

*В роботі представлені результати дослідження  $\beta$ -адренорецепторів еритроцитів людини при артеріальній гіпертензії in vitro за допомогою КВЧ-діелектрометрії. Отримані результати можуть бути в подальшому використані при створенні нової методики ранньої in vitro діагностики серцево-судинних захворювань*

*Ключові слова:  $\beta$ -адренорецепція еритроцитів, артеріальна гіпертензія, діелектрична проникність, метод КВЧ-діелектрометрії*

*В работе представлены результаты исследования функционального состояния  $\beta$ -адренорецепторов эритроцитов при артериальной гипертензии с помощью КВЧ-диелектрометрии. Полученные результаты могут быть в дальнейшем использованы при создании новой методики ранней in vitro диагностики сердечно-сосудистых заболеваний*

*Ключевые слова:  $\beta$ -адренорецепция эритроцитов, артериальная гипертензия, диелектрическая проницаемость, метод КВЧ-диелектрометрии*

*The results of human erythrocytes  $\beta$ -adrenergic receptors study with arterial hypertension donors by means of EHF-dielectrometry are represented in the present work. The data obtained may be used in the development of new early recognition method of cardiovascular diseases*

*Key words:  $\beta$ -adrenergic reception, arterial hypertension, EHF-dielectrometry method, permittivity*

# ОЦІНКА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ БЕТА- АДРЕНОРЕЦЕПТОРІВ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ ПРИ АРТЕРІАЛЬНІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ МЕТОДОМ КВЧ-ДІЕЛЕКТРОМЕТРІЇ

**Е. В. Высоцкая**

Кандидат технических наук, доцент\*

Контактный тел.: (057)-702-13-64

E-mail: diagnost@kture.kharkov.ua

**Е. А. Архипова**

Младший научный сотрудник\*\*

Контактный телефон: (057)-720-35-06

E-mail: erugel@ire.kharkov.ua

**П. С. Красов**

Младший научный сотрудник\*\*

Контактный тел.: (057)-720-35-06

E-mail: pskrasov@ire.kharkov.ua

**А. А. Порван**

Научный сотрудник\*

Контактный тел.: (057)-702-13-64

E-mail: borman\_d@mail.ru

\*Кафедра биомедицинских электронных устройств и систем

Харьковский национальный университет

радиоэлектроники

пр. Ленина, 14, г. Харьков, 61166

**А. И. Фисун**

Доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник\*\*

Контактный тел.: (057)-720-35-06

E-mail: afis@ire.kharkov.ua

\*\*Отдел твердотельной электроники

Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова  
НАН Украины

ул. Ак. Проскуры, 12, г. Харьков, 61085

## 1. Вступ

Зростання серцево-судинних захворювань у світовому масштабі та їх «омолодження» впро-

довж останнього часу є загальновідомим фактом. Найпоширенішою серед них є артеріальна гіпертензія (АГ), яка також виступає одним з загальних факторів ризику подальшого розвитку усіх клінічних

проявів ішемічної хвороби серця (ІБС), інсультів, хронічної серцевої та ниркової недостатності. Незважаючи на значні досягнення сучасної медицини, першопричина виникнення АГ на сьогоднішній день все ще залишається невідомою, але однією з найперспективніших залишається «мембранна теорія» про порушення механізмів іон-транспортних систем клітинних мембран та їх рецепції [1, 2].

## **2. Постановка проблеми та огляд невирішених питань**

Протягом останніх десятиліть вивчення патогенезу серцево-судинних захворювань проводилося в основному у напрямку визначення вмісту у біологічних рідинах гормонів, медіаторів, їх метаболітів на фоні різноманітних впливів [3]. Функціональний стан рецепторного апарату клітин, що обумовлює кінцевий ефект дії гормонів, оцінюється опосередковано за результатами фармакологічних проб. Симпатoadренолова система підлягає вивченню при різних формах АГ в силу її прямого відношення до механізму формування судинного тону. Стан рецепторних структур клітини відповідає функціональній активності гормон-рецепторних взаємодій, що змінює активність аденілатциклазної системи – універсальної для всіх типів клітин системи передачі сигналу від гормонів, медіаторів, великої кількості фармакологічних агентів, тощо.

