

- сурс]. – 2016. – Режим доступа: [arxiv.org/abs/1602.07261v2](https://arxiv.org/abs/1602.07261v2). – Дата доступа: 28.05.2017.
6. Grigory Antipov, Moez Baccouche, Jean-Luc Dugelay “Face aging with conditional generative adversarial networks”// [jmlr.org](https://jmlr.org) [Электронный ресурс]. – 2017. – Режим доступа: [proceedings.mlr.press/v9/glorot10a/glorot10a.pdf?hc\\_location=ufi](https://proceedings.mlr.press/v9/glorot10a/glorot10a.pdf?hc_location=ufi). – Дата доступа: 28.05.2017.
  7. Leon A. Gatys, Alexander S. Ecker, Matthias Bethge “A Neural Algorithm of Artistic Style”//[arxiv.org](https://arxiv.org) [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: [arxiv.org/abs/1508.06576v2](https://arxiv.org/abs/1508.06576v2). – Дата доступа: 28.05.2017.
  8. Karen Simonyan, Andrew Zisserman “Very Deep Convolutional Networks for Large-Scale Image Recognition”//[arxiv.org](https://arxiv.org) [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: [arxiv.org/abs/1409.1556](https://arxiv.org/abs/1409.1556). – Дата доступа: 28.05.2017.
  9. Pretrained models// MatConvNet, свободная.  
<http://www.vlfeat.org/matconvnet/pretrained> (дата обращения: 29.04.2018)
  10. Richard H. Byrd, Peihuang Lu, Jorge Nocedal, Ciyou Zhu “A Limited Memory Algorithm For Bound Constrained Optimization”// [www.math.unm.edu](http://www.math.unm.edu) [Электронный ресурс]. – 1994. – Режим доступа:  
[www.math.unm.edu/~vageli/courses/Ma579/lbfgs.pdf](http://www.math.unm.edu/~vageli/courses/Ma579/lbfgs.pdf). – Дата доступа: 28.05.2017.
  11. Diederik P. Kingma, Jimmy Ba “Adam: a method for stochastic optimization”//[arxiv.org](https://arxiv.org) [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа: [arxiv.org/abs/1412.6980](https://arxiv.org/abs/1412.6980). – Дата доступа: 28.05.2017.

## РЕГИСТРАЦИЯ ПРОДУКЦИИ ХЛОРНОВАТИСТОЙ КИСЛОТЫ В СУСПЕНЗИИ АКТИВИРОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ПОМОЩИ КРАСИТЕЛЯ ЦЕЛЕСТИНОВОГО СИНЕГО В

**В. Е. Луценко**

Нейтрофилы, или полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты, представляют собой клетки врожденного звена иммунной системы, обеспечивающего наиболее быстрые защитные реакции на проникновение в организм хозяина чужеродных антигенов и появление собственных дефектных клеток организма. Супероксидный анион-радикал ( $O_2^-$ ), генерируемый НАДФН-оксидазой нейтрофилов, является исходным продуктом для образования широкого спектра активных форм кислорода, азота и галогенов (АФГ), в частности, хлорноватистой кислоты (НОСІ). Образование НОСІ катализируется миелопероксидазой (МПО), высвобождаемой из азурофильных гранул нейтрофилов во внеклеточное пространство в результате дегрануляции или лизиса клеток [1]. Увеличение концентрации/активности МПО и продуктов окисления НОСІ является маркером различных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, онкологические и др. [2].

Обнаружение НОСІ в биологических системах затруднено ввиду его высокой реакционной способности. Методы определения НОСІ, как правило, основаны на измерении окисления соединения под действием

галогенидаминов таурина. Данное соединение должно обладать следующими свойствами: не являться субстратом пероксидазного цикла МПО; максимум спектра поглощения должен находиться в видимой области и не изменяться в диапазоне pH 5–8; быть устойчивым к миллимолярным концентрациям  $\text{H}_2\text{O}_2$  [3]. В работе [4] было показано, что всем этим условиям удовлетворяет целестиновый синий В (СВ).

Для уточнения длин волн возбуждения и испускания флуоресценции была произведена регистрация спектров возбуждения флуоресценции в диапазоне 420–520 нм, спектров испускания – 520–620 нм для СВ и СВ, окисленного  $\text{HOCl}$ . Регистрацию флуоресценции осуществляли на спектрофлуориметре Solar CM-2203 (Беларусь).

