

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРОФОРОВ BODIPY ДЛЯ ОЦЕНКИ КИНЕТИКИ КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ И В ПАТОЛОГИИ

Е.Л. Алексахина¹, А.С. Иванова¹, О.А. Пахрова¹, И.К. Томилова¹, С.Д. Усольцев^{2,3},
Ю.С. Марфин^{2,3}

¹Ивановская государственная медицинская академия, Шереметевский пр., 8, Иваново, Российская Федерация, 153012

E-mail: alexakhina2013@yandex.ru, asivanova@mail.ru, o.pakhrova@bk.ru, tomilovaivanovo@mail.ru

²Ивановский государственный химико-технологический университет, пр. Шереметевский, д.7, Иваново, Российская Федерация, 153000

E-mail: sergeyusoltsev@isuct.ru

³Тихоокеанский государственный университет, ул. Тихоокеанская 136, Хабаровск, Российская Федерация, 680035

E-mail: sergeyusoltsev@isuct.ru, marfin@pnu.edu.ru

Методы молекулярной сенсорики – новый и интенсивно развивающийся инструмент в биохимических исследованиях. Они позволяют раскрывать механизмы биохимических реакций, а также оперативно проводить диагностику патологических состояний. В качестве таких молекул-сенсоров, например, для исследования состояния белков плазмы крови, нашли применение флуоресцентные красители на основе борфторидных комплексов дипиридина (BODIPY). В данной работе показана возможность применения этих красителей для характеристики процессов, протекающих в свертывающей системе плазмы крови у лиц молодого возраста, пожилых людей, а также у пациентов с острым инфарктом миокарда. У пожилых людей, по сравнению с лицами молодого возраста, процесс свертывания крови начинается раньше, образование фибрина замедляется, снижается активность тромбина. Использование данной методики позволило выявить у пациентов с патологией сердца увеличение активности тромбина на фоне более высокой концентрации фибриногена. Это ведет к тому, что свертывание крови начинается позже и продолжается дольше. Полученные изменения показателей можно объяснить экстренным введением гепарина. Он, с одной стороны, препятствует увеличению тромба, с другой – уменьшает активность образования протромбиназного комплекса, что является полезным для пациента при инфаркте миокарда. Дальнейшее наблюдение за свертыванием крови говорит об изменении структуры самого фибрина, удлиняется время его стабилизации. Таким образом, результаты, полученные в ходе исследования, согласуются с данными литературы и представленный метод является применимым для изучения процесса коагуляции в физиологических исследованиях и клинической практике, а также может быть использован для кинетической оценки влияния антикоагулянтов на активность факторов гемостаза.

Ключевые слова: гемостаз, BODIPY, флуоресценция, инфаркт миокарда, гепарин

BODIPY FLUOROPHORES FOR EVALUATION OF COAGULATION HEMOSTASIS KINETIC IN PHYSIOLOGICAL STATES AND IN PATHOLOGY

E.L. Aleksakhina¹, A.S. Ivanova¹, O.A. Pakhrova¹, I.K. Tomilova¹, S.D. Usoltsev^{2,3}, Yu.S. Marfin^{2,3}

¹Ivanovo State Medical Academy, Sheremetevsky pr., 8, Ivanovo, Russian Federation, 153012

E-mail: alexakhina2013@yandex.ru, asivanova@mail.ru, o.pakhrova@bk.ru, tomilovaivanovo@mail.ru

²Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Sheremetevskiy av. 7, Ivanovo, Russian Federation, 153000

E-mail: sergeyusoltsev@isuct.ru

³Pacific National University, Tikhookeanskaya str. 136, Khabarovsk, Russian Federation, 680035

E-mail: marfin@pnu.edu.ru

Molecular sensors are new and rapidly developing tool in biochemical research. They allow to reveal mechanisms of biochemical reactions, as well as to promptly diagnose pathological conditions. Fluorescent dyes based on boron dipyrromethene complexes (BODIPY) are broadly used as molecular sensors. This study demonstrates possibility for characterization of processes occurring in the blood plasma coagulation system in both young and elderly age groups, including patients with acute myocardial infarction. In elderly people, compared with young people, the process of blood clotting starts earlier, the formation of fibrin slows down, the activity of thrombin decreases. This technique allows to recognize an increase in thrombin activity accompanied by a higher concentration of fibrinogen within patients with heart pathology. In this case, blood clotting begins later and lasts longer. The resulting changes in indicators can be explained by the emergency administration of heparin. On the one hand, it prevents the increase of a blood clot, on the other hand, it reduces the activity of the formation of a prothrombinase complex, which is useful for patients with myocardial infarction. Further observation of blood clotting indicates a change in the structure of fibrin itself, the time of its stabilization is lengthened. Thus, the results obtained during the study are consistent with the literature data. the presented method is applicable for both physiological studies of coagulation process and in clinical practice. This method can also be used for kinetic evaluation of the effect of anticoagulants on the activity of hemostasis factors.

