

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

ПАТОГЕНЕЗ

Научно-практический журнал

Основан в 2003 году
Выходит 4 раза в год

Том 15, №1, 2017

ЯНВАРЬ—МАРТ

Главный редактор
КУБАТИЕВ А.А. (Москва)

Соредакторы
Дыгай А.М. (Томск), Корнева Е.А. (Санкт-Петербург), Морозов С.Г. (Москва)

Ответственные секретари
Белкина Л.М. (Москва), Карганов М.Ю. (Москва)

Редакционная коллегия

Арчаков А.И. (Москва), Афтанас Л.И. (Новосибирск), Баранов В.М. (Москва), Береговых В. В. (Москва), Бобрышев Ю.В. (Сидней, Австралия), Гинтер Е.К. (Москва), Грачев С.В. (Москва), Дауни Г.Ф. (Форт-Уэрт, США), Кашкин К.П. (Москва), Кжишковска Ю.Г. (Гейдельберг, Германия), Колесников С.И. (Москва), Кушлинский Н.Е. (Москва), Манухина Е.Б. (Форт-Уэрт, США), Нинкина Н.Н. (Кардифф, Великобритания), Новицкий В.В. (Томск), Пальцев М.А. (Москва), Панченко Л.Ф. (Москва), Петров В.И. (Волгоград), Пузырев В.П. (Томск), Ревивили А.Ш. (Москва), Репин В.С. (Москва), Сандриков В.А. (Москва), Софронов Г.А. (Санкт-Петербург), Сухих Г.Т. (Москва), Тутельян В.А. (Москва), Угрюмов М.В. (Москва), Франк Г.А. (Москва), Черешнев В.А. (Екатеринбург), Чехонин В.П. (Москва), Шабалин В.Н. (Москва), Швец В.И. (Москва), Шляхто Е.В. (Санкт-Петербург), Юрков В.А. (Москва)

Зав. редакцией Иришкин Д.А.
Научный редактор Белкина Л.М.
Технический редактор Комарова А.К.

Внимание авторов и читателей: рукописи и иллюстрации не возвращаются. При перепечатке материалов согласование с редакцией журнала «Патогенез» обязательно.
За содержание рекламных публикаций ответственность несет рекламодатель.
Журнал зарегистрирован в Федеральном агентстве по печати и массовым коммуникациям. Регистрационный номер ПИ № 77-12736 от 27 мая 2002 г. ISSN 2310-0435
Почтовый адрес редакции: 125315, Москва, а/я 9. e-mail: genius-media@mail.ru; тел.: +7 (495) 518-1451
Формат 210x290 мм. Бумага офсетная.
Подписано в печать 28.05.2017. Тираж 300 экз. Отпечатано в типографии «OneBook», Москва.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук
ООО Издательство «Гениус Медиа».

Federal State Budgetary Scientific Institution
«Institute of General Pathology and Pathophysiology»

PATHOGENESIS

Journal of Basic and Applied Medicine

Founded in 2003
Quarterly issue

Volume 15, №1, 2017

January—March

Editor-in-Chief
A.A. KUBATIEV (Moscow)

Co-editors
A.M. Dygay (Tomsk), E.A. Korneva (Saint-Petersburg), S.G. Morozov (Moscow)

Secretary
L.M. Belkina (Moscow), M.Yu. Karganov (Moscow)

Editorial board
Archakov A.I. (Moscow), Aftanas L.I. (Novosibirsk), Baranov V.M. (Moscow), Beregovykh V.V. (Moscow), Bobryshev Y.V. (Sydney, Australia), Ginter E.K. (Moscow), Grachev S.V. (Moscow), Downey H.F. (Fort Worth, USA), Kashkin K.P. (Moscow), Kzhyshkowska J.G. (Heidelberg, Germany), Kolesnikov S.I. (Moscow), Kushlinskii N.E. (Moscow), Manukhina E.B. (Fort Worth, USA), Ninkina N.N. (Cardiff, United Kingdom), Novitskiy V.V. (Tomsk), Paltsev M.A. (Moscow), Panchenko L.F. (Moscow), Petrov V.I. (Volgograd), Puzyrev V.P. (Tomsk), Revishvili A.Sh. (Moscow), Repin V.S. (Moscow), Sandrikov V.A. (Moscow), Sofronov G.A. (Saint-Petersburg), Sukhikh G.T. (Moscow), Tutelian V.A. (Moscow), Ugriumov M.V. (Moscow), Frank G.A. (Moscow), Chereshev V.A. (Ekaterinburg), Chekhonin V.P. (Moscow), Shabalin V.N. (Moscow), Shvets V.I. (Moscow), Shliakhto E.V. (Saint-Petersburg), Yurkiv V.A. (Moscow)

Publish Department chief Irishkin D.A.
Scientific editor Belkina L.M.
Technical editor Komarova A.K.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Пазина Т.Ю., Корнева Е.А., Орлов Д.С., Шамова О.В.
Множественная миелома:
патогенез и новые подходы к терапии 4

Пальцын А.А.
Гормезис физических нагрузок и умеренного питания:
здоровье и долголетие 11

Берлов М.Н., Умнякова Е.С., Кокряков В.Н.
Белки и пептиды нейтрофилов
в регуляции системы комплемента 19

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухов А.В.,
Карнаухова Е.В., Карнаухова Н.А.,
Манохина И.А., Карнаухов В.Н.
Изучение регенеративного потенциала клеток плаценты
в модельных экспериментах на мышах 24

