \left(\frac{D_H^3}{D_K^3} - 1 \right), \quad (6)$$

где $P_m = \frac{J\pi d^3}{6}$ – магнитный момент первой частицы, d – диаметр первой частицы, $m = \frac{\rho\pi d^3}{6}$ – масса первой частицы, ρ – плотность материала,

$P_M = \frac{J\pi D_H^3}{6}$ – магнитный момент второй частицы, D_H – начальный диаметр второй частицы, D_K – конечный диаметр второй частицы, $M = \frac{\rho\pi D_H^3}{6}$ – масса второй частицы, J – намагниченность материала.

В (6) первое слагаемое есть энергия, передаваемая магнитным полем за половину периода первой частице, второе слагаемое – энергия, передаваемая второй частице.

Преобразовав (6), найдем соотношения между размерами разрушаемой частицы и градиентом индукции поля в виде:

$$\frac{\partial B}{\partial y} = \sqrt{\frac{K(D_H^3 - D_K^3)}{d^3 + D_H^3}}, \quad (7)$$

где $K = \frac{\rho\sigma^2\omega^2}{J^2E}$ – константа, зависящая от механических и магнитных свойств

материала и частоты переменного поля. Можно заметить, что $K = \frac{1}{A}$

Соотношение (7) позволяет определить градиент индукции поля, при котором

разрушается частица диаметром D_n до частицы диаметром D_k при соударении между частицами диаметрами D_n и d .

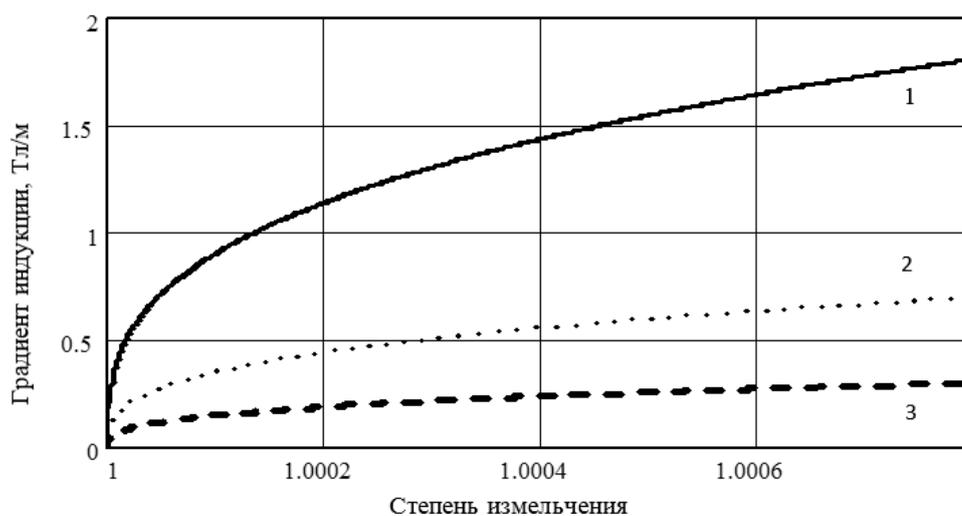
Соотношения (5) и (7) позволяют рассчитать градиент индукции магнитного поля, при котором происходит разрушение частиц ударом о стенку и друг с другом. Результаты расчета для разных значений степени измельчения приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты расчета градиента индукции магнитного поля для разных значений степени измельчения

$D_n=150$ мкм	Z_n	d , мкм	$\partial B/\partial y$, Тл/м (со стенкой)	$\partial B/\partial y$, Тл/м (м/д частицами)
$D_k=100$ мкм	1,5	20	4,046	4,04
		50	4,046	3,97
		100	4,046	3,55
		500	4,046	0,66
<hr/>				
$D_n=30$ мкм	3	20	4,73	4,16
$D_k=10$ мкм		50	4,73	1,99
		100	4,73	0,77
		500	4,73	0,07

Разрушение частицы при ударе со стенкой при заданной степени измельчения происходит при градиенте индукции поля в несколько раз превышающим при ударе между частицами. С увеличением размера частиц различие градиентов индукции возрастает.

На рис.1-3 приведены расчетные зависимости, полученные по соотношениям (5) и (7). Рис.1 показывает связь между степенью измельчения и градиентом индукции магнитного поля, при которой происходит разрушение частицы при их соударении. Зависимости построены для различных высококоэрцитивных материалов.



