

ГИПОТЕЗА: ЧТО МОГУТ ОЗНАЧАТЬ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СДВИГИ ЭЛЕКТРОГЕННЫХ МЕТАЛЛОВ В ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ НА ФОНЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ГО/НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА?

В.И. ПЕТУХОВ*, Л.Х. БАУМАНЕ**, Е.В. ДМИТРИЕВ***, А.Ф. ВАНИН****

**Балтийский институт психологии, Рига, Латвия, LV-1003, тел.: (+371) 67100608, факс: (+371) 67100219; e-mail: vip-val@yandex.ru*

***Латвийский институт органического синтеза, Рига, Латвия*

****Институт вычислительной математики РАН, Москва, Россия*

*****Институт химической физики им. Н.Н.Семёнова РАН, Москва, Россия*

Аннотация. В статье приводятся результаты исследования металло-лигандного гомеостаза в клетках эпидермиса у 954 ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС и 947 практически здоровых лиц с помощью атомно-эмиссионной спектрометрии и ЭПР-анализа. Особый интерес вызвала возможная связь редокс-статуса с количественными сдвигами в металло-лигандном гомеостазе, которые можно было бы использовать в качестве дискриминаторов окислительного/нитрозативного стресса. Отличительные признаки последнего, которые касались, главным образом, электрогенных металлов (Ca, K, Na), были обнаружены не только среди ликвидаторов аварии, но и у некоторых практически здоровых лиц, что может свидетельствовать о наличии у них окислительного/нитрозативного стресса не лучевой природы.

Выявленная связь внутриклеточной продукции оксида азота (NO) с количественными сдвигами электрогенных металлов может указывать на возможное участие NO в генерации электрического потенциала клетки. Более того, изменения электрического потенциала на фоне окислительного/нитрозативного стресса, вызванные концентрационными сдвигами ионов электрогенных металлов (и в первую очередь Ca^{2+}), могут, по мнению авторов, носить колебательный характер. Это объясняется тем, что NO, ионы Fe^{2+} и низкомолекулярные тиолы способны образовывать самоподдерживающуюся, саморегулирующуюся химическую систему, в которой непрерывно возникают S-нитрозотиолы и динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами. Их взаимопревращение обеспечивает колебательное изменение уровня этих соединений и сопутствующее этому процессу периодические колебания содержания NO, NO^+ (по типу реакции Белоусова-Жаботинского).

Ключевые слова: оксид азота, металло-лигандный гомеостаз, редокс-статус, эпидермис.

HYPOTHESIS: WHAT MEAN QUANTITATIVE SHIFTS OF ELECTROGENIC METALS IN EPIDERMAL CELLS IN THE SETTING OF OXIDATIVE/NITROSATIVE STRESS?

V.I. PETUKHOV*, L.K. BAUMANE**, E.V. DMITRIEV***, A.F. VANIN****

**Baltic Institute of Psychology Riga, Latvia; LV-1003, tel.: (+371) 67100608; fax: (+371) 67100219; e-mail: vip-val@yandex.ru*

***Latvian Institute of Organic Synthesis, Riga, Latvia*

****Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*****A.Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Abstract. The article presents the results of the study of metal-ligand homeostasis (MLH) in the cells of the epidermis at 954 liquidators of accident at Chernobyl NPP and 947 practically healthy persons by means of atomic-emission spectrometry and EPR-analysis. Possible connection of redox status with the quantitative shifts in MLH is caused special interest. MLH can be used as discrimination of oxidation/nitrosative stress. Distinctive features of nitrosative stress concerned electrogenic metals (Ca, K, Na) and were found not only among the liquidators of the accident, but some of practically healthy persons. This may indicates the presence in these persons oxidation/nitrosative stress non-radiation nature. Revealed correlation of intracellular production of nitric oxide (NO) with quantitative shifts of electrogenic metals can testify to possible involvement of NO in the generation of electric potential (EP) of cell. Changes of EP on the background of oxidative/nitrosating stress were caused by the concentration shifts of electrogenic metals ions (primarily Ca^{2+}), can, according to the authors, to wear an oscillatory character. The authors explain this by the fact that NO, Fe^{2+} ions and low-molecular thiols are able to form self-sustaining, self-regulating of chemical system, in which the S-nitrosothiols and dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands appear continuously. Their mutual transformation provides vibrating level change of these compounds and is related to this process periodic oscillations of contents NO, NO^+ (by type of reaction Belousov-Zhabotinsky).