Key words: hemostasis, BODIPY, fluorescence, myocardial infarction, heparin

Для цитирования:

Алексахина Е.Л., Иванова А.С., Пахрова О.А., Томилова И.К., Усольцев С.Д., Марфин Ю.С. Использование флуорофоров BODIPY для оценки кинетики коагуляционного гемостаза при физиологических состояниях и в патологии. *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва)*. 2023. Т. LXVII. № 3. С. 90–97. DOI: 10.6060/R CJ.2023673.13.

For citation:

Aleksakhina E.L., Ivanova A.S., Pakhrova O.A., Tomilova I.K., Usoltsev S.D., Marfin Yu.S. BODIPY fluorophores for evaluation of coagulation hemostasis kinetic in physiological states and in pathology. *Ros. Khim. Zh.* 2023. V. 67. N 3. P. 90–97. DOI: 10.6060/R CJ.2023673.13.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для биологических исследований активно используются методы молекулярной сенсорики и маркирования [1, 2]. Молекулярные сенсоры – соединения, флуоресцентные характеристики которых выражено и обратимо изменяются под влиянием различных внутри- и межмолекулярных взаимодействий. Среди этих веществ выделяются люминофоры, которые не теряют своих флуоресцентных свойств в широком диапазоне воздействующих, часто агрессивных, факторов – борфторидные комплексы дипиррина (BODIPY) [3]. Такая устойчивость позволяет использовать BODIPY не только для химических, но и биологических, фармакологических и медицинских исследований [4, 5]. Изменение структуры BODIPY путем введения заместителей и функциональных групп, которые способны избирательно реагировать на определенные ионы и молекулы, позволяет получить селективные флуоресцентные зонды для их качественного и количественного определения в биологических жидкостях [6, 7]. Существуют разные механизмы изменения интенсивности

флуоресценции под влиянием люминофоров: внутримолекулярный перенос заряда [8], перенос протона в возбужденном состоянии [9], фотоиндуцированный перенос электрона [10, 11], флуоресцентный резонансный перенос энергии [12], перенос энергии через связи [13]. В нашей лаборатории изучена чувствительность флуоресцентных характеристик BODIPY при изменении молекулярного окружения в плазме крови и доказана возможность использования бордипирринов для изучения процесса образования тромба [14]. Было проведено исследование ряда флуорофоров класса BODIPY и выбран флуорофор, обладающий селективностью к присутствию белков плазмы крови, а также демонстрирующий повышение интенсивности флуоресценции в их присутствии [15, 16]. Для изучения процесса образования фибринового сгустка использовали раствор плазмы крови с антикоагулянтом, содержащий данный флуорофор. После добавления активатора свертывания крови - хлорида кальция - наблюдалось увеличение величины поглощения раствора и уменьшение интенсивности флуоресценции красителя, свидетельствующие о процессе коагуляции плазмы крови. Эти изменения были объяснены резонансным переносом энергии

и изменением физико-химических свойств молекулярной среды в соответствии с теорией Штерна-Фольмера.

Процесс свертывания крови можно разделить на 3 этапа: образование протромбиназного комплекса при выделении тканевого тромбопластина или активации фактора Хагемана; перевод неактивного протромбина в активный тромбин с помощью протромбиназного комплекса; перевод неактивного фибриногена в активный фибрин с помощью тромбина, и дальнейшая полимеризация фибрина.

Известно, что система свертывания крови (система гемостаза), отвечающая за остановку кровотечения при повреждении кровеносных сосудов, является одной из жизненно важных и в то же время наиболее уязвимых систем человеческого организма [17]. Её нарушение является важным звеном патогенеза многих заболеваний. В распоряжении клиницистов имеется широкий арсенал средств оценки системного гемостаза как при геморрагических заболеваниях, так и при антитромботической терапии [18]. Традиционно, диагностика нарушений сводится к наблюдению за процессом свертывания фотометрическими методами (тест активированного частичного тромбопластинового времени, время рекальцификации, тест протромбинового времени и др.). Общие тесты определяют время до начала образования сгустка, но не отражают стадийность процесса и не дают истинного представления о механизмах нарушенной гемостаза.

В то же время методы, основанные на наблюдении за кинетикой процесса свертывания, активно развиваются. Например, существует метод количественного определения эндогенного тромбинового потенциала [19–21]. При этом для запуска свертывания в лунки флуориметра вносится буфер, содержащий флуорогенный субстрат. Образующийся тромбин расщепляет субстрат, в результате чего высвобождается молекула флуорофора. Использование флуорофоров для изучения динамики гемостаза представляет несомненный интерес, вследствие чувствительности метода, высокого временного разрешения фиксации отклика и возможности исследования в малом количестве биологического материала.