Леонова Е.И., Солонин А.С., Галзитская О.В.,
Шайхутдинова Э.Р., Лобанов А.В., Мурашев А.Н.
Уровень экспрессии гена *sdc1* в стенках дуги аорты
и концентрация растворимого фрагмента синдекана-1
в сыворотке крови у ApoE-нокаутных мышей 34

Расулов М.М., Моторина И.Г., Юшков Г.Г.,
Щукина О.Г., Малышкина Н.А.
Заживление термических ожогов кожи
в условиях экспериментальной фототерапии 40

Еркудов В.О., Пуговкин А.П., Багрина Я.В., Сергеев И.В.
Биохимический анализ крови недиабетических крыс
при пероральной нагрузке препаратами ванадия 48

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мезенцева Л.В., Чомахидзе П.Ш.,
Копылов Ф.Ю., Перцов С.С., Ластовецкий А.Г.
Анализ переходов между линейными
и нелинейными режимами кардиоритма
у больных с ишемической болезнью сердца 54

Носкин Л.А., Воробьева Т.В., Потапчук А.А.,
Рубинский А.В., Зайцев Г.К., Петрова И.В.,
Марченкова Ф.Ю., Карганов М.Ю.
Диагностика функционального баланса
основных систем организма, обеспечивающих здоровье
у детей с нарушениями слуха и речи 59

Куклева О.Ю., Яковенко Е.Н., Степанова М.А.,
Давтян К.К., Карганов М.Ю., Эскина Э.Н.
Субфракционный состав слезной жидкости после выполнения
фемтосекундной рефракционной операции с малым разрезом
по методу ReLex Smile. Сравнительное исследование 65

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ

Копаладзе Р.А.
Экспериментальная модель ультразвуковой эпилепсии
на крысах линии Крушинского-Молодкиной 72

ИНФОРМАЦИЯ

Правила оформления статей в журнале «Патогенез» 78

CONTENTS

REVIEWS

Pazina T.Yu., Korneva E.A., Orlov D.S., Shamova O.V.
Multiple myeloma:
pathogenesis and new approaches to therapy 4

Paltsyn A.A.
Hormesis of exercise and calorie restriction:
health and longevity 11

Berlov M.N., Umnyakova E.S., Kokryakov V.N.
Neutrophil proteins and peptides
in regulation of complement 19

EXPERIMENTAL RESEARCHES

Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V.,
Karnaukhova E.V., Karnaukhova N.A.,
Manokhina I.A., Karnaukhov V.N.
Study of the regenerative potential of placental cells
in model experiments on mice 24

Leonova E.I., Solonin A.S., Galzitckaya O.V.,
Shaykhutdinova E.R., Lobanov A.V., Murashev A.N.
Expression of *sdc1* gene in aortic arch
and the serum concentration of «soluble» CD138
in ApoE knockout mice 34

Rasulov M.M., Motorina I.G., Yushkov G.G.,
Schukina O.G., Malyskhina N.A.
The healing of thermal burns on the skin
in experimental phototherapy 40

Erkudov V.O., Pugovkin A.P., Bagrina Y.V., Sergeev I.V.
Biochemical analysis of the blood in nondiabetic rats
after *per os* treatment with vanadium-containing substances 48

CLINICAL RESEARCHES

Mezentseva L.V., Chomakhidze P.Sh.,
Kopylov F.Yu., Pertsov S.S., Lastovetsky A.G.
The analysis of transitions between linear
and nonlinear regimes of cardiorythm
at patiens with the ischemic heart disease 54

Noskin L.A., Vorobyova T.V., Potapchuk A.A.,
Rubinsky A.V., Zaitsev G.K., Petrova I.V.,
Marchenkova F.Yu., Karganov M.Yu.
Diagnosis of the functional balance of the main systems
that provide the health in children
with hearing and speech impairment 59

Kukleva O.Yu., Yakovenko E.N., Stepanova M.A.,
Davtyan K.K., Karganov M.Yu., Eskina E.N.
Subfractional composition of tear fluid
after RLEX Smile femtosecond refractive surgery.
Comparative study 65

EXPERIMENTAL MODELS

Kopaladze R.A.
Ultrasonic experimental model of epilepsy
in Krushinsky-Molodkina rats strain 72

INFORMATION

Guidelines for Authors 78

УДК 616-006.4

Множественная миелома: патогенез и новые подходы к терапии

Пазина Т.Ю.¹, Корнева Е.А.^{1,2}, Орлов Д.С.^{1,2}, Шамова О.В.^{1,2}¹ — ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12² — Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д.7-9

В обзоре приводятся современные представления о патогенезе и подходах к терапии множественной миеломы — злокачественного лимфопролиферативного заболевания, которое до настоящего времени остается неизлечимым. Рассмотрены молекулярно-клеточные основы патогенеза этого заболевания. Приводятся сведения о подходах к терапии множественной миеломы, позволяющих улучшить качество и продолжительность жизни больных с этой формой патологии. Проанализированы недостатки и преимущества лекарственных препаратов, применяемых для коррекции данного патологического процесса. Основное внимание в обзоре уделяется рассмотрению новых направлений, связанных с использованием моноклональных антител. Приведены примеры применяемых в терапии множественной миеломы моноклональных антител к определенным молекулам на мембранах миеломных клеток, обсуждаются механизмы их противоопухолевого действия. Подчеркивается важность эффектов моноклональных антител, реализуемых путем повышения противоопухолевого потенциала эндогенных защитных систем организма, а именно за счет модуляции анти-телозависимой клеточной цитотоксичности и комплементзависимой цитотоксичности. Обосновывается перспективность использования моноклональных антител в моно- или комбинированной терапии множественной миеломы и необходимость проведения дальнейших исследований в направлении разработки новых препаратов на основе антител, а также детального анализа механизмов их противоопухолевого действия.