Key words: nitric oxide, metal-ligand homeostasis, redox status, epidermis.

В последние годы для определения элементного статуса человека приобрёл популярность метод количественной спектрометрии такого биосубстрата, как волосы. Пригодность для проведения массовых исследований, неинвазивный способ забора проб, возможность длительного хранения образцов в обычных условиях, удобство и простота их транспортировки – всё это не могло не привлечь внимание исследователей. Однако в появившихся публикациях на эту тему элементный состав волос выступает как некий интегральный критерий обеспеченности минералами всего организма, что выглядит спорным и требует специального обсуждения. Во-первых, концентрационные значения химических элементов (не только металлов), содержащихся в волосах, имеют, по данным атомно-эмиссионной спектрометрии, выраженный индивидуальный разброс: коэффициент вариации (CV) в среднем $125,5 \pm 17,5\%$ [1]. Уже сам этот факт наводит на мысль, что причиной наблюдаемых сдвигов может быть отнюдь не «гипо- или гиперэлементоз», а *перераспределение* химических элементов с участием внутри- и экстраклеточных регуляторов трансмембранного трафика минералов, практически не влияющего на элементный состав организма в целом. Во-вторых, в диагностике нарушений *металло-лигандного гомеостаза* (МЛГ) на уровне всего организма оценка элементного статуса кожи и её придатков (как части выделительной системы) требует осторожности. Последняя необходима и во всех других случаях, когда объектом исследования оказываются продукты выделения (например, моча). Неоднозначность трактовки результатов элементного анализа по биосубстратам выделительной системы (пот, моча, выдыхаемый воздух, эпидермис и его дериваты) может возникнуть при сбоях в работе систем по «удерживанию» в организме эссенциальных металлов (например, гемового Fe). Как известно, небольшая по размеру молекула свободного (несвязанного) гемоглобина способна легко пройти через почечный фильтр и оказаться в моче (гемоглиноурия). Однако в норме это не происходит, из-за связывания гемоглобина молекулой транспортного белка – гаптоглобина. Образовавшийся комплекс «гемоглобин-гаптоглобин», в силу своих размеров, уже не может пройти через поры базальной мембраны, сохраняя тем самым гемовый пул железа для ресинтеза гемсодержащих белков.

При хроническом (и зачастую латентном) гемолизе железо гемоглобина может выделяться с мочой в виде гемосидерина (свинцовая, интоксикация, болезнь Маркиафавы-Микели), но будет ли это свидетельством повышенного уровня Fe в организме? Разумеется, нет. Скорее, можно говорить неизбежном снижении (из-за постоянной гемосидеринурии) общего пула железа.

Примеры такого рода можно привести и в отношении других металлов. Однако, означает ли это, что волосы – не слишком «надёжный» субстрат для оценки МЛГ? И хотя для однозначного и аргументированного ответа на этот вопрос требуется время и дальнейшие исследования, отказываться на этом основании от такого способа оценки МЛГ вряд ли обоснованно.

Если быть объективным, то проблема здесь не в «доверии» к биосубстрату, а в неоправданности экстраполяции данных микроэлементного анализа волос на весь организм. Другими словами, претензии не к субстрату, а к трактовке изменений МЛГ в клетках эпидермиса, регистрируемых с помощью спектрометрии.

Существует множество факторов, которые можно рассматривать в качестве наиболее вероятных причин количественных сдвигов в МЛГ. Их отличительная черта – способность активировать или деактивировать (вплоть до полной блокады) ионные каналы – водные поры трансмембранных белков, ведающих трафиком металлов. В зависимости от способа активации, эти каналы делят на механочувствительные, потенциал-активируемые и лиганд-активируемые. Активация лиганд-активируемых каналов может происходить за счёт редокс-модификации тиоловых групп цистеина в молекуле белков-транспортёров. К числу последних относится суперсемейство АТРАЗ Р-типа (P-type), осуществляющих трафик не только электрогенных (Ca, Na, K), но и тяжёлых металлов (Cd, Zn, Pb, Cu, Co, Ag) [4-6].