В настоящем исследовании ставится цель – изучить возможность использования молекулярных сенсоров класса BODIPY для кинетической характеристики процессов, протекающих в свертывающей системе плазмы крови у здоровых лю-

дей разного возраста и при тяжелой кардиоваскулярной патологии (в острый период инфаркта миокарда).

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве флуоресцентного сенсора применяли 4,4-дифторо-1,3,5,7-тетраметил-2,6-диэтилфенил-4-бор-3а,4а-диаза-индацен (рис. 1) полученный нами ранее по известной методике [14] в виде раствора в диметилсульфоксиде в концентрации 10^{-5} моль/л.

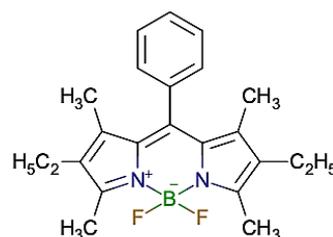


Рис.1. Структура BODIPY красителя 4,4-Дифторо-1,3,5,7-тетраметил-2,6-диэтилфенил-4-бор-3а,4а-диаза-индацен

Исследование проводилось *in vitro*, в качестве объекта использовали кровь, забор которой проводился из кубитальной вены в количестве 10 мл. Имеется разрешение локального Этического комитета ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России на проведение исследования (Протокол № 6 от 26.05.2021 г.). Все испытуемые были разделены на три группы: первую группу составили 16 здоровых доноров – студентов 18-20 лет мужского пола, обучающихся в Академии, вторую – 10 человек пожилого возраста 60-75 лет, не имеющие тяжелой кардиоваскулярной патологии и не принимающие препараты, влияющие на свертывание крови, третья группа включала 14 пациентов в возрасте 50-65 лет, доставленных машиной скорой медицинской помощи (СМП) в стационар с диагнозом острый инфаркт миокарда [22, 23]. Основным звеном патогенеза этого заболевания является образование тромба в коронарной артерии, который полностью закрывает ее просвет. Этим больным врачом СМП в соответствии со стандартом оказания медицинской помощи до приезда в стационар был введен гепарин – нефракционированный гепарин натрия («Биосинтез», Россия).

У испытуемых кровь из локтевой вены забирали в пробирку, в которой содержался 3,8% раствор натрия цитрата (9:1), перемешивали и центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Цитрат натрия является антикоагулянтом, он связывает ионы кальция (Ca^{2+}) крови, которые необходимы на всех этапах свертывания крови. Надосадочную

жидкость (бестромбоцитарную плазму) без следов гемолиза отбирали в другую пробирку и использовали для исследования. Проводилось изучение внутреннего механизма коагуляционного гемостаза, для запуска свертывания в кювету вносили в избытке Ca^{2+} в виде кальция хлорида («ХимМед», Россия).

Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне 500–900 нм на спектрофлуориметре SM-2203 («SOLAR», Беларусь), управляемом с персонального компьютера. Флуоресценцию возбуждали на длине волны 480 нм, ширина щелей возбуждения и фиксации испускания составляла 2,5 нм. Все эксперименты проводили в термостатируемой ячейке при температуре 37 °С с плазмой в концентрации 0,133 г/л. При более высокой концентрации плазмы происходит нежелательное динамическое тушение флуоресценции красителя [24]. Концентрация фибриногена определялась спектрофотометрическим методом на спектрофлуориметре SM-2203 («SOLAR», Беларусь), с помощью диагностического набора (ООО «Технология-Стандарт», Россия).

Графическое изображение процесса свертывания, полученное с помощью нашей методики, представлено на рис. 2. На кривой изменения интенсивности максимума флуоресценции оценивали следующие показатели.

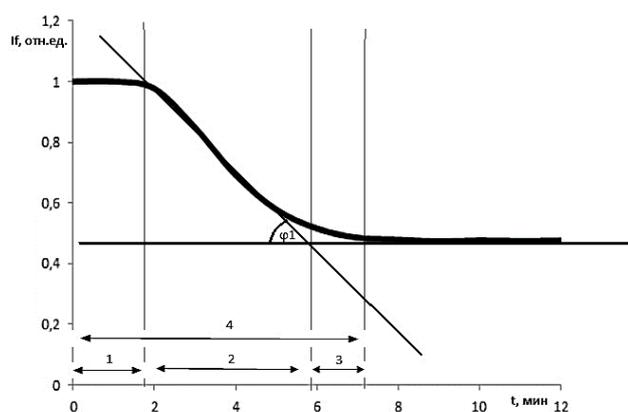


Рис. 2. Кинетика свертывания бестромбоцитарной плазмы здоровых доноров. Ось абсцисс – время (мин), ось ординат – интенсивность флуоресценции (относительные единицы)
1 – t_{lag} , 2 – $t_{образ. фибр.}$, 3 – $t_{стабил. фибр.}$, 4 – $t_{коагул.}$