Ключевые слова: множественная миелома, иммунотерапия, моноклональные антитела.

Для цитирования: Пазина Т.Ю., Корнева Е.А., Орлов Д.С., Шамова О.В. Множественная миелома: патогенез и новые подходы к терапии. Патогенез. 2017; Т. 15(1): 4–10.

Для корреспонденции: Шамова Ольга Валерьевна, докт. биол. наук, доцент, зав. отделом общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия, e-mail: oshamova@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.11.2016

Multiple myeloma: pathogenesis and new approaches to therapy

Pazina T.Yu.¹, Korneva E.A.^{1,2}, Orlov D.S.^{1,2}, Shamova O.V.^{1,2}¹ — FSBSI «Institute of Experimental medicine», 197376, St-Petersburg, Academic Pavlov Str., 12² — Saint Petersburg State university, 199034, St-Petersburg, Universitetskaya Emb, 7-9

The review represents the current conceptions on the pathogenesis and approaches to therapy of multiple myeloma — a cancer lymphoproliferative disease, which remains incurable up to date. The molecular and cellular basis of pathogenesis of this disease is considered in this review. Information about approaches to therapy of multiple myeloma, allowing to improve life quality and expectancy of patients with this form of pathology is provided. The advantages and failures of pharmaceuticals applied for correction of this pathological process are analyzed. The main attention is paid to the consideration of new directions related to the use of monoclonal antibodies. The examples of applied in the therapy of multiple myeloma monoclonal antibodies to specific molecules on the membranes of myeloma cells are given, the mechanisms of their antitumor action are discussed. The importance of the effects of monoclonal antibodies, implemented by enhancing the antitumor potential of endogenous protective host systems, namely through modulation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity is underlined. The prospects of application of monoclonal antibodies in mono- or combined therapy of multiple myeloma and the need for further research towards development of new drugs based on antibodies and towards the detailed analysis of mechanisms of their antitumor action are substantiated.

Key words: multiple myeloma, immunotherapy, monoclonal antibodies.

For citation: Pazina T.Yu., Korneva E.A., Orlov D.S., Shamova O.V. Multiple myeloma: pathogenesis and new approaches to therapy. Patogenez. 2017; 15(1): 4–10 (In Russian).

For correspondence: Shamova Olga Valeryevna, Dr. biol. Sciences, Associate Professor, Head. Department of General Pathology and Pathophysiology «Institute of Experimental Medicine», St-Petersburg, Russia, e-mail: oshamova@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 16.11.2016

Введение

Множественная миелома (ММ) — лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся экспансией клона трансформированных плазматических клеток в костный мозг, сопровождающееся появлением моноклонального сывороточного белка (моноклональный иммуноглобулин, парапротеин, М-протеин) в крови и/или моче и приводящее к различным органным нарушениям: поражению костей скелета, анемии, гиперкальцемии и почечной недостаточности [1]. К основным клиническим проявлениям относятся костные боли, усталость, обусловленную анемией, нарушение функций почек и рецидивирующие инфекции. ММ составляет 1% от числа всех онкологических заболеваний и 10—13% от гематологических. Заболеваемость ММ по всему миру составляет около 100 000 случаев в год, в России — 1,7 случая на 100 000 населения, в США — 5—10 на 100 000 населения. В России ежегодно заболевает около 2000 человек и примерно столько же умирает [2].

Несмотря на существенный прогресс в терапии ММ в последние годы, данное заболевание является неизлечимым. Поэтому актуальность поиска новых препаратов для увеличения продолжительности и улучшения качества жизни больных ММ не вызывает сомнений, как и детальное изучение факторов, лежащих в основе патогенеза ММ, которое необходимо для выявления новых средств коррекции этого патологического процесса. В данном обзоре приводятся современные представления о патогенезе множественной миеломы и суммируется информация о подходах к терапии этого заболевания, причем основное внимание уделяется рассмотрению новых направлений, связанных с применением моноклональных антител.

Патогенез множественной миеломы

Ключевым звеном в реализации реакций гуморального иммунитета является дифференцировка В-клеток с формированием клонов плазматических клеток (плазмоцитов), продуцирующих антитела. В норме созревание плазмоцитов проходит при координации процессов клеточной дифференцировки, клеточного цикла и апоптоза [3]. Активация В-клеток в ответ на определенный антиген (пептидной природы в случае Т-зависимой или углеводной природы в случае Т-независимой) приводит к запуску процессов клеточного деления и является начальным этапом дифференцировки. В ходе Т-независимого ответа формируются IgM-продуцирующие плазматические клетки. В случае Т-зависимого ответа активированные лимфоциты (Т, В и дендритные клетки) образуют зародышевые центры во вторичных лимфоидных органах, в которых происходит антиген-зависимая дифференцировка, переключение изотипов тяжелых цепей иммуноглобулина и соматическая гипермутация V-региона [4, 5]. В процессе антигенной стимуляции В-лимфоциты могут элиминироваться путем апоптоза, дифференцироваться в долгоживущие В-клетки памяти, обеспечивающие быстрый иммунный ответ при повторном введении антигена, или становиться терминально дифференцированными плазматическими клетками с утраченной способностью к делению и реактивации [6]. Такие плазматические клетки мигрируют в костный мозг, где могут находиться от нескольких месяцев до нескольких лет, в зависимости от наличия цитокинов, секретируемых клетками стромы (например, ИЛ-6) [7].