Активные формы кислорода (АФК) и *азота* (АФА), постоянно образующиеся в клетке: *супероксид анион-радикал* ($O_2^{\cdot-}$), *нитроксид* (NO), *пероксинитрит* ($NOOO^{\cdot-}$), выполняют функцию редокс-модификаторов цистеиновых остатков в молекуле мембранных насосов (окисление с образованием дисульфидных связей, S-нитрозилирование). При этом нельзя исключить, что увеличение продукции $O_2^{\cdot-}$ и NO (окислительный/нитрозативный стресс), может приводить к ещё большей активации АТРАЗ Р-типа (возможно, за счёт вовлечения в процесс трансмембранного переноса большего числа белковых молекул и/или участия в качестве редокс-модификаторов более агрессивных АФА). Поэтому в условиях окислительного/нитрозативного стресса мы вправе ожидать количественные сдвиги внутриклеточных концентраций не только электрогенных, но и тяжёлых металлов (транспорт последних реализует $P_{1B-type}$ -помпа из суперсемейства АТРАЗ).

Оправданность подобных ожиданий можно подтвердить (или отвергнуть), исследуя МЛГ на фоне окислительного/нитрозативного стресса, например, у ликвидаторов Чернобыльской аварии. Как показывает опыт, основным отличительным признаком биохимических процессов в организме «чернобыльцев» является повышенная, по сравнению с нормой, активность кислородных [10] и азотных [2] радикалов или хронический окислительный/нитрозативный стресс, который может иметь непосредственное отношение к событиям в МЛГ.

Используя метод количественной ЭПР-спектроскопии с применением *in vitro* комплекса Fe^{2+} с *диэтилдитиокарбаматом* (ДЭТК) в качестве спиновой «ловушки» NO, образующей с ним парамагнитные моонитрозильные комплексы железа с ДЭТК (МНКЖ-ДЭТК), нам удалось оценить уровень NO и комплексов Fe^{3+} (сигнал ЭПР $g=4,3$) в таком биосубстрате, как дериват эпидермиса (волосы) [2]. При этом уровни NO и комплексов Fe^{3+} (сигнал ЭПР $g=4,3$) в деривате эпидермиса, оценённые методом ЭПР, у ликвидаторов

аварии ($n=45$) достоверно ($p<0,05$) превышали нормальные значения ($25,9\pm 1,8$ vs $20,7\pm 2,5$ и $0,11\pm 0,01$ vs $0,07\pm 0,004$ resp.). Более высокий, по сравнению с нормой, уровень не только NO, определяемый по количеству МНКЖ-ДЭТК, но и комплексов Fe^{3+} ($g=4,3$) у чернобыльцев даёт основание рассматривать оба эти показателя в качестве дискриминаторов нитрозативного стресса.

В Центре Биотической Медицины (г. Москва) методом атомно-эмиссионной спектроскопии на приборе Optima 2000 DV был сделан анализ минерального состава волос у 947 здоровых лиц (238 мужчин и 709 женщин в возрасте от 2 до 86 лет) и 954 ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС – жителей Москвы (213 женщин и 741 мужчина в возрасте от 37 до 82 лет) [15]. Проверку гипотезы о нормальном распределении мы проводили с помощью теста Jarque-Bera [7] и теста Kolmogorov-Smirnov [13]. В результате этой проверки удалось с большой вероятностью опровергнуть гипотезу о нормальном распределении химических элементов [1]. Поэтому применялись альтернативные подходы (*bootstrap methods*), не требующие нормального распределения априорного ансамбля [8]. При выявлении возможных половых различий в минеральном составе волос обнаружено, что содержание кальция (Ca) зависело от пола. Поэтому концентрационные значения Ca регистрировали отдельно для мужчин и женщин.

Кроме того, в генеральных совокупностях данных спектроскопии у чернобыльцев ($n=954$) и здоровых лиц ($n=947$) определяли тесноту линейной связи по коэффициенту r (Pearson) между концентрационными значениями калия (K) и цинка (Zn). В результате был выявлен ещё один критерий отличия: у чернобыльцев r_{K-Zn} ($-0,42$; $p<0,05$) оказался в полтора раза выше, чем у здоровых ($r_{K-Zn} = -0,28$; $p<0,05$).

Чтобы выяснить, насколько однородны исследуемые группы по значению r_{K-Zn} , использовали предложенную нами ранее методику селективного отбора лиц с максимальным и близким к нулю значениями коэффициента r из общей совокупности [3].