- время активации t_{lag} (1) – время начала свертывания; скрытый период, когда не происходит изменений флуоресценции раствора, эта величина характеризует время образования протромбиназного комплекса;

- время образования фибрина $t_{образ. фибр.}$ (2) – соответствует ниспадающему участку кривой коагу-

ляции; здесь происходит гидролитическое расщепление фибриногена до фибрин-мономеров под влиянием образовавшегося тромбина и его полимеризация в фибрин-полимер;

- время стабилизации фибринового тромба $t_{стабил. фибр.}$ (3) – происходит латеральная агрегация протромбирилл и образование нерастворимого фибрин-полимера;

- время коагуляции $t_{коагул.}$ (4) – продолжительность процесса свертывания – время от начала t_{lag} до окончания стабилизации фибринового тромба;

- активность тромбина (прямо пропорциональна произведению $\text{tg}\phi_1$ и концентрации фибриногена в плазме (мкМоль/л) с учетом разведения в спектрофотометрической кювете, где $\text{tg}\phi_1$ – тангенс угла наклона касательной к ниспадающему участку кривой).

Время коагуляции в клинической практике эквивалентно времени рекальцификации плазмы.

Статистический анализ полученных данных проводили с применением программы «Statistika 6,0». Для сравнения величин использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали меньше 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исходном растворе плазмы крови исследуемый BODIPY по большей части локализован в гидрофобных доменах белков за счет неспецифических взаимодействий. Это приводит к высоким наблюдаемым величинам квантового выхода флуоресценции по двум основным причинам:

1. В гидрофобных карманах взаимодействие флуорофора в возбужденном состоянии с молекулами полярного растворителя минимально.

2. Исследованный краситель класса BODIPY с фенильным фрагментом в мезо-положении имеет склонность к проявлению эффекта молекулярного ротора – его квантовый выход флуоресценции выше в системах, где относительное вращение двух ароматических фрагментов ограничено [25].

Тушение флуоресценции BODIPY при протекании процесса тромбообразования, таким образом, в основном связано с уменьшением доступности гидрофобных доменов при потере белками плазмы крови нативной структуры.

Абсолютная величина изменения интенсивности флуоресценции во всех экспериментах имеет близкие значения, в то время как характер изменений во времени значительно различается в биологических образцах исследованных групп пациентов. При исследовании возрастных особенностей

протекания внутреннего механизма свертывания крови обнаружено, что у пожилых людей по сравнению со здоровыми студентами время активации достоверно снижено на 30% ($p < 0,05$), а время образования фибрина, напротив, увеличено на 60% ($p < 0,001$), остальные временные показатели коагуляции и концентрация фибриногена не имеют значимых отличий (табл. 1, рис. 3). Существенно снижены тангенс угла наклона ниспадающей части кривой на 36% ($p < 0,05$) и активность тромбина на 33% ($p < 0,05$).

Отличия в показателях коагуляционного гемостаза у здоровых испытуемых – студентов и пожилых людей можно объяснить возрастными изменениями системы гемостаза. Наши результаты свидетельствуют о более быстром запуске процесса свертывания, что повышает риск патологического тромбообразования. Более пологая кривая свертывания – об изменении баланса между компонентами свертывающей, противосвертывающей систем и системы фибринолиза по сравнению с молодыми людьми.

По данным литературы, в пожилом возрасте происходит нарастание содержания ряда

плазменных факторов. Результаты исследований противосвертывающей системы и системы фибринолиза противоречивы. В одних работах у пожилых людей было выявлено уменьшение концентрации естественных антикоагулянтов, по другим результатам – повышение концентрации гепарина [26,27]. Также увеличивается содержание ингибиторов фибринолиза $\alpha 1$ -антитрипсина и $\alpha 2$ -макроглобулина, и отмечается замедление этого процесса.

Было выявлено, что у людей старше 45 лет значительно повышается активность фибриназы, падает активность тромбопластического и фибринстабилизирующего фактора при неизменном уровне активатора плазминогена. По другим данным, при обследовании здоровых людей в возрасте от 20 до 94 лет, у 60-летних была обнаружена активация фибринолиза. В дальнейшем по мере старения скорость лизиса фибринового сгустка уменьшалась [28].