Нарушения в процессе созревания и дифференцировки В-лимфоцитов в зародышевом центре приводят к образованию и накоплению клональных трансформированных клеток, что ведет к развитию основных лимфопролиферативных заболеваний, таких, как моноклональная гаммапатия неясного генеза, макроглобулинемия Вальденстрема и множественная миелома. Клетки ММ образуются в результате трансформации плазматических клеток, прошедших дифференцировку в зародышевом центре. Они находятся в различных участках костного мозга и способны к секреции только одного моноклонального белка, который обнаруживается в крови и/или моче больных ММ [6].

Для каждой стадии дифференцировки В-клеток установлен определенный фенотипический профиль, характеризующийся наличием следующих поверхностных молекул: для В-клеток памяти — CD19+CD20+CD45+CD38-/CD138+, для плазматических клеток — CD19-CD20-CD45-CD38+CD138+. Утрата свойства реагировать на антигенную стимуляцию связана с потерей или снижением способности экспрессировать В-ассоциированные маркеры CD19 и CD20 на мембранах этих клеток. Созревание плазматических клеток сопровождается понижением уровня экспрессии маркера CD45 и повышением экспрессии CD38 и CD138 [8]. CD138 (синдекан-1) участвует в обеспечении адгезии плазматических клеток к компонентам стромального микроокружения в костном мозге (КМ) [9].

Ключевым фактором развития ММ является взаимодействие малигнизированных клеток с компонентами костномозгового гемопоэтического микроокружения, служащего источником цитокинов и факторов роста. Данное взаимодействие осуществляется с участием поверхностных рецепторов (интегринов, селектинов и других молекул межклеточной адгезии) и приводит к повышению пролиферации опухолевых клеток, их выживаемости, миграции и устойчивости к химиотерапии. Так, например, в результате контакта клеток ММ с клетками стромы, опосредованного молекулами адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM1) и интегрином альфа 4 (VLA-4), возрастает продукция факторов роста ИЛ-6 и эндотелиального фактора роста сосудов, которые стимулируют ангиогенез.

Клетки стромы секретируют цитокины и факторы роста, такие, как ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-5, ИЛ-12, ИЛ-17, эндотелиальный фактор роста сосудов, инсулиноподобный фактор роста 1, белки семейства фактора некроза опухоли и трансформирующий фактор роста β -1 [10]. Сигнальные системы миеломных клеток и клеток стромы инициируют запуск антиапоптотических программ и активируют транскрипционные факторы NF- κ B и STAT-3, которые регулируют транскрипцию различных генов, в том числе ответственных за регуляцию клеточного цикла, адгезию и лекарственную резистентность. В присутствии ИЛ-6 активируется JAK-2/STAT-3 каскад в миеломных клетках, что ведет к их адгезии к другим клеткам КМ или внеклеточному матриксу и регулирует их выживаемость. Миеломные клетки также характеризуются повышенным содержанием антиапоптотического митохондриального белка Bcl-2, который является ключевым белком в регуляции апоптоза. Показано, что белок Bcl-2 играет важную роль в развитии лекарственной резистентности к дексаметазону и другим препаратам миеломными клетками [11].

Клетки множественной миеломы экспрессируют на своей поверхности молекулы адгезии: CD56, CD58, CD54 и другие [12]. Повышенная экспрессия CD138 на плазматической мембране миеломных клеток также является их характерной особенностью. Увеличение экспрессии CD138 способствует росту и выживаемости плазматических клеток благодаря его свойству связывать и модулировать активность белков внеклеточного матрикса, факторов роста и цитокинов. Основной вклад CD138 в патогенез ММ заключается в стимуляции ангиогенеза, что ведет к метастазированию и росту опухоли. Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), продуцируемый стромальными и миеломными клетками, также является активатором ангиогенеза, способствующим развитию опухолевого процесса. Свободный CD138 образует комплекс с VEGF, и данный комплекс, укрепившись в строме, воздействует на рецепторы эндотелиальных клеток, что усиливает их рост и обуславливает вовлечение в неоангиогенез [13].

Резорбция костной ткани происходит в результате дисбаланса между процессами резорбции и формирования кости за счет снижения функций и количества остеобластов и активации остеокластов. Определяющая роль в супрессии активности остеобластов принадлежит белку DKK-1 (англ. Dickkopf homolog 1), который экспрессируется клетками ММ и ингибирует сигнальный путь Wnt (англ. Wingless-type MMTV integration site family) [14]. Активация сигнального пути RANKL (англ. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) и действие макрофагального белка воспаления MIP-1 α (англ. macrophage inflammatory protein-1 alpha) активирует остеокласты. Хемокин MIP-1 α , который регулирует поздние стадии дифференцировки остеокластов, выявлен в большом количестве в костномозговом супернатанте у больных ММ. Усиление продукции RANKL клетками стромы и остеобластами, а также нарушение равновесия между RANKL и остеопротегерином (белок, подавляющий активность остеокластов и действующий как нейтрализующий рецептор для RANKL) в сторону RANKL, вызывает активацию остеобластов и их дифференцировку, что ведет к резорбции костной ткани [15]. В результате разрушения костной ткани происходит массовое высвобождение цитокинов, которые повышают пролиферацию и выживаемость миеломных клеток, и индуцируют секрецию про-ангиогенных молекул (например, VEGF) клетками стромы, которые влияют на структуру и плотность сосудов в костном мозге и также вовлечены в модуляцию опухолевого процесса [16]. Таким образом, взаимодействие клеток ММ с костномозговым микроокружением поддерживает их рост и жизнеспособность, а также регулирует функции остеобластов и остеокластов, что приводит к формированию очагов деструкции костной ткани.