1- SmCo, 2- NdFeB, 3- BaO₆Fe₂O₃

Рис.1. Зависимость градиента индукции магнитного поля, при котором разрушаются частицы при их соударении, от заданной степени измельчения

Очевидно, что повышение магнитных свойств материала требует более высокоградиентного магнитного поля, необходимого для разрушения частиц при их соударении. Например, при степени измельчения 1,0004 для разрушения частиц самарий-кобальт необходимо поле с градиентом индукции 1,4Тл/м, а разрушение частиц феррита бария происходит в поле с градиентом индукции всего 0,25Тл/м.

Связь степени измельчения и градиента индукции магнитного поля частотой 50 Гц при ударе частиц с различными механическими и магнитными характеристиками о стенку приведена на рис.2

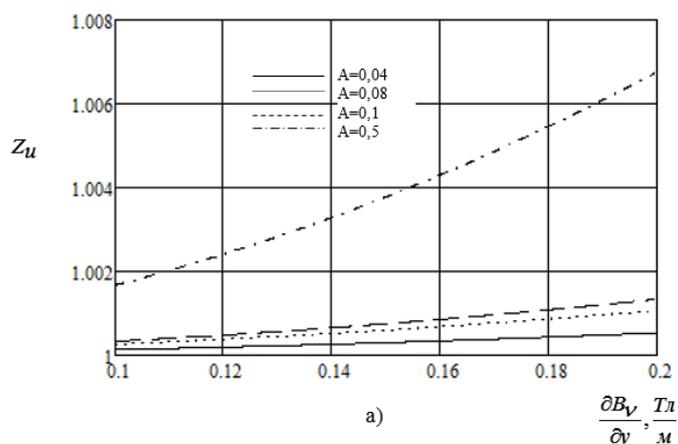
Предполагаем, что коэффициент А для различных магнитных материалов существенно меняется при фиксированной частоте за счет изменения механических и магнитных характеристик от единиц $\frac{A^2 c^4 m^2}{кг^2}$ до сотых

долей. Расчет для различных А представлен на рис.2. Анализ кривых на рис.2 позволяет сделать вывод, что для сильномагнитных материалов, либо

для материалов, имеющих невысокий предел прочности при разрушении измельчение частиц при единичном акте соударения начинается в полях с градиентом индукции порядка десятых долей Тл/м (рис.2б)). Например, для феррита бария: намагниченность $J = 320 \cdot 10^3 \text{ A/M}$, модуль Юнга $E = 1,9 \cdot 10^{11} \text{ H/M}^2$, плотность $\rho = 5,1 \cdot 10^3 \text{ кг/M}^3$, прочность на разрушение $\sigma = 3 \cdot 10^7 \text{ H/M}^2$, [4] коэффициент $A=0,04$. При этом уменьшение диаметра частиц в 1,1 раза происходит в полях с градиентом индукции 0,4 Тл/м, а в 1,5 раза - 1,25 Тл/м.

Следует отметить, что для каждого материала существует значение градиента индукции, при котором происходит интенсивное разрушение частиц.

При $A = 1 \frac{A^2 c^4 m^2}{\text{кг}^2}$ эффективное разрушение частиц наступает при градиенте индукции более $0,6 \div 0,7 \text{ Тл/M}$, а при $A=2 \frac{A^2 c^4 m^2}{\text{кг}^2}$ процесс реализуется в полях с градиентом индукции $0,4 \div 0,5 \text{ Тл/M}$.