Відомо, що при серцево-судинних захворюваннях, таких як, наприклад, гіпертонічна хвороба, кількість  $\beta$ -адренергічних рецепторів зменшується внаслідок десентизації – процесу довготривалої або завищеної концентраційної дії гормонів [4]. Фізіологічно це може проявлятися чималою кількістю симптомів – гіпертонією, аритмією, тощо. Зареєструвати такий функціональний стану разі відсутності симптомів можна за допомогою оцінки чутливості  $\beta$ -адренорецепторів клітин крові до адреналіну, яка здібна виявити існуючі порушення на ранніх стадіях розвитку хвороби.

Найбільш відомі існуючі методи дослідження адренорецепторного аденілатциклазного комплексу зводяться до дослідження різних екзогенних агоністів та антагоністів на адренорецептори при їх введенні в організм людини та дослідження регуляції щільності рецепторів фізіологічними коливаннями катехоламінів при фізичних та психоемоційних навантаженнях. Однак, найважливішим недоліком радіолігандного методу вивчення адренорецепторів є його інвазивність. Останнім часом в літературі з'являються й інші методи досліджень функції адренорецепторів, [5-9]. Але вони також не дозволяють вивчати функціонування мембранно-рецепторного комплексу клітини в умовах її нативного стану (в реальному часі). Комплексний підхід, що поєднує радіофізичні та біохімічні підходи до вивчення гормон-рецепторної регуляції клітин є альтернативним методом дослідження адренорецепторного стану клітин *in vitro* і частково вирішує проблему можливості вивчення біооб'єктів без руйнування їхньої структури в реальному часі. Даний підхід раніше вже був застосований авторами в роботах [10-14], в яких проведено дослідження адренорецепції тромбоцитів пацієнтів з АГ. За аналогією доцільно провести апробування підходу, використовуючи еритроцити хворих

на АГ, адже еритроцит людини є цілком придатною моделлю для вивчення  $\beta$ -адренорецепції. Це обумовлено наявністю в їхніх мембранах  $\beta$ -адренергічних рецепторів, функціонально та структурно схожих з  $\beta$ -адренорецепторами клітин міокарда, судин та ін. [4].

## **3. Мета роботи**

Метою даної роботи є оцінка функціонального стану  $\beta$ -адренорецепторів еритроцитів донорів, хворих на АГ, із залученням методів КВЧ діелектрометрії та статистичного аналізу отриманих даних.

## **4. Експериментальне проведення оцінки функціонального стану $\beta$ -адренорецепторів еритроцитів за даними КВЧ-діелектрометрії**

Поставлена мета досягається шляхом оцінки функціональної чутливості  $\beta$ -адренорецепторів еритроцитів за діелектричними параметрами при спрямованій дії специфічних біорегуляторів – адреноміметиків та їх антагоністів –  $\beta$ -блокаторів. Поєднання методів КВЧ діелектрометрії з традиційними біохімічними та медико-біологічними засобами дослідження біологічних об'єктів покладено в основу методологічного підходу до вивчення сигнальних систем клітин різних рівнів організації [15].