Кроме того, важную роль в формировании ММ играют протеасомы. Протеасома расщепляет различные белки, в том числе регуляторные и контролирующие клеточный цикл молекулы. При ММ активизируется процесс протеолиза ингибитора NF- κ B — I κ B протеасомой, что приводит к активации NF- κ B и усилению экспрессии молекул клеточной адгезии (молекул адгезии сосудистого эндотелия 1 типа — VCAM-1, интегрина альфа 4 — VLA-4), что, в свою очередь, ведет к изменению межклеточных взаимодействий и секреции факторов ангиогене-

за. Антиапоптотическое действие NF- κ B осуществляется за счет повышения экспрессии гена Bcl-2, сопровождающегося подавлением экспрессии генов проапоптотических молекул, что также вносит вклад в развитие лекарственной резистентности и сохранение жизнеспособности клеток ММ [17].

Терапия множественной миеломы

В терапии ММ используются лекарственные средства, обладающие проапоптотическим действием, снижающие пролиферацию миеломных клеток и блокирующие ангиогенез. Долгое время для лечения ММ применялись цитостатики в виде моно- и комбинированной химиотерапии, однако лечение было не эффективным в связи с развитием лекарственной устойчивости миеломных клеток. Появление новых иммуномодулирующих препаратов, таких, как талидомид, леналидомид и ингибиторов протеасомы (бортезомиб, карфилзомиб) позволило повысить продолжительность жизни больных ММ. Еще одним направлением в лечении ММ является применение высокодозной химиотерапии с последующим назначением аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) [18].

Тактику лечения ММ для каждого больного подбирают индивидуально. Как правило, назначается высокодозная химиотерапия, а для больных моложе 65 лет показано применение высокодозной химиотерапии с последующим назначением аутоТГСК [19]. В качестве терапии первой линии ранее применяли различные программы, включающие такие противовоспалительные и цитостатические препараты, как мелфалан, преднизолон, дексаметазон, циклофосфамид, винкристин, доксорубицин. Однако высокая токсичность и быстрота развития химиорезистентности миеломных клеток к этим препаратам послужили препятствием для их успешного применения. Поэтому лекарственные средства, обладающие более избирательным действием на миеломные клетки (талидомид, леналидомид и бортезомиб) и применяемые для лечения больных с рецидивирующей/рефрактерной миеломой, стали использоваться в качестве терапии первой линии [10]. Разрабатываются и модифицированные формы ранее используемых лекарственных средств (например, пегилированный липосомальный доксорубицин) со сниженной токсичностью для нормальных клеток организма. В настоящее время для лечения ММ в клинике применяют пять различных классов препаратов: кортикостероиды (дексаметазон, преднизолон), алкилирующие агенты (мелфалан, циклофосфамид), иммуномодулирующие препараты (талидомид, леналидомид, помалидомид), ингибиторы протеасомы (бортезомиб, карфилзомиб), антрациклиновые антибиотики (доксорубицин) [21].

Новые направления в лечении множественной миеломы

Согласно статистике ММ является вторым по смертности гематологическим злокачественным заболеванием после неходжкинской лимфомы. За последние 25 лет заболеваемость ММ увеличилась более чем в 2 раза [22] и, несмотря на прогресс в изучении патогенеза этого заболевания и появление новых препаратов, ММ остается неизлечимым заболеванием, болезнь рецидивирует и развивается лекарственная устойчивость, что говорит о необхо-

димости разработки новых терапевтических средств для лечения ММ. Одним из таких направлений является иммунотерапия [23].

Моноклональные антитела. Моноклональные антитела (МоАТ) являются эффективными лекарственными препаратами для иммунотерапии раковых заболеваний. В последнее десятилетие МоАТ были разрешены для применения в клинике, и показан ряд их преимуществ по сравнению с низкомолекулярными ингибиторами. МоАТ, созданные против определенных лигандов, присутствующих на опухолевых клетках, способны индуцировать иммунный ответ, запускать иммунно-эффекторные механизмы и вызывать лизис опухолевых клеток. Иммуноглобулины, составляющие основу МоАТ, — это высокоспецифичные молекулы, которые распознают и удаляют чужеродные антигены из организма [24]. Молекула иммуноглобулина G состоит из четырех полипептидных цепей: двух одинаковых тяжелых цепей с молекулярной массой 50–77 кДа и двух идентичных легких с молекулярной массой 25 кДа. В состав легкой цепи входит два домена — один переменный (англ. V_L , variable domain of the light chain) и один константный (англ. C_L , constant domain of the light chain), а в состав каждой тяжелой цепи — один переменный (англ. V_H , variable domain of the heavy chain) и три константных (англ. C_{H1-3} , constant domains of the heavy chain) домена. Каждый из доменов, в основном, представляет собой β -складчатую структуру, сформированную из 7 антипараллельных β -тяжей, образующих два β -слоя. Структура каждого иммуноглобулинового домена стабилизирована за счет дисульфидной связи. Кроме того, дисульфидные связи соединяют легкие цепи с тяжелыми, а также тяжелые цепи между собой.

На первых этапах исследования МоАТ как средств иммунотерапии онкологических заболеваний использовались иммуноглобулины мыши, затем были созданы рекомбинантные препараты химерных антител, включающих переменную часть легкой и тяжелой цепи (V_L и V_H) IgG мыши и Fc часть иммуноглобулина человека. Так как мышиные и химерные антитела являются иммуногенами для человека, разработки в области генной инженерии позволили получить гуманизированные антитела с повышенной аффинностью к антигенам [25]. Гуманизированное антитело содержит только гиперпеременная часть иммуноглобулина мыши (CDR), отвечающий за комплементарное взаимодействие с антигеном. Антитела, полностью соответствующие иммуноглобулину человека, могут быть получены при помощи дисплея (фагового, рибосомного, дрожжевого) или линии трансгенных мышей (HuMAb-Mouse). У линии мышей HuMAb-Mouse инактивированы мышиные гены, кодирующие иммуноглобулины, и заменены на гены человека, что позволяет получать тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов человека [26].