Спектры возбуждения флуоресценции окисленного СВ имеют широкий пик с максимумом  $440 \pm 20$  нм, эмиссии –  $597 \pm 20$  нм, подобные максимумы отсутствовали в спектрах неокисленного СВ (рис. 1а). Для того, чтобы при регистрации данных исключить вклад полосы Core МПО (430 нм), высвобождающейся из активированных нейтрофилов, при дальнейших исследованиях использовали длины волн возбуждения и эмиссии флуоресценции СВ 460 и 590 нм, соответственно.

В качестве агониста для подбора оптимальной концентрации красителя в системе активированных нейтрофилов был выбран 4-форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) – прямой активатор нейтрофилов, который помимо активации НАДФН-оксидазы вызывает также дегрануляцию азурофильных гранул нейтрофилов [5].

На рис. 1б представлена типичная кинетическая кривая изменения интенсивности флуоресценции СВ (20 мкМ) при стимуляции нейтрофилов ФМА (50 нМ) и обозначены параметры окисления СВ, определяемые по кинетическим кривым:  $h$  – изменение интенсивности флуоресценции СВ по сравнению с фоновым уровнем через 15 мин после добавления стимулятора (степень),  $v$  – скорость окисления СВ, определяемая как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой (скорость),  $t$  – промежуток времени от момента добавления стимулятора до возникновения сигнала флуоресценции (лаг-период).

На рис. 2 представлены концентрационные зависимости изменения параметров окисления СВ в суспензии активированных ФМА нейтрофилов. Из рис. 2а видно, что скорость и степень окисления СВ увеличиваются при повышении его концентрации, а максимальные значения достигаются при концентрации 20 мкМ. При концентрации СВ 20 мкМ длительность лаг-периода минимальна (рис. 2б). Таким образом, концентрация СВ 20 мкМ является оптимальной для регистрации продукции АФГ активированными нейтрофилами.

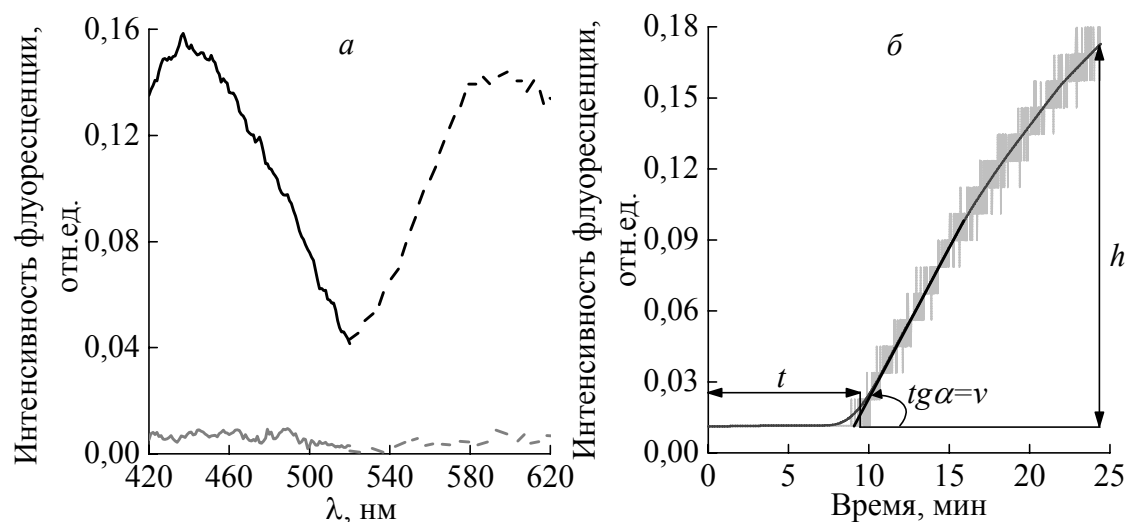


Рис. 1. Флуоресцентные характеристики целестинового синего В:  
 а – спектры возбуждения (сплошные линии) и эмиссии (пунктирные линии)  
 СВ (20 мкМ, серые линии) и продукта его реакции с  $\text{HOCl}$  (10 мкМ, черные линии);  
 б – Типичная кинетическая кривая изменения интенсивности флуоресценции СВ (20 мкМ;  
 $\lambda_{\text{ex}}=460$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=590$  нм) в суспензии активированных ФМА (50 нМ) нейтрофилов ( $1 \cdot 10^6$  кл/мл),  
 где  $t$  – лаг-период,  $h$  – степень окисления СВ,  $v$  – скорость окисления СВ