На втором этапе работы сравнивали показатели внутреннего механизма гемостаза пожилых людей (так как эта возрастная группа больше соответствует возрасту пациентов с ИМ) и больных, поступивших в стационар с острым инфарктом миокарда.

Таблица 1

Показатели внутреннего механизма коагуляционного гемостаза у студентов, пожилых людей и пациентов с острым инфарктом миокарда (Ме(Q1;Q3))

Показатель	Молодые люди (n=16)	Пожилые люди (n=10)	Пациенты с ИМ (n=14)
t lag, мин	2,00 (1,66;2,00)	1,00 (0,66;1,66)*	2,66 (2,00;3,66)#
t образования фибрина, мин	1,33 (1,33;1,33)	2,00 (2,00;2,33)*	2,33 (2,00;2,33)
t стабилизации фибрина, мин	0,66 (0,66;1,33)	1,00 (1,00;1,33)	1,33 (1,00;2,00)#
t коагуляции, мин	4,66 (4,66;5,66)	4,66 (4,00;5,00)	6,00 (5,33;7,00)#
Фибриноген, мкМ/л	8,529 (8,529;8,559)	8,735 (8,529;9,772)	14,765 (12,449;18,287)#
tg ϕ 1	0,371 (0,342;0,441)	0,270 (0,237;0,291)*	0,233 (0,205;0,260)#
A tr, мкМ/мин	0,495 (0,385;0,502)	0,308 (0,258;0,353)*	0,443 (0,366;0,535)#

Примечание: * - достоверные отличия показателей людей 2-й группы от 1-й группы; # - достоверные отличия показателей людей 3-й группы от 2-й группы ($p < 0,05$)

При анализе графика процесса коагуляции у пациентов с ИМ по сравнению с пожилыми людьми было выявлено увеличение времени активации на 115% ($p < 0,001$), увеличение времени коагуляции на 34% ($p < 0,001$) и увеличение времени стабилизации фибрина на 27% ($p < 0,05$). Отмечается уменьшение тангенса угла наклона касательной к ниспадающему участку кривой на 13% ($p < 0,05$). При этом у людей этой группы, по сравнению с показателями у здоровых пожилых, актив-

ность тромбина увеличена на 41% ($p < 0,003$) и значительно выше концентрация фибриногена - на 70% ($p < 0,001$).

Полученные изменения показателей можно объяснить экстренным введением нефракционированного гепарина. Он содержит смесь сульфатированных полисахаридов, которые связываются с эндогенным антикоагулянтом антитромбином III и вызывают конформационные изменения в молекуле, резко повышая ее активность. В результате значительно снижается активность протромбиназы,

что увеличивает время активации. Также блокируется ферментативная активность факторов свертывания крови II, IX, X, XI, XII [29]. Важным эффектом, по данным литературы, является ингибирование тромбина, что препятствует увеличению

тромба и является очень полезным в условиях гиперфибриногенемии [30,31]. Однако в нашем исследовании активность тромбина повышалась по сравнению с лицами 2-й группы, что можно объяснить недостаточной дозировкой гепарина для получения противосвертывающего эффекта.

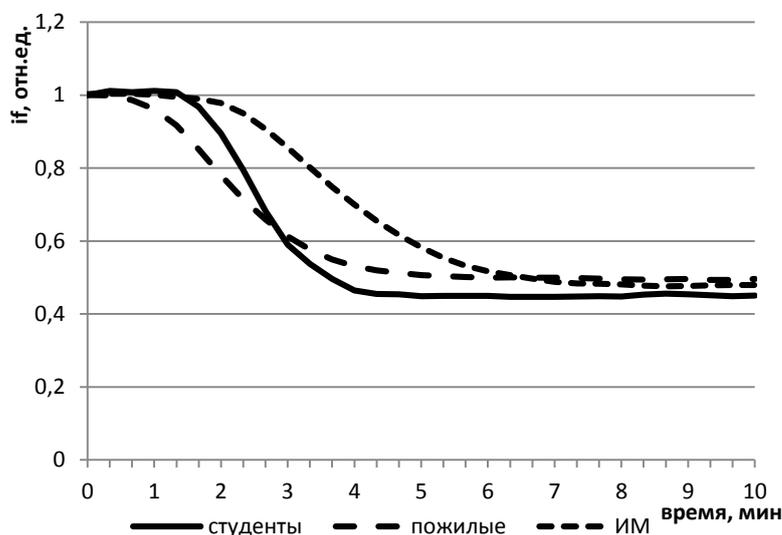


Рис. 3. Кинетика свертывания бестромбоцитарной плазмы студентов, пожилых людей и пациентов с инфарктом миокарда. Ось абсцисс – время (мин), ось ординат – интенсивность флуоресценции (относительные единицы)

ВЫВОДЫ

Таким образом, представленный метод является применимым для изучения кинетики процесса коагуляции в физиологических исследованиях и клинической практике, а также может быть использован для оценки влияния антикоагулянтов на активность факторов свертывания.