Оказалось, что у абсолютного большинства ликвидаторов аварии (88%) K-Zn корреляция была негативной и значимой (у 205 чел. $r_{K-Zn} = -0,62$; $p<0,05$; у 634 чел. $r_{K-Zn} = -0,41$; $p<0,05$). У 12% чернобыльцев (115 чел.) она не выявлялась ($r = -0,03$). K-Zn связь отсутствовала ($r = -0,01$) у 253 здоровых лиц (26,7%), у 523 чел. (55,2%) была слабо выраженной ($r_{K-Zn} = -0,22$; $p<0,05$) и отчётливо выявлялась ($r_{K-Zn} = -0,43$; $p<0,05$) лишь у 171 чел. (18,1%).

Показательно, что выраженная позитивная корреляция между K и Na, которая для всей группы здоровых ($n=947$) составляла ($r_{K-Na} = 0,64$), практически не менялась (0,64; 0,71; 0,53; resp.) при разных r_{K-Zn} . Это может объясняться стабильной (без сбоев) работой мембранного K/Na-насоса у здоровых лиц. Столь же тесной ($r = 0,64-0,75$) K-Na связь была у абсолютного большинства ликвидаторов аварии (в общей группе $r_{K-Na} = 0,71$), но заметно слабее в подгруппе с $r_{K-Zn} = -0,03$ ($r_{K-Na} = 0,31$).

Концентрационные значения для Zn и электрогенных металлов (K, Na, Ca) в эпидермисе ликвидаторов аварии имели достоверные ($p<0,05$) различия с контрольной группой и составляли у чернобыльцев: Zn=162,5<**165,8**<169; K=365,8<**394,8**<422,4; Na=757,5<**822,3**<892,4; Ca_(жен) = 832,0<**927,4**<1032,8. У здоровых лиц: Zn=181,5<**185,2**<189,3; K=277,4<**317,7**<361,1; Na=427,9<**480,9**<542,9; Ca_(жен)=1348,1<**1439,6**<1528,4 (жирным шрифтом обозначена величина средней (M) в мкг/г, обычным – границы доверительных интервалов – *bootstrap-method*).

Анализ МЛГ электрогенных металлов и цинка в эпидермальных клетках у здоровых лиц при крайних значениях r_{K-Zn} ($-0,01$ и $-0,43$) показал, что сдвиги в МЛГ у здоровых с $r_{K-Zn} = -0,43$, по сравнению с $r_{K-Zn} = -0,01$, по своей направленности, а в ряде случаев и по величине, аналогичны таковым в общей группе ликвидаторов аварии ($n=954$), если сравнивать их с общей контрольной группой ($n=947$). Вывод, который кажется очевидным, хотя и требует проверки, это – наличие у здоровых лиц с $r_{K-Zn} = -0,43$ окислительно-нитрозативного стресса не лучевой природы.

Подобные изменения концентрационных значений электрогенных металлов и цинка в зависимости от величины $|r_{K-Zn}|$ были обнаружены и у ликвидаторов аварии.

Если теснота негативной K-Zn связи на фоне окислительно-нитрозативного стресса действительно отражает активность суперсемейства мембранных АТРАЗ (на что косвенно могут указывать результаты спектроскопии), то обнаруженная «чувствительность» электрогенных металлов к повышенной продукции АФК и АФА, которая, наряду с ростом $|r_{K-Zn}|$, сопровождается заметными сдвигами внутриклеточного уровня Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , должна с неизбежностью приводить к изменениям *электрического потенциала* (ЭП) клетки.

Более того, есть основание предполагать, что эти изменения могут иметь колебательный характер, обусловленный циклической вариацией уровня NO и ионов нитрозония (NO^+) в клетках и тканях. Как было показано в [17], NO, ионы Fe^{2+} и низкомолекулярные тиолы способны образовывать самоподдерживающуюся, саморегулирующуюся химическую систему, в которой непрерывно возникают S-нитрозотиолы и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиол-содержащими лигандами. Их взаимопревращение обеспечивает колебательное изменение уровня этих соединений и сопутствующее этому процессу периодические колебания содержания NO, NO^+ , двухвалентного железа и тиолов, не входящих в S-нитрозотиолы (ДНКЖ), по типу реакции Белоусова-Жаботинского. Циклическое изменение уровня ионов нитрозония, способного S-нитрозировать тиолы [9], может синхронно (в колебательном режиме) изменять активность мембранных АТРАЗ, содержащих тиоловые группы, и тем самым вызывать осцилляцию уровня электрогенных металлов и связанные с этой осцилляцией изменения ЭП клеток и тканей.