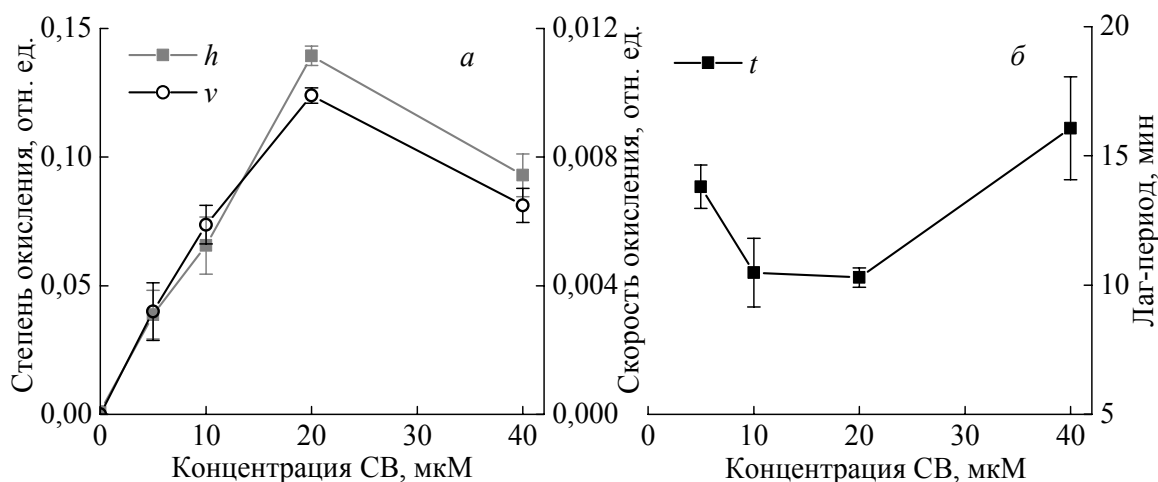


Рис. 2. Концентрационные зависимости параметров окисления СВ:  
 а – степень ( $h$ ) и скорость ( $v$ ), б – лаг-период ( $t$ ).  
 Регистрацию производили в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 20 мМ таурина,  
 при 37 °С и непрерывном перемешивании

Для выяснения механизмов окисления СВ в суспензии нейтрофилов исследовано влияние ФМА и N-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (ФМЛФ), активирующих нейтрофилы по разным механизмам (рис. 3а), и

ингибиторов активности МПО (гидразида 4-аминобензойной кислоты (АВАН) и церулоплазмينا (ЦП)) на скорость окисления СВ (рис. 3б).

ФМЛФ действует по рецептор-зависимому механизму и непосредственно инициирует респираторный взрыв нейтрофилов, но не вызывает выхода содержимого гранул во внеклеточную среду [5], для последнего необходимо присутствие в среде цитохалазина В (cythB), который ингибирует полимеризацию примембранного актина, способствуя выходу содержимого азурофильных гранул [6]. Действительно, окисление СВ в суспензии нейтрофилов, активированных ФМЛФ, происходит лишь при добавлении к клеткам cythB (рис. 3а).