Работа является частью комплексного исследования по реализации государственного задания ФГБОУ ВО «ИвГМА» Минздрава России на 2023 год «Функциональный резерв гемостаза и реологии крови при гипоксических состояниях в

норме и патологии». Исследование флуоресцентных свойств BODIPY выполнено при финансовой поддержке РНФ (проект № 22-73-10167).

Исследования проведены с использованием ресурсов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИГХТУ (при поддержке Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-671).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

The authors declare the absence a conflict of interest warranting disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н., Матосова Е.В., Сомова Л.М. Биосенс. Тех. в Мед. 2020. Т. 12. № 6. С. 70–85. DOI: 10.17691/stm2020.12.6.09.
2. Escobedo J.O., Rusin O., Lim S., Strongin R.M. Curr. Opin. Chem. Biol. 2010. N 14. P. 64–70. DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.10.022.
3. Wong S., Du Y., Zhang J., Chen G. New J. Chem. 2020. V. 44. N 26. P. 11324–11329. DOI:10.1039/D0NJ01973A.
4. Sun W., Li M., Fan J., Peng X. Acc. Chem. Res. 2019. V. 52. N 10. P. 2818–2831. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00340.
5. Marfin Y.S., Solomonov A.V., Timin A.S., Rumyantsev E.V. Curr. Med. Chem. 2017. V. 24. N 25. P. 2745–2772. DOI: 10.2174/0929867324666170601092327.

REFERENCES

1. Andryukov B.G., Lyapun I.N., Matosova E.V., Somova L.M. Biosensornyye Tekhnologii v Meditsine. 2020. V. 12. N 6. P. 70–85. (In Russian). DOI: 10.17691/stm2020.12.6.09.
2. Escobedo J.O., Rusin O., Lim S., Strongin R.M. Curr. Opin. Chem. Biol. 2010. N 14. P. 64–70. DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.10.022.
3. Wong S., Du Y., Zhang J., Chen G. New J. Chem. 2020. V. 44. N 26. P. 11324–11329. DOI:10.1039/D0NJ01973A.
4. Sun W., Li M., Fan J., Peng X. Acc. Chem. Res. 2019. V. 52. N 10. P. 2818–2831. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00340.
5. Marfin Y.S., Solomonov A.V., Timin A.S., Rumyantsev E.V. Curr. Med. Chem. 2017. V. 24. N 25. P. 2745–2772. DOI: 10.2174/0929867324666170601092327.