Одним из примеров МоАТ является препарат антител к В-клеточному антигену CD20 — Ритуксимаб (Rituximab), который успешно применяется в клинике для лечения злокачественных заболеваний, связанных с малигнизацией В-клеток. Однако до недавнего времени МоАТ практически не применялись для проведения иммунотерапии ММ, так как их разработка была затруднена ввиду отсутствия уникального и конститутивно экспрессируемого на поверхности клеток ММ антигена [27]. В послед-

ние годы проведены многочисленные исследования и созданы МоАТ к белкам, уровень экспрессии которых на поверхности ММ клеток повышен, — CD38 [28], CD138 [29], CD56 [30], CD200 [31], CD40 [32], SLAMF7 [33], BCMA [34] и CD74 [35]. Исходя из того, что костномозговое микроокружение вносит вклад в рост, выживаемость и развитие резистентности к терапии при ММ, были получены МоАТ, которые блокируют различные цитокины и факторы роста, а также молекулы, участвующие во взаимодействии ММ клеток с клетками стромы (ИЛ-6, VEGF, RANKL, DKK1).

Разработка новых МоАТ и их применение в комбинации с другими препаратами для лечения ММ является перспективным направлением для повышения продолжительности и качества жизни больных ММ [36].

Терапевтические моноклональные антитела для лечения опухолевых заболеваний

Появление новых методов генной инженерии для разработки МоАТ позволило получать антитела различного размера, специфичности, аффинности, с пониженной собственной иммуногенностью. Клинические испытания мышиных МоАТ показали их недостатки — короткий период полувыведения, ксеногенность и ограниченную активность. Ксеногенная природа антител не позволяет задействовать систему комплемента и клеточные механизмы элиминации чужеродного антигена. Применение генно-инженерных методов позволило производить антитела с улучшенной аффинностью к целевым антигенам в большом количестве [11].

Производство первого химерного МоАТ к белку CD20 — упомянутого выше Ритуксимаба — и применение его в клинике повысило выживаемость больных лимфомой, а также заложило основы для разработки других МоАТ к определенным антигенам на поверхности опухолевых клеток [37]. Более того, Трастузумаб (Trastuzumab, Herceptin) — первое гуманизированное антитело к рецептору егВ-2, созданное для лечения рака молочной железы, показало не только блокирование роста опухолевых клеток, но и хорошую противоопухолевую активность в комбинации с другими препаратами [38].

Механизм действия моноклональных антител. Иммуноглобулины IgG используются для терапии опухолевых заболеваний и являются уникальными белками, обладающими различными функциями. Механизм противоопухолевых эффектов МоАТ может осуществляться двумя путями — как прямое или опосредованное действие. Для прямого действия МоАТ характерно блокирование функций сигнальных молекул или рецепторов (ингибирование процессов клеточного деления, репарации ДНК и ангиогенеза), активация апоптотических сигнальных путей, таргетная доставка токсинов в опухолевые клетки (МоАТ, конъюгированные с иммунотоксинами, доксорубицином, радиоизотопами). Непрямое действие МоАТ связано с активацией иммунного ответа и лизиса опухолевых клеток клетками иммунной системы за счет антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплементзависимой клеточной цитотоксичности (КЗЦ, CDCC — complement-dependent cellular cytotoxicity). Два последних механизма считаются основными в противоопухолевом действии МоАТ. АЗКЦ определяется распознаванием антител на поверхности опухолевых клеток, клетками иммунной

системы (ЕК клетками, макрофагами, нейтрофилами). КЗЦ — процесс, при котором активируется каскад белков комплемента и происходит лизис клеток-мишеней [25].

Эффективность терапевтических антител зависит от их аффинности к Fc рецепторам — CD16 и CD32, являющиеся активирующими рецепторами на поверхности иммунных клеток. Процесс биотехнологического производства рекомбинантных препаратов терапевтических антител обычно связан с использованием клеточных линий CHO (Chinese hamster ovary cells), миеломных клеток мыши (nS0, SP2/0) и мышинных гибридом. Почти все производимые антитела имеют фукозилированный углеводный компонент и, как следствие, сниженную аффинность Fc фрагмента к Fc рецепторам. Фукозилирование углеводного компонента IgG катализируется ферментом α -1,6-фукозилтрансферазой (FUT-8). Необратимая инактивация гена Fut-8 позволяет получать нефукозилированные антитела, обладающие повышенной аффинностью к Fc рецепторам и, как следствие, увеличенной в 50—100 раз АЗКЦ. Данное направление в генной инженерии представляется одним из перспективных путей конструирования нового поколения более эффективных МоАТ [24, 39].

Антитела к антигенам на мембранах клеток множественной миеломы. Ввиду низкой экспрессии белка CD20 на поверхности миеломных клеток в терапии ММ не применяются антитела против CD20. В клинических испытаниях Ритуксимаба для лечения рецидивирующей ММ показано значительное уменьшение циркулирующих В-клеток и IgM в периферической крови больных, однако улучшения установлено не было [40]. Существуют исследования, показывающие, что наличие CD20+ фенотипа ММ клеток связано с цитогенетическими изменениями t(11,14)(q13, q32) и плохим прогнозом. Применение ритуксимаба для таких больных ММ показало улучшение клинической картины [41].