В експерименті було використано кров двох груп добровольців: 1 група – 11 умовно здорових донорів (серцево-судинної патології не встановлено); група 2 – дослідна група з 29 хворих із АГ. Збір крові здійснювали одноразовими пластиковими шприцями з вени натщесерце. Отриманий матеріал стабілізували гепарином (5 крапель гепарину на 10 мл крові). Далі стабілізовану цільну кров центрифугували протягом 10 хвилин при 1000 об/хв. (240g). Утворений супернатант відбирали дозатором, а залишок еритроцитарної маси відмивали шляхом подальшого додавання фізіологічного розчину та центрифугуванням у тому ж режимі двічі [16]. Зразки розливали в комірки імунологічного планшету у кількості 0,2 мл за допомогою мікродозатора. Тестові біологічно активні речовини додавали у комірки зі зразками за 20-25 хвилин до початку вимірювань (процес інкубації). У контрольні зразки додавали еквівалентну кількість фізіологічного розчину (0,9% NaCl). У такий спосіб концентрація клітин в кожному експерименті витримувалася незмінною.

Вимірювання діелектричної проникності зразків проводилися за допомогою автоматизованого діелектрометра, розробленого в ІРЕ НАНУ [14, 16], на фіксованій частоті 39,5 ГГц, яка відповідає області дисперсії вільної води. Оскільки єдиним елементом біосистеми, що вносить вклад у релаксаційний процес в даному частотному діапазоні є молекули вільної води, то зміна діелектричних параметрів клітинної суспензії під впливом специфічних регуляторів пояснюється станом гідратного оточення об'єкта в результаті перерозподілу кількості вільної та зв'язаної води в системі [14, 17]. Подібні перерозподіли можна викликати в умовах експерименту при дослідженнях впливу різноманітних факторів – температури, тиску, світла, зміни іонної

концентрації розчину зі зразком, або специфічною дією фармакологічних засобів, тощо. Останнє покладено в основу нашого методу диференціації різних функціональних станів біооб'єктів за їхніми діелектричними характеристиками.

Тестовими речовинами слугували адреналін у дозі 40 мкг/л крові та β-блокатори – обзидан (0,8 мг/л крові) і метопролол (2 мг/л крові). Концентрації діючих добавок розраховані відповідно до терапевтичної середньодобової дози [18]. Концентрація адреналіну перевищувала терапевтичну дозу в 100 разів з метою моделювання стресу на клітинному рівні.

Оцінку чутливості β-адренорецепторів еритроцитів проводили шляхом реєстрування їх діелектричних параметрів до та після послідовної стимуляції β-адренорецепторів адреналіном, їх блокади β-блокаторами. Отримана статистично достовірна різниця в діелектричній проникності між групами в даному випадку є діагностичним показником при аналізі даних (рис. 1):

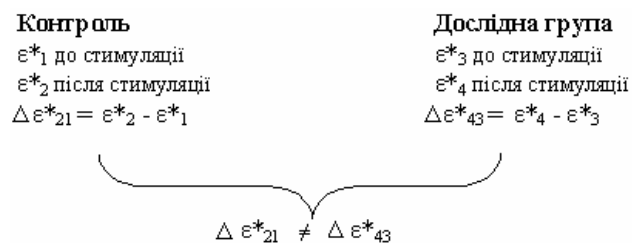


Рис. 1. Схема отримання різниці комплексної діелектричної проникності в експерименті

Першим кроком експерименту було проведення тесту на еритроцитах контрольної групи (групи 1). Реакція еритроцитів на спрямовану дію біорегуляторів представлена у вигляді діаграм клітинних відповідей (рис. 2).

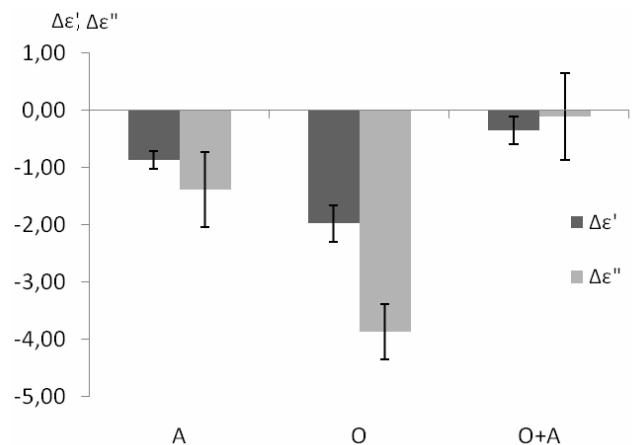


Рис. 2. Реакція еритроцитів контрольної групи (умовно здорової) на стимуляцію адреналіном (А), β-блокатором обзиданом (О) та їх сумісна дія (О+А) відносно до контрольних зразків, замість стимуляторів в яких додається еквівалентна кількість фізичного розчину