6. Solomonov A.V., Marfin Y.S., Rumyantsev E.V. Dye. Pigment. 2019. V. 62. P. 517–542. DOI: 10.1016/j.dyepig.2018.10.042.
7. Lee M.H., Kim J.S., Sessler J.L., Sicking W., Piantanida Yi T. Chem. Soc. Rev. 2015. V. 44. N 13. P. 4185–4191. DOI: 10.1039/c4cs00280f.
8. Bhat H.R., Jha P.C. Chem. Phys. Lett. 2017. V. 669. P. 9–16. DOI: 10.1016/j.cplett.2016.12.025.
9. Mallah R., Sreenath M.C., Chitrabalam S., Joe I.H., Sekar N. Opt. Mater. (Amst). 2018. V. 84. P. 795–806. DOI: 10.1016/j.optmat.2018.08.007.
10. Sevinc G., Ozgur M., Kucukoz B., Karatay A., Aslan H., Yilmaz H. J. Lumin. 2019. V. 211. N 5. P. 334–340. DOI: 10.1016/J.JLUMIN.2019.03.058.
11. Marfin Y.S., Shipalova M.V., Kurzin V.O., Ksenofontova K.V., Solomonov A.V., Rumyantsev E.V. J. Fluoresc. 2016. V. 26. N 6. P. 2105–2112. DOI: 10.1007/s10895-016-1905-1.
12. Maity P., Gayathri T., Singh S.P., Ghosh H.N. Chem. - An Asian J. 2019. V. 14. N 4. P. 597–605. DOI: 10.1002/asia.201801688.
13. Huang C., Qian Y. Chemistry Select. 2019. V. 4. N 7. P. 2205–2210. DOI: 10.1002/slct.201803843.
14. Marfin Y.S., Aleksakhina E.L., Merkushev D.A., Rumyantsev E.V., Tomilova I.K. J. Fluoresc. 2016. V. 26. N 1. P. 255–261. DOI: 10.1007/s10895-015-1707-x.
15. Алексахина Е.Л., Марфин Ю.С., Меркушев Д.А., Томилова И.К., Румянцев Е.В. Казан. Мед. Журн. 2015. Т. 96. № 5. С. 792–798. DOI: 10.17750/KMJ2015-792.
16. Алексахина Е.Л., Пахрова О.А., Томилова И.К., Меркушев Д.А., Молчанов Е.Е., Усольцев С.Д., Водянова О.С., Марфин Ю.С. Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2021. Т. 64. Вып. 3. С. 13–23. DOI: 10.6060/ivkkt.20216403.6355.
17. Атауллаханов Ф.И., Румянцев А.Г. Рос. Ж. Дет. Гематол. и Онкол. 2018. Т. 5. № 3. С. 13–22. DOI: 10.17650/2311-1267-2018-5-3-13-22.
18. Алексахина Е.Л., Иванова А.С., Пахрова О.А., Смирнов Н.Н. Российский химический журнал. 2023. Т. 67. № 1. С. 28–34. DOI: 10.6060/rcj.2023671.4.
19. Weihs F., Peh A., Dacres H. Analytica Chimica Acta. 2020. V. 1102. N 2. P. 99–108. DOI: 10.1016/j.aca.2019.12.044.
20. Наместников Ю.А. Гематол. И Трансфузиол. 2010. Т. 55. № 2. С. 32–39.
21. Мельничникова О.С., Жиленкова Ю.И., Золотова Е.А., Пищухов К.А., Сироткина О.В., Симакова М.А., Вавилова Т.В. Рос. Ж. Персонал. Мед. 2022. Т. 2. № 3. С. 119–128. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-119-128.
22. Якушин С.С., Никулина Н.Н., Селезнев С.В. Инфаркт миокарда. - М.: ГЭОТАР-Медиа. 2019. 240 с.
23. Яковлев А.Н. Мед. Сов. 2010. №5–6. С. 64–67.
24. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd ed. US. 2006. 980 p.
25. Ying-Yi Wu, Wan-Ting Yu, Tai-Cheng Hou, Tao-Kai Liu, Chi-Ling Huang, I-Chia Chen, Kui-Thong Tan. Chem Commun (Camb). 2014. V. 50. N 78. P. 11507-10. DOI: 10.1039/c4cc04236k.
26. Крюков Е.В., Паневин Т.С., Попова Л.В. Клиническая медицина. 2020. Т. 98. №1. С. 9–12. DOI: 10.34651/0023-2149-2020-98-1-9-12.
6. Solomonov A.V., Marfin Y.S., Rumyantsev E.V. Dye. Pigment. 2019. V. 62. P. 517–542. DOI: 10.1016/j.dyepig.2018.10.042.
7. Lee M.H., Kim J.S., Sessler J.L., Sicking W., Piantanida Yi T. Chem. Soc. Rev. 2015. V. 44. N 13. P. 4185–4191. DOI: 10.1039/c4cs00280f.
8. Bhat H.R., Jha P.C. Chem. Phys. Lett. 2017. V. 669. P. 9–16. DOI: 10.1016/j.cplett.2016.12.025.
9. Mallah R., Sreenath M.C., Chitrabalam S., Joe I.H., Sekar N. Opt. Mater. (Amst). 2018. V. 84. P. 795–806. DOI: 10.1016/j.optmat.2018.08.007.
10. Sevinc G., Ozgur M., Kucukoz B., Karatay A., Aslan H., Yilmaz H. J. Lumin. 2019. V. 211. N 5. P. 334–340. DOI: 10.1016/J.JLUMIN.2019.03.058.
11. Marfin Y.S., Shipalova M.V., Kurzin V.O., Ksenofontova K.V., Solomonov A.V., Rumyantsev E.V. J. Fluoresc. 2016. V. 26. N 6. P. 2105–2112. DOI: 10.1007/s10895-016-1905-1.
12. Maity P., Gayathri T., Singh S.P., Ghosh H.N. Chem. - An Asian J. 2019. V. 14. N 4. P. 597–605. DOI: 10.1002/asia.201801688.
13. Huang C., Qian Y. Chemistry Select. 2019. V. 4. N 7. P. 2205–2210. DOI: 10.1002/slct.201803843.
14. Marfin Y.S., Aleksakhina E.L., Merkushev D.A., Rumyantsev E.V., Tomilova I.K. J. Fluoresc. 2016. V. 26. N 1. P. 255–261. DOI: 10.1007/s10895-015-1707-x.
15. Aleksakhina E.L., Marfin Yu.S., Merkushev D.A., Tomilova I.K., Rumyantsev E.V. Kazan. Med. Zhurn. 2015. V.96. N 5. P. 792–798. (In Russian). DOI: 10.17750/KMJ2015-792.
16. Aleksakhina E.L., Pakhrova O.A., Tomilova I.K., Merkushev D.A., Molchanov E.E., Usoltsev S.D., Vodianova O.S., Marfin Yu.S. ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]. 2021. V. 64. N 3. P. 13–23 (in Russian). DOI: 10.6060/ivkkt.20216403.6355.
17. Ataulkhanov F.I., Rumyantsev A.G. Rossiyskiy Zhurnal Detskoy Gematologii Onkologii. 2018. V. 5. N 3. P. 13–22. (In Russian). DOI: 10.17650/2311-1267-2018-5-3-13-22.
18. Aleksakhina E.L., Ivanova A.S., Pakhrova O.A., Smirnov N.N. Rossiyskiy himicheskij zhurnal. 2023. V. 67. N 1. P. 28–34. (In Russian). DOI: 10.6060/rcj.2023671.4.
19. Weihs F., Peh A., Dacres H. Analytica Chimica Acta. 2020. V. 1102. N 2. P. 99–108. DOI: 10.1016/j.aca.2019.12.044.
20. Namestnikov Yu.A. Gematologiya I transfuziologiya. 2010. V. 55. N 2. P. 32–39. (In Russian).
21. Melnichnikova O.S., Zhilenkova Yu.I., Zolotova E.A., Pishchulov K.A., Sirotkina O.V., Simakova M.A., Vavilova T.V. Rossiyskiy Zhurnal Personalizirovannoy Meditsiny. 2022. V. 2. N 3. P. 119–128. (In Russian). DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-119-128.
22. Yakushin S.S., Nikulina N.N., Seleznev S.V. Myocardial infarction. - М.: GEOTAR-Media. 2019. 240 p. (In Russian).
23. Yakovlev A.N. Meditsinskiysovet. 2010. N 5–6. P. 64–67. (In Russian).
24. Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd ed. US. 2006. 980 p.
25. Ying-Yi Wu, Wan-Ting Yu, Tai-Cheng Hou, Tao-Kai Liu, Chi-Ling Huang, I-Chia Chen, Kui-Thong Tan. Chem Commun (Camb). 2014. V. 50. N 78. P. 11507-10. DOI: 10.1039/c4cc04236k.