CD40 участвует в активации и миграции ММ клеток. МоАТ к CD40 — SGN-40 и HCD122/lucatumumab продемонстрировали цитотоксическое действие *in vitro* за счет супрессии пролиферации, проапоптотического действия и АЗКЦ. В результате проведения первой фазы клинических испытаний данных МоАТ показано, что они эффективны в качестве монотерапии и не обладают иммуногенностью [42, 43].

CD38 — молекула, которая экспрессируется на поверхности многих лимфоидных опухолевых клеток, в том числе и ММ. Долгое время исследования МоАТ к CD38 как противоопухолевых препаратов не имели успеха. Разработка человеческого IgG₁ против CD38 с использованием линии трансгенных мышей NuMax-Mouse позволила получить препарат Daratumumab. Данное МоАТ против CD38 при взаимодействии с клетками ММ индуцирует в них процесс апоптоза, а также повышает АЗКЦ и КЗЦ. Daratumumab был разрешен для лечения ММ у пациентов с рефрактерной ММ после получения трех и более линий терапии иммуномодулирующими препаратами и ингибиторами протеасомы [28, 44].

VT062 — химерное МоАТ к CD138, конъюгированное с цитотоксическим производным майтанзиноида. Результаты первой фазы клинических испытаний подтвердили наличие противомиеломной активности. Аналогичным действием обладает Lorvotuzumab, МоАТ против CD56, также конъюгированное с цитотоксическим агентом [45, 46].

Около 70% опухолей ММ экспрессируют мембранный белок CD74, который является шапероном белков главного комплекса гистосовместимости класса II. Milatuzumab — гуманизированное МоАТ к CD74, в присутствии которого наблюдается ингибирование роста и индукция апоптоза ММ клеток *in vitro*. Результаты первой фазы клинических испытаний показали стабилизацию заболевания до 12 недель для некоторых пациентов [47].

Рецептор SLAMF7 (CD2 subset-1, CRACC, CS1) — мембранный гликопротеин типа I, принадлежащий к семейству лимфоцитаактивирующих молекул SLAM (англ. signaling lymphocyte activating-molecule receptor family) и экспрессирующийся на поверхности клеток ММ и плазматических клеток. Этот рецептор был также обнаружен на мембранах ЕК и Т-клеток, активированных моноцитов, дендритных клеток и В клеток [48]. SLAMF-7 является как рецептором, так и лигандом, то есть взаимодействует с SLAMF-7 на поверхности других клеток. К семейству SLAM относится шесть гликопротеинов, которые обладают сходной структурой — содержат внеклеточный домен, состоящий из двух или четырех Ig-подобных доменов, и внутриклеточный домен, состоящий из одного или нескольких иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITSM). В ЕК клетках SLAMF-7 является активирующим рецептором [49]. Функция SLAMF-7 в клетках ММ еще не до конца изучена, предполагается, что SLAMF-7 участвует в патогенезе ММ, увеличивая клеточную адгезию, стимулируя рост клеток ММ и их взаимодействие с клетками стромы [50].

Наличие высокого уровня экспрессии SLAMF-7 на поверхности ММ послужило основанием разработки гуманизированного МоАТ против SLAMF-7 — HuLuc63 (Elotuzumab). HuLuc63 обладает противоопухолевым действием *in vivo* и *in vitro*, а именно повышая АЗКЦ в отношении клеточных линий ММ, клеток, полученных от больных ММ, а также клеток ММ, резистентных к химиотерапии [51]. По результатам первой и второй фазы клинических испытаний Elotuzumab в качестве монотерапии не имел успеха, однако, в комбинации с бортезомибом и дексаметазоном или леналидомидом и дексаметазоном значительно увеличил выживаемость больных ММ [52]. По результатам третьей стадии клинических испытаний, при применении Elotuzumab в комбинации с леналидомидом и дексаметазоном наблюдалось улучшение выживаемости без прогрессирования заболевания. По результатам клинических испытаний Elotuzumab был разрешен в США Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами (FDA) для лечения ММ у рецидивирующих больных, получивших от одной до трех линий терапии [53].

Заключение

Одним из тяжелых и до настоящего времени практически не поддающихся лечению опухолевых заболеваний является множественная миелома. Детальное изучение патогенеза ММ составляет актуальную задачу медицинских исследований, так как предоставляет информацию для определения оптимальных путей коррекции этой патологии, позволяющих улучшить качество жизни пациентов с ММ. Одними из перспективных препаратов для лечения онкологических заболеваний являются моноклональные антитела, специфичные к определенным поверхно-

ственным молекулам клеток ММ или к различным цитокинам и факторам роста, а также молекулы, участвующие во взаимодействии ММ клеток с клетками стромы. Важным свойством ряда МоАТ является их способность взаимодействовать с эндогенными защитными системами организма, участвующими в контроле опухолеобразования — естественными киллерными клетками, системой комплемента. В результате этого взаимодействия повышается антителозависимая клеточная цитотоксичность и комплементзависимая цитотоксичность. Многообразие эффектов МоАТ дает основание рассматривать подобные препараты как перспективные лекарственные средства, применение которых, в том числе и в комбинации с другими противоопухолевыми соединениями, позволяет повысить качество и продолжительность жизни больных ММ. Дальнейшее детальное изучение патогенеза ММ поможет разработать более эффективные МоАТ для лечения ММ.