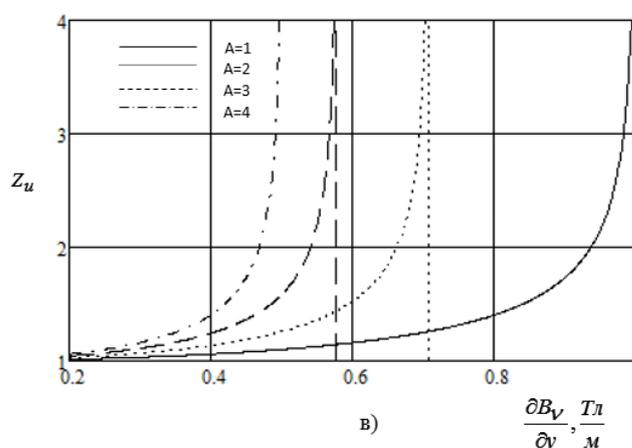
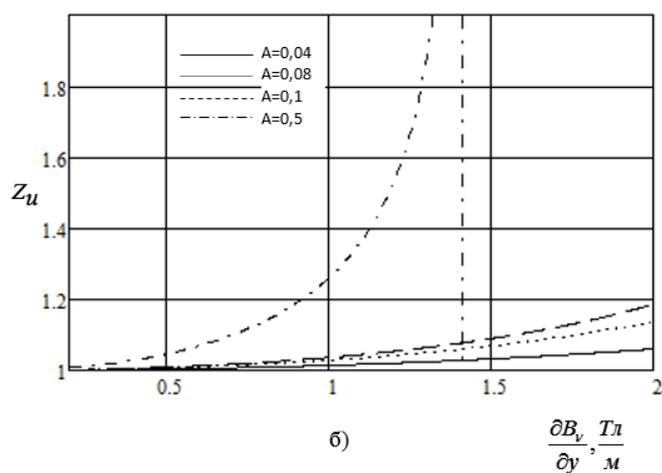


Рис.2 Связь степени измельчения и градиента индукции поля, разрушающего частицы при их ударе о стенку рабочей камеры.

Зависимости соответствуют:

$$\text{на рис.2а } \frac{\partial B_v}{\partial y} = 0,1 \div 0,2 \frac{\text{Тл}}{\text{м}} \quad A = 0,04 \div 0,5 \quad \frac{A^2 \text{ с}^4 \text{ м}^2}{\text{кг}^2};$$

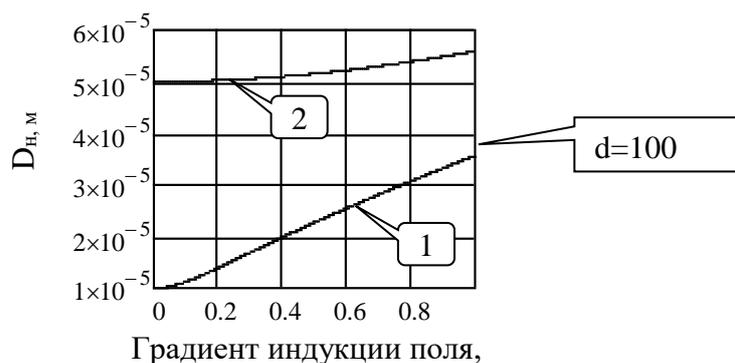
$$\text{на рис.2б } \frac{\partial B_v}{\partial y} = 0,5 \div 2 \frac{\text{Тл}}{\text{м}} \quad A = 0,04 \div 0,5 \quad \frac{A^2 \text{ с}^4 \text{ м}^2}{\text{кг}^2};$$

$$\text{на рис.2в } \frac{\partial B_v}{\partial y} = 0,2 \div 1 \frac{\text{Тл}}{\text{м}} \quad A = 1 \div 4 \quad \frac{A^2 \text{ с}^4 \text{ м}^2}{\text{кг}^2}.$$

Например, для $A = 1 \frac{A^2 c^4 m^2}{\kappa^2}$ эффективное разрушение частиц наступает при градиенте индукции более $0,6 \div 0,7 \text{ Тл/м}$, а при $A = 2 \frac{A^2 c^4 m^2}{\kappa^2}$ процесс реализуется в полях с градиентом индукции $0,4 \div 0,5 \text{ Тл/м}$.

Кроме того, при малых градиентах индукции от частицы отделяется малая часть, что происходит и при больших градиентах индукции. Это следует учитывать при выборе параметров поля.

Зависимость конечного размера частицы при ударе о другую от градиента индукции магнитного поля приведены на рис.3. Задавая конечный размер частицы, которая определяет тонину помола, из соотношения (7) определяем, при каких полях реализуется помол с заданным гранулометрическим составом [5]. Для феррита бария в широком интервале частиц размером 100 мкм отделение частицы размером от 0,5 -10 мкм происходит в полях с одинаковым градиентом индукции (рис.3а, кривая 1). Взаимодействие частиц в 100 мкм с частицами размером более 50 мкм приводит к отделению малой части второй частицы (рис. 3а, кривая 2). В широком интервале частиц размером 500 мкм при взаимодействии с частицами от 0,5-10 мкм получен результат аналогичный предыдущему (рис.3б, кривая 1). Взаимодействие частиц 500 мкм с частицами 50 мкм и более проиллюстрировано на рис. 3б, кривая 2.



а)