27. Спицина С.С., Шилова Л.Н., Трофименко А.С., Бедина С.А., Мозговая Е.Э. *Клин. Геронтол.* 2021. Т. 27. № 5–6. С. 21–23. DOI: 10.26347/1607-2499202105-06021-023.
28. Момот А.П., Баркаган З.С. *Клин. Геронтол.* 2007. №. 4. С. 44–49.
29. Hodulik K.L., Root A.G., Ledbetter L.S., Onwuemene O.A. *Transfusion.* 2019. V. 59. N 5. P. 1870–1879. DOI: 10.1111/trf.15191.
30. Барбараиш О.Л., Капиталан В.В. *Российский кардиологический журнал.* 2018. Т. 23. № 10. С. 127–135. DOI: 10.15829/1560-4071-2018-10-127-135.
31. Агарков Н.М., Макконен К.Ф., Титов А.А., Митихина М.С., Колпина Л.В. *Артериальная гипертензия.* 2022. Т. 28. № 3. С. 280–288. DOI: 10.18705/1607-419X-2022-28-3-280-288.
26. Kryukov E.V., Panevin T.S., Popova L.V. *Klinicheskaya meditsina.* 2020. V. 98. N 1. P. 9–12. (In Russian). DOI:10.34651/0023-2149-2020-98-1-9-12.
27. Spitsina S.S., Shilova L.N., Trofimenko A.S., Bedina S.A., Mozgovaya E. *Klinicheskaya gerontologiya.* 2021. V. 27. N 5–6. P. 21–23. (In Russian). DOI: 10.26347/1607-2499202105-06021-023.
28. Momot A.P., Barkagan Z.S. *Klinicheskaya gerontologiya.* 2007. N. 4. P. 44–49. (In Russian).
29. Hodulik K.L., Root A.G., Ledbetter L.S., Onwuemene O.A. *Transfusion.* 2019. V. 59. N 5. P. 1870–1879. (In Russian). DOI: 10.1111/trf.15191.
30. Barbarash O.L., Kashtalap V.V. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal.* 2018. V. 23. N 10. P. 127–135. (In Russian). DOI: 10.15829/1560-4071-2018-10-127-135.
31. Agarkov N.M., Makkonen K.F., Titov A.A., Mitikhina M.S., Kolpina L.V. *Arterial'naya gipertenziya.* 2022. V. 28. N 3. P. 280–288. (In Russian). DOI: 10.18705/1607-419X-2022-28-3-280-288.

Поступила в редакцию 13.07.2023
Принята к опубликованию 23.10.2023

Received 13.07.2023
Accepted 23.10.2023