Список литературы

- Mahindra A, Laubach J, Raje N, Munshi N, Richardson PG, Anderson K. Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. *Nature reviews Clinical oncology*. 2012; 9(3): 135-43.
- Bessmeltsev S.S. Multiple myeloma (pathogenesis, clinical features, diagnosis, differential diagnosis). Part I. *Klinicheskaya onkologiya*. 2013; 6(3): 237-57 (in Russian).
- Zueva E.E., Rusanova E.B., Slobodnyuk K.Yu., Salogub G.N. Multiple myeloma: current directions of immunological monitoring. *EF. Onkologiya, gematologia i radiologia*. 2011; (4): 31-37. (in Russian)
- Martins G., Calame K. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annual review of immunology*. 2008; 26: 133-69.
- Shapiro-Shelef M., Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews Immunology*. 2005; 5(3): 230-42.
- Anderson K.C., Carrasco R.D. Pathogenesis of myeloma. *Annual review of pathology*. 2011; 6: 249-74.
- Fairfax K.A., Kallies A., Nutt S.L., Tarlinton D.M. Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Seminars in immunology*. 2008; 20(1): 49-58.
- Tembhare P.R., Yuan C.M., Venzon D., Braylan R., Korde N., Manasanch E., et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leukemia research*. 2014; 38(3): 371-6.
- Kharchenko M.F., Bessmeltsev S.S. Meaning of proteoglycans in the pathogenesis of multiple myeloma. *Gematologiya*. 2010; 11(33): 404-23.
- Podar K., Tai Y.T., Lin B.K., Narsimhan R.P., Sattler M., Kijima T. et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277(10): 7875-81.
- Anderson K.C. Targeted therapy for multiple myeloma. *Seminars in hematology*. 2001; 38(3): 286-94.
- Cook G., Dumbiar M., Franklin I.M. The role of adhesion molecules in multiple myeloma. *Acta haematologica*. 1997; 97(1-2): 81-9.
- Purushothaman A., Uyama T., Kobayashi F., Yamada S., Sugahara K., Rapraeger A.C. et al. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood*. 2010; 115(12): 2449-57.
- Tian E., Zhan F., Walker R., Rasmussen E., Ma Y., Barlogie B. et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2003; 349(26): 2483-94.
- Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423(6937): 337-42.
- Roodman G.D. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Journal of cellular biochemistry*. 2010; 109(2): 283-91.
- Matthews G.M., de Matos Simoes R., Dhimolea E., Sheffer M., Gandolfi S., Dashevsky O. et al. NF-kappaB dysregulation in multiple myeloma. *Seminars in cancer biology*. 2016; 39: 68-76.
- Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A., Lacy M.Q., Hayman S.R., Buadi F.K., et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008; 111(5): 2516-20.
- Kumar L., Iqbal N., Mookerjee A., Verma R.K., Sharma O.D., Batra A. et al. Complete response after autologous stem cell transplant in multiple myeloma. *Cancer medicine*. 2014; 3(4): 939-46.
- Anderson K.C. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor-microenvironmental interactions. *Experimental hematology*. 2007; 35(4 Suppl 1): 155-62.
- Bessmeltsev S.S. Multiple myeloma (pathogenesis, clinical features, diagnosis, differential diagnosis). Part II. *Klinicheskaya onkologiya*. 2013; 6(4): 35. (in Russian).
- Kyle R.A., Vincent Rajkumar S. Treatment of multiple myeloma: an emphasis on new developments. *Annals of medicine*. 2006; 38(2): 111-5.
- Yi Q. Novel immunotherapies. *Cancer journal*. 2009; 15(6): 502-10.
- Deev S.M., Lebedenko E.N. Modern technology of non-naturally occurring antibodies for clinical use. *Acta Naturae*. 2009; (1): 32-50. (in Russian).
- Weiner L.M., Surana R., Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature reviews Immunology*. 2010; 10(5): 317-27.
- Munshi N.C. AKC. Advances in Biology and Therapy of Multiple Myeloma: Springer. 2013; Available at: <http://www.springer.com/gp/book/9781461446651>
- Treon S.P., Shima Y., Grossbard M.L., Preffer F.I., Belch A.R., Pilarski L.M. et al. Treatment of multiple myeloma by antibody mediated immunotherapy and induction of myeloma selective antigens. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2000; 11 Suppl 1: 107-11.
- Laubach J.P., Richardson P.G. CD38-Targeted Immunotherapy in Refractory Multiple Myeloma: A New Horizon. *Clinical cancer research*. 2015; 21(12): 2660-2.
- Tassone P., Goldmacher V.S., Neri P., Gozzini A., Shamma M.A., Whiteman K.R. et al. Cytotoxic activity of the maytansinoid immunocjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells. *Blood*. 2004; 104(12): 3688-96.
- Ocio E.M., Richardson P.G., Rajkumar S.V., Palumbo A., Mateos M.V., Orlovski R. et al. New drugs and novel mechanisms of action in multiple myeloma in 2013: a report from the International Myeloma Working Group (IMWG). *Leukemia*. 2014; 28(3): 525-42.
- Kretz-Rommel A., Qin F., Dakappagari N., Cofield R., Faas S.J., Bowdish K.S. Blockade of CD200 in the presence or absence of antibody effector function: implications for anti-CD200 therapy. *Journal of immunology*. 2008; 180(2): 699-705.
- Bensinger W., Maziarz R.T., Jagannath S., Spencer A., Durrant S., Becker P.S. et al. A phase 1 study of lcatatumumab, a fully human anti-CD40 antagonist monoclonal antibody administered intravenously to patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *British journal of haematology*. 2012; 159(1): 58-66.
- Palumbo A., Sonneveld P. Preclinical and clinical evaluation of elotuzumab, a SLAMF7-targeted humanized monoclonal antibody in development for multiple myeloma. *Expert review of hematology*. 2015; 1-11.
- Tai Y.T., Mayes P.A., Acharya C., Zhong M.Y., Cea