Таким образом, значение NO^+ -продуцирующей системы оказывается существенным образом расширено. И в первую очередь это касается тех клеток, основная функция которых непосредственно связана с генерацией ЭП (нейроны, пейсмейкеры синусного узла, кардиомиоциты, миоциты кровеносных сосудов и кишечника и др.).

Современное представление о природе сердечного автоматизма основано на вероятном существовании в клетках-пейсмейкерах и кардиомиоцитах двух синхронно работающих осцилляторов ЭП: в мембране саркоплазматического ретикулума (СР) – «кальциевые часы» и в наружной мембране – «мембранные часы». При этом трансмембранные перемещения Ca^{2+} , вызывающие изменения ЭП, происходят при активном участии АТР-зависимых кальциевых насосов, работающих, по мнению исследователей, в автоматическом режиме [12, 14]. Роль пейсмейкера в этом процессе отводится «кальциевым часам», взаимоотношения которых с «мембранными часами» строятся по принципу подчинения. Один из аргументов в пользу такого распределения ролей основан на том, что полное выключение «мембранных часов» не влияет на работу «кальциевых часов» [11], в то время как остановка последних означает и прекращение функционирования «мембранных часов», которые удавалось вновь «запустить» дополнительным количеством Ca^{2+} [18].

Обнаруженные с помощью конфокальной микроскопии «кальциевые спарки» (локальное и периодическое повышение концентрации Ca^{2+} в разных участках миоплазмы кардиомиоцита) трактуются как наглядная иллюстрация работы «кальциевых часов». А совпадающее с Ca^{2+} циклическое изменение уровня NO в миокарде во время его сокращений связывают с колебаниями уровня Ca^{2+} в миоплазме [16].

Несмотря на определённую логику таких рассуждений, трудно отделаться от сомнений в правильности выбора «водителя ритма» в системе осцилляторов: «*NO-осциллятор*» → «*кальциевые часы*» → «*мембранные часы*», где «кальциевые часы» – в роли пейсмейкера (?).

События в клетках эпидермиса на фоне окислительного/нитрозативного стресса, когда изменения содержания электрогенных металлов (в том числе и Са) выглядят, скорее, следствием, нежели причиной прооксидантных сдвигов, делают оправданным (в качестве «водителя ритма» среди указанных осцилляторов) выбор NO^+ , генерируемого в режиме автокатализа. К такому выводу склоняет и повсеместная распространённость (универсальность) автоколебательной системы $\text{RS-NO} \leftrightarrow \text{ДНКЖ}$, которую (в отличие от саркоплазматического ретикулума) можно обнаружить практически во всех клетках.

Почему так важно сделать правильный выбор «водителя ритма» при одновременном функционировании нескольких осцилляторов?

Дело в том, что цикличность – неотъемлемое свойство всех природных явлений. Однако в живых системах особое значение приобретает не столько само существование циклических процессов (которых уже довольно много обнаружено, в том числе, среди химических взаимодействий), сколько организация этих процессов во времени и пространстве, их способность к синхронизации и саморегулированию. От «правильной» работы одного или нескольких осцилляторов, объединённых по принципу подчинения в автоколебательную систему, а также от синхронного взаимодействия множества автоколебательных систем зависит нормальное функционирование клеток и организма в целом. На примере осцилляторных систем сердца, подчинённость которых образует следующую последовательность: *миоциты синусного узла (водитель ритма)* → *миоциты предсердий* → *миоциты желудочков*, легко убедиться, как достоверное представление о взаимоотношениях этих осцилляторов упрощает диагностику нарушений их синхронной работы.

Разумеется, сердце не единственный орган, который в автоматическом режиме может генерировать потенциал действия. Такой способностью обладает большинство полых внутренних органов, имеющих мышечную стенку. Подтверждением этому может служить наличие в этих органах независимой (метасимпатической) нервной системы, которая обеспечивает реализацию потенциала действия и без «командного регулирования» со стороны *n. vagus* и симпатических нервов.