На рис. 2 представлені експериментальні результати спостережимої різниці діелектричної проникності еритроцитів до та після дії стимуляторів – гормо-

ном адреналіном, його β-блокатором обзиданом та їх сумісної дії. В результаті гормональної дії адреналіну та його антагоніста обзидана спостерігається реакція клітин крові у вигляді зменшення  $\Delta\epsilon^*$ , при чому дія блокатора сама по собі на еритроцити викликає більш значне зменшення  $\Delta\epsilon^*$ . В той же час, клітини, що були інкубовані β-блокатором протягом 30 хвилин, втрачають здатність реагувати на стрес-фактор адреналін. Отже, β-блокатор в даному випадку здійснює протекторну дію на мембранно-рецепторний комплекс клітин. В цьому й полягає суть блокади мембранно-рецепторного комплексу в нормальному стані людини (контрольна група 1).

Другий етап експерименту полягає у проведенні аналогічного тесту на еритроцитах дослідної групи (групи 2). У разі патологічних станів в умовах моделювання стресу на клітинному рівні ситуація змінюється. Чутливість до адреналіну може бути або слабша, або зовсім відсутня, що може пояснюватись десентизацією α-адренорецепторів еритроцитів (рис. 3).

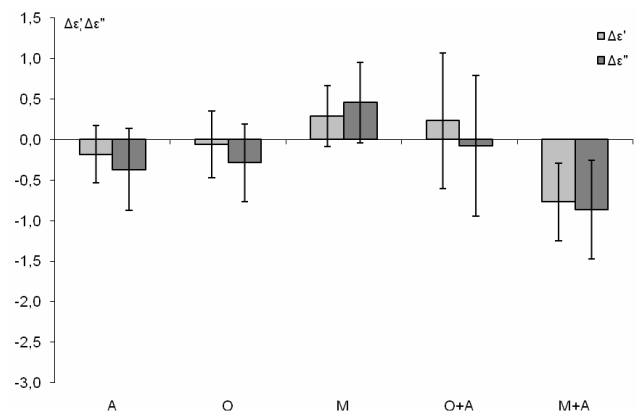


Рис. 3. Реакції еритроцитів дослідної групи 2 на стимуляцію адреналіном (А), блокаторами обзиданом (О) та метопрололом (М) та їх сумісну дію (О+А, М+А) відносно до контрольних зразків

Як видно з діаграми (рис. 3), чутливість клітин до адреналіну лежить в межі похибки, теж саме спостерігається й при блокаді β-адренорецепторів. Обидва β-блокатори не викликають змінення діелектричної проникності клітин. Лише при сумісній дії метопролола з адреналіном (А+М) спостерігається незначне зменшення параметрів  $\Delta\epsilon'$  та  $\Delta\epsilon''$ , тобто протекторної функції блокатора не відбулося.

Отже, даний метод дозволяє фіксувати різні функціональні стани β-адренорецепторів клітин крові в різних станах, обумовлених порушеннями за наявності АГ.

Оцінку ефективності реєстрування вивчаємих механізмів методом КВЧ-діелектрометрії статистичними методами проводили у такий спосіб.

Визначили, чи можна відхилення від нуля віднести на рахунок випадкових обставин і визнати його значущим (тим самим підтвердити гіпотезу про нормальність розподілу вивчаємої вибірки).

Спочатку за числовими даними, отриманими при вимірюванні діелектричної проникності зразків групи 2, були обчислені коефіцієнти асиметрії  $As(X)$  і ексцесу  $Es(X)$ .