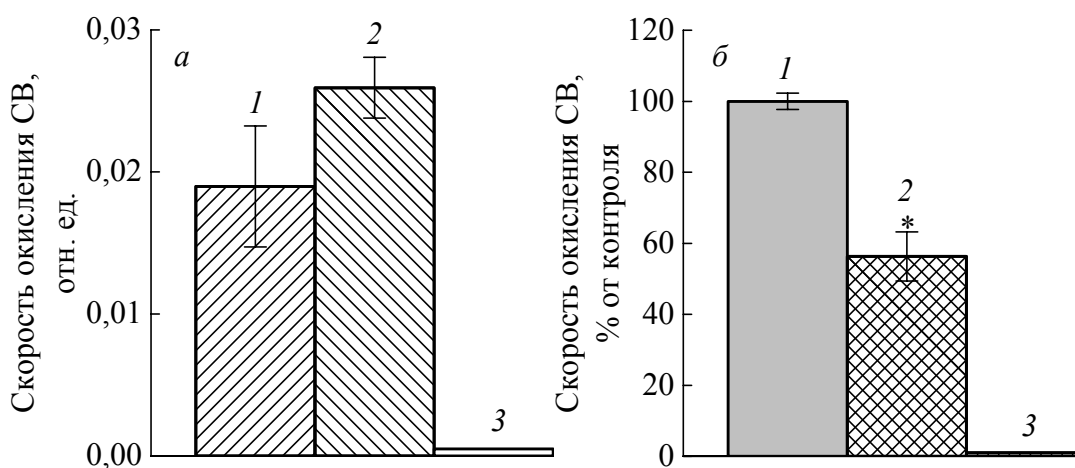


Рис. 3. Влияние активаторов нейтрофилов и ингибиторов ферментативной активности МПО на скорость окисления СВ:

- а – Скорость окисления СВ (20 мкМ) в суспензии нейтрофилов в присутствии 50 нМ ФМА (1), а также 1 мкМ ФМЛФ в присутствии (2) и отсутствии (3) cythB (5 мкг/мл);  
 б – Скорость окисления СВ (20 мкМ) в суспензии нейтрофилов, предварительно проинкубированных с 50 мкМ АВАН (2) или 150 мкг/мл ЦП (3), при активации 50 нМ ФМА (1)

ЦП – белок острой фазы воспаления, образующий комплексы с МПО и ингибирующий как хлорирующую, так и пероксидазную активность фермента [8], – подавлял ФМА-активированную флуоресценцию СВ до фонового уровня (рис. 3б).

В результате исследования были определены оптимальные условия (длины волн возбуждения и испускания, концентрация СВ), при которых основной вклад в изменение флуоресцентных свойств СВ в суспензии активированных нейтрофилов вносит НОСl. Продемонстрировано, что обязательными условиями для окисления СВ в суспензии нейтрофилов

являются сборка и активации НАДФН-оксидазы, а также выход МПО из азурофильных гранул.

### Литература

1. Мальцева В. Н., Сафронова В. Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология. 2009. Т.51. №6. С. 467–474.
2. Lau, D., Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease // Pharmacology. Therapeutics. 2006. V.111. №1. P. 16-26.
3. Соколов А. В. и др. Кинетический метод определения галогенирующей активности миелопероксидазы // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Тез. докл. Междунар. науч. конф., сб. ст.: в 2 ч. Ч.2. Минск, 2012. С. 272 – 274.
4. Sokolov A. V. et al. Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines // Free Radical Research. 2015. V.49. №6. P. 777– 789.
5. Sheppard F. R. et al. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation // J. Leukocyte Biology. 2005. V.78. №5. P. 1025–1042.
6. Галкин А. А., Демидова В. С. Роль  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции функций нейтрофилов // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127. №1. С. 58–72.
7. Malle E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? // British J. Pharmacology. 2007. Т. 152. №6. С. 838–854.
9. Sokolov A. V. et al. Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties of each other // Free Radical Research. 2008. V.42. №11–12. P. 989–998.

## ВЛИЯНИЕ АП-КОНВЕРСИИ НА РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ИОНАХ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ СРЕДЕ НА ПОТЕРИ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Д. Д. Матюшевский

### ВВЕДЕНИЕ

При ап-конверсии в системе ионов редкоземельных элементов, наиболее существенными механизмами являются поглощение из возбужденного состояния и перенос энергии между ионами [1].

В работе проводится точный расчет населенностей уровней системы ионов редкоземельного элемента тулия  $\text{Tm}^{3+}$ . Представлены результаты для двух концентраций ионов: низкой, когда процесс переноса энергии между ионами имеет маленькую вероятность и основным механизмом является поглощение из возбужденного состояния, и высокой, когда перенос энергии между ионами имеет большую вероятность.

Интерес к исследованию развития ап-конверсии в системе с низкой концентрацией ионов связан с проблемой контроля внутривибронаторных