В заключение хотелось бы добавить следующее. Известно, что живая клетка (независимо от тканевой принадлежности) генерирует ЭП (*Z*-потенциал). Однако, обнаружить ритмический (осцилляторный) характер ЭП (как, например, в нейронах головного мозга, кардиомиоцитах или в скелетных мышцах) технически не всегда возможно. Если же предположить, что при синхронном взаимодействии множества осцилляторов, задействованных в генерации ЭП, роль *параметра порядка* принадлежит автоколебательной системе $\text{RS-NO} \leftrightarrow \text{ДНКЖ}$, то осцилляторный характер производимого клеткой ЭП должен обладать универсальностью и распространяться на все клеточные категории.

Литература

1. Петухов В.И., Дмитриев Е.В., Шкестерс А.П., Скальный А.В. Проблемы интегральной оценки элементного статуса человека по данным спектрометрии волос // Микрорезультаты в медицине. 2006. Т. 7. №4. С. 7–14.
2. Петухов В.И., Баумане Л.Х., Рестэ Е.Д., Звагуле Т.Я., Романова М.А., Шушкевич Н.И., Сушкова Л.Т., Скавронский С.В., Щуков А.Н. Диагностика нитрозативного стресса с помощью количественной эпир-спектроскопии эпидермальных клеток // Бюл. эксперимент. биол. мед. 2012. Т. 154. №12. С. 698–700.

3. Петухов В.И., Лакарова Е.В. К вопросу об использовании элементного анализа биосубстратов для оценки металлолигандного гомеостаза // Микроэлементы в медицине. 2007. Т. 8. № 4. С. 51–53.
4. Argüello, J.M. Identification of Ion-Selectivity Determinants in Heavy-Metal Transport P1B-type ATPases // *J. Membrane Biol.* 2003. Vol. 195. P. 93–108.
5. Argüello, J.M., Eren, E. The Structure and Function of Heavy Metal Transport P1B-ATPases // *Biometals.* 2007. Vol. 20. P. 233–248.
6. Axelsen, K.B., Palmgren, M.G. Evolution of substrate specificities in the P-Type ATPase super-family. // *J. Mol. Evol.* 1998. Vol. 46. P. 84–101.
7. Bera A.K., Jarque C.M., Bera A.K., Jarque C.M. Efficient Tests for Normality, Homoscedasticity and Serial Independence of Regression Residuals // *Economics Letters.* 1980. 6 (3). P. 255–259.
8. Davison A.C, Hinkley V.D. Bootstrap methods and their application. Cambridge University, 1997.
9. Hogg N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols // *Free Rad. Biol. Med.* 2000. Vol. 28. P. 1478–1486.
10. Kumerova A.O., Lece A.G., Skesters A.P., Orlikov G.A., Seleznev J.V., Rainsford K.D. Antioxidant defense and trace element imbalance in patients with postradiation syndrome: -rst report on phase I studies // *Biol. Trace Element. Res.* 2000. Vol. 77. P. 1–12.
11. Lakatta E.G., Maltsev V.A., Vinogradova T.M. A Coupled SYSTEM of Intracellular Ca²⁺ Clocks and Surface Membrane Voltage Clocks Controls the Timekeeping Mechanism of the Heart's Pacemaker // *Circ. Res.* 2010. Vol. 106. P. 659-673.
12. Lakatta E.G., Maltsev V.A., Bogdanov K.Y., Stern M.D., Vinogradova T.M. Cyclic variation of intracellular calcium: a critical factor for cardiac pacemaker cell dominance // *Circ. Res.* 2003. Vol. 92. P. e45–50.
13. Lilliefors H. On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown // *Journal of the American Statistical Association.* 1967. Vol. 62 (318). P. 399–402.
14. Maltsev V.A., Lakatta E.G. Normal heart rhythm is initiated and regulated by an intracellular calcium clock within pacemaker cells // *Heart Lung Circ.* 2007. Vol. 16. P. 335–348.
15. Petukhov V.I., Dmitriev E.V., Kalvinsh I., Baumane L.Kh., Reste E.D., Zvagule T., Skesters A.P., Skalny A.V. Metal-Ligand Homeostasis in Epidermic Cells of Chernobyl Accident // *Vitamins & Trace Elements.* 2011. Vol. 1(2). P. 1–8.
16. Pinsky D.J., Patton S., Mesaros S., Brovkovich V., Kubaszewski E., Grunfeld S., Malinski T. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart // *Circ. Res.* 1997. Vol. 81. P. 372–379.
17. Vanin A.F., Papina A.A., Serezhnikov V.A., Koppenol W.H. The mechanisms of S-nitrosothiol decomposition catalyzed by iron // *Nitric Oxide, Biol. Chem.* 2004. Vol. 10. P. 60–73.
18. Yaniv Y., Maltsev V.A., Escobar A.L., Spurgeon H.A., Ziman B.D., Stern M.D., Lakatta E.G. Beat-to-beat Ca²⁺-dependent regulation of sinoatrial nodal pacemaker cell rate and rhythm // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011. Vol. 51. P. 902–905.