Як припустимі границі відхилення емпіричних характеристик від нуля використовуємо середньоквадратичні відхилення  $\sigma_{As}(X)$  і  $\sigma_{Es}(X)$ , що обчислюють для  $As(X)$  і  $Es(X)$ , та інтерпретуються як випадкові величини. Ці значення обчислювали за формулами:

$$\sigma_{As}(X) = \sqrt{\frac{6 \cdot (n-1)}{(n+1) \cdot (n+3)}}$$

та

$$\sigma_{Es}(X) = \sqrt{\frac{24 \cdot n \cdot (n-1)}{(n+1) \cdot (n+3)}}$$

де  $n$  – обсяг вибірки.

Результати обчислень представлені в табл. 1.

**Таблица 1**

Результати обчислення коефіцієнтів асиметрії  $As(X)$  і ексцесу  $Es(X)$  та їх середньоквадратичні відхилення

Температура	Зразок	n	As(X)	$\sigma_{As}(X)$	Es(X)	$\sigma_{Es}(X)$
T1	K1 (контроль1)	12	-0,29	$\pm 0,58$	-0,25	$\pm 0,92$
	A	17	0,49	$\pm 0,52$	-0,06	$\pm 0,87$
	O	12	0,57	$\pm 0,58$	-0,33	$\pm 0,92$
	K2 (контроль2)	7	0,71	$\pm 0,67$	1,60	$\pm 0,88$
	O+A	12	0,03	$\pm 0,58$	-1,01	$\pm 0,92$
T2	K1 (контроль1)	16	0,038	$\pm 0,53$	0,38	$\pm 0,88$
	A	21	-0,038	$\pm 0,48$	0,78	$\pm 0,83$
	O	16	0,46	$\pm 0,53$	0,71	$\pm 0,88$
	M	12	0,64	$\pm 0,58$	1,27	$\pm 0,92$
	K2 (контроль2)	12	-0,28	$\pm 0,58$	-0,51	$\pm 0,92$
	O2	20	0,65	$\pm 0,49$	-1,26	$\pm 0,84$
	K2 (контроль3)	9	-0,50	$\pm 0,63$	-0,50	$\pm 0,92$
	O+A	8	-0,43	$\pm 0,65$	-1,57	$\pm 0,91$
	K3	11	-0,76	$\pm 0,60$	-0,58	$\pm 0,92$
	M+A	7	-1,95	$\pm 0,67$	4,60	$\pm 0,88$

Примітка до табл. 1:  
 K1 – контрольна суспензія еритроцитів з додавання фізіологічного розчину замість стимуляторів;  
 K2 – контрольний зразок для сумісної дії адреналіну з блокатором обіданом (O+A);  
 K3 – контрольний зразок для сумісної дії адреналіну з блокатором метапрололом (M+A)

За гіпотезу  $H_0$  можна прийняти наступне: якщо знайдено значення  $As(X)$  належить до інтервалу  $\pm \sigma_{As}(X)$ , то можна вважати, що теоретична величина  $As(X) = 0$ . Якщо знайдено значення  $Es(X)$  належить до інтервалу  $\pm \sigma_{Es}(X)$ , то можна вважати, що теоретична величина  $Es(X) = 0$ . Рівність нулю коефіцієнтів асиметрії та ексцесу підтверджує істинність гіпотези про нормальний розподіл. Знайдені значення  $As(X)$  для K1, A та O належать до інтервалу  $\pm \sigma_{As}(X)$ , а також значення  $Es(X)$  належить до інтервалу  $\pm \sigma_{Es}(X)$ . Таким чином підтверджується гіпотеза про нормальний розподіл. У випадку значень  $As(X)$  та  $Es(X)$  для M гіпотеза про нормальний розподіл відхиляється, т.я. вони перевищують інтервали  $\pm \sigma_{As}(X)$  та  $\pm \sigma_{Es}(X)$ , відповідно.

Далі на отриманих числових даних простежимо вплив регуляторів на функціональний стан еритроцитів донорів групи 2.

Визначимо, чи існує статистично значущий ефект впливу стимуляторів на чутливість адренорецепторів еритроцитів. Досліджувалися два фактори: температура ( $T_1=20^\circ C$  і  $T_2=23^\circ C$ ) і стимулятори (A і O.)

Для цього визначили суму квадратів, що відповідає чиннику стимулятор:

$$SSB = m' \sum_{j=1}^c (\bar{X}_{.j} - \bar{\bar{X}})^2 = 0,046875.$$

Далі визначається сума квадратів, що враховує взаємодію між чинниками температура та препарат:

$$SSAB = n' \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c (\bar{X}_{ij} - \bar{X}_{i.} - \bar{X}_{.j} + \bar{\bar{X}})^2 = 0,285208.$$

На наступному кроці визначається сума квадратів помилок, як сума квадратів різниць між спостереженнями всередині кожного чинника і відповідним середнім значенням чинника:

$$SSE = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \sum_{k=1}^{n'} (X_{ijk} - \bar{X}_{ij})^2 = 0,6575.$$

Надалі розрахували дисперсії до відповідних сум квадратів.

$$MSA = \frac{SSA}{r-1} = 1,05020833,$$

$$MSB = \frac{SSB}{c-1} = 0,046875,$$

$$MSAB = \frac{SSAB}{(r-1) \cdot (c-1)} = 0,28520833,$$

$$MSE = \frac{SSE}{rc(n'-1)} = 0,014943182.$$

Для перевірки гіпотези про відсутність ефекту чинника стимулятор на клітини:  $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_c$  і альтернативної гіпотези  $H_1$ : не всі  $\mu_j$  однакові, ( $j=1,2,\dots,c$ ), застосовується F-статистика, що обчислена за формулою:

$$F = \frac{MSB}{MSE} = 0,046875 / 0,014943182 = 3,13688219.$$

Оскільки  $F < F_U (3,13 < 4,06)$ , то можна сказати, що у випадку дослідної групи 2 статистично значущого ефекту впливу стимуляторів A та O на  $\beta$ -адренорецептори еритроцитів не існує.

Отже, в результаті статистичної обробки експериментальних даних з оцінки функціонального стану  $\beta$ -адренорецепторів еритроцитів донорів хворих на АГ, було підтверджено теоретичні положення про реакцію  $\beta$ -адренорецепторів еритроцитів людини при артеріальній гіпертензії, яка була досліджена за методом КВЧ-діелектрометрії.

### 5. Висновки

В результаті проведеної роботи були отримані експериментальні данні з оцінки  $\beta$ -адренорецепторів еритроцитів донорів хворих на АГ методом КВЧ

діелектрометрії. Отримані дані підтвердили відомі механізми дії адренергічних стимуляторів, що були використані в даній роботі. Показано можливість застосування використаних тестів при вивченні  $\beta$ -адренорецепції еритроцитів з метою моделювання стресу *in vitro* за наявності патології. Статистично підтверджено факт існування температурного впливу на чутливість еритроцитів до стимуляторів та відсутності реакції еритроцитів на стимулятори при вимірюванні діелектричної проникності зразків людей із АГ (група 2).

Таким чином, отримані результати обумовлюють доцільність подальшого вивчення та розвитку запропонованого підходу шляхом апробації та накопичення статистично вірогідних результатів із залученням більшої кількості даних в експерименті на клінічному матеріалі пацієнтів також і з іншими серцево-судинними патологіями, які обумовлені участю симпатoadреналової системи в механізмах розвитку захворювань даного типу. Вивчення особливостей функціонування мембранно-рецепторного комплексу еритроцитів *in vitro* дозволить отримати додаткову інформацію про молекулярні механізми процесів виникнення патології на ранніх стадіях захворювань та запропонувати розробку нової методики діагностування серцево-судинних захворювань людини на ранніх стадіях розвитку.

#### Література

1. Постанов, Ю.В. Первичная гипертензия как патология клеточных мембран [Текст] / Ю.В. Постанов, С.Н. Орлов. – М.: Медицина, 1987.
2. Введение в биомембранологию [Текст] /Под ред. А.А. Болдырева. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 208с.
3. Ковалева, О.Н. Молекулярные механизмы реализации стресса у больных артериальной гипертензией [Текст] / О.Н. Ковалева, Т.Ю. Щеголева, Д.Ю Сидоров и др. // Врачебная практика. – 1999. - №4. – С. 7-10.
4. Авакян, О.М. Фармакологическая регуляция функции адренорецепторов [Текст] / О.М. Авакян. – М.: Медицина, 1988. – 256 с.
5. Стрюк, Р.И. Адренореактивность и сердечно-сосудистая система [Текст] / Р.И. Стрюк, И.Г. Длусская. – М.: Медицина, 2003. – 160с.
6. Колобова, Е.В. Оценка  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов по скорости их оседания на фоне адренергических средств [Текст] / Е.В. Колобова, С.А. Дворянский, А.Д. Ноздрачев, В.И. Циркин // Доклады РАН. – 1998. – Т.358, № 5. – С. 695-698.
7. Бунова, С.С. Артериальная гипертензия и адренореактивность: особенности у больных с ожирением [Текст] / Бунова С.С., Остапенко В.А., Николаев Н.А. и др. // Бюллетень СО РАМН 2008. – №1 (129). – 2008. – С.77-81.
8. Шоикимова Д.У. Адренорецепция клеточных мембран у беременных с нарушениями сердечного ритма /Автореф. на соискание степени канд. мед. наук – 2008. - 43с.
9. Циркин В.И., Громова М.А., Колчина Д.А., Михайлова В.И., Плясунова Я.К. Оценка адренореактивности эритроцитов, основанная на способности повышать скорость агглютинации эритроцитов//Фундаментальные исследования. - №7. – 2008.
10. Сергієнко М.Г., Ковальова О.М., Сафаргаліна Н.А., Пітецька Н.І., Смирнова В.І., Сидоров Д.Ю., Амбросова Т.М. Предиктори гіпертонічної хвороби. Матеріали V конгресу кардіологів України//Український кардіологічний журнал. - 1996. - додаток до № 3. – С. 13-14.
11. Сидоров Д.Ю., Лепеева Е.А. Адренергические механизмы формирования гипертонического сердца: Матеріали XIV з'їзду терапевтів України. – Київ. – 1998. – С. 68-69. Автором проведено вивчення стану адренорецепторів тромбоцитів.
12. Сидоров Д.Ю., Щеголева Т.Ю., Смирнова В.И., Колесников В.Г. Клеточные ответы тромбоцитов у больных гипертонической болезнью. // Медицина сегодня и завтра: Сборник научных работ молодых ученых и специалистов. – Харьков. – 1996. – С. 64-65.
13. Сидоров Д.Ю. Состояние адренорецепторов тромбоцитов больных гипертонической болезнью по данным метода КВЧ-диэлектрометрии//Украинский терапевтический журнал. – 2001. – №4. – С. 51-56.
14. Щеголева Т.Ю. Исследование биологических объектов в миллиметровом диапазоне радиоволн. - Киев: Наукова думка.-1996.-182 с.
15. Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. – Томск, 1980. – 314 с.
16. Красов П.С. Одночастотный рефлектометр на основе четырехзондовой измерительной линии // Прикладная радиоэлектроника.- 2008. - Т.7, №2, С.188-191.
17. Щеголева Т.Ю. СВЧ-диэлектрометрия биополимеров и клеток. Дисс. ... докт. физ.-мат. наук.- М.: МГУ.- 1989. - 344 с.
18. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – М.: Новая волна, 2000. – 540 с.