References

1. Petukhov VI, Dmitriev EV, Shkesters AP, Skal'nyy AV. Problemy integral'noy otsenki elementnogo statusa cheloveka po dannym spektrometrii volos. *Mikroelementy v meditsine.* 2006;7(4):7-14. Russian.
2. Petukhov VI, Baumane LKh, Reste ED, Zvagule TYa, Romanova MA, Shushkevich NI, Sushkova LT, Skavronskiy SV, Shchukov AN. Diagnostika nitrozativnogo stressa s pomoshch'yu kolichestvennoy epr-spektroskopii epidermal'nykh kletok. *Byul. eksperiment. biol. med.* 2012;154(12):698-700. Russian.
3. Petukhov VI, Lakarova EV. K voprosu ob ispol'zovanii elementnogo analiza biosubstratov dlya otsenki metallooligandnogo gomeostaza. *Mikroelementy v meditsine.* 2007;8(4):51-3. Russian. Argüello JM. Identification of Ion-Selectivity Determinants in Heavy-Metal Transport P1B-type ATPases. *J. Membrane Biol.* 2003;195:93-108.
4. Argüello JM, Eren E. The Structure and Function of Heavy Metal Transport P1B-ATPases. *Biometals.* 2007;20:233-48.
5. Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-Type ATPase super-family. *J. Mol. Evol.* 1998;46:84-101.
6. Bera AK, Jarque CM, Bera AK, Jarque CM. Efficient Tests for Normality, Homoscedasticity and Serial Independence of Regression Residuals. *Economics Letters.* 1980;6(3):255-9.
7. Davison AC, Hinkley VD. Bootstrap methods and their application. Cambridge University, 1997.
8. Hogg N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Rad. Biol. Med.* 2000;28:1478-86.
9. Kumerova AO, Lece AG, Skesters AP, Orlikov GA, Seleznev JV, Rainsford KD. Antioxidant defense and trace element imbalance in patients with postradiation syndrome: -rst report on phase I studies. *Biol. Trace Element. Res.* 2000;77:1-12.
10. Lakatta EG, Maltsev VA, Vinogradova TM. A Coupled SYSTEM of Intracellular Ca²⁺ Clocks and Surface Membrane Voltage Clocks Controls the Timekeeping Mechanism of the Heart's Pacemaker. *Circ. Res.* 2010;106:659-73.

11. Lakatta EG, Maltsev VA, Bogdanov KY, Stern MD, Vinogradova TM. Cyclic variation of intracellular calcium: a critical factor for cardiac pacemaker cell dominance. *Circ. Res.* 2003;92:e45-50.
12. Lilliefors H. On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. *Journal of the American Statistical Association.* 1967;62(318):399-402.
13. Maltsev VA, Lakatta EG. Normal heart rhythm is initiated and regulated by an intracellular calcium clock within pacemaker cells. *Heart Lung Circ.* 2007;16:335-48.
14. Petukhov VI, Dmitriev EV, Kalvinsh I, Baumann LKh, Reste ED, Zvagule T, Skesters AP, Skalny AV. Metal-Ligand Homeostasis in Epidermic Cells of Chernobyl Accident. *Vitamins & Trace Elements.* 2011;1(2):1-8.
15. Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T. Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ. Res.* 1997;81:372-9.
16. Vanin AF, Papina AA, Serezhenkov VA, Koppenol WH. The mechanisms of S-nitrosothiol decomposition catalyzed by iron. *Nitric Oxide, Biol. Chem.* 2004;10:60-73.
17. Yaniv Y, Maltsev VA, Escobar AL, Spurgeon HA, Ziman BD, Stern MD, Lakatta EG. Beat-to-beat Ca²⁺-dependent regulation of sinoatrial nodal pacemaker cell rate and rhythm. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011;51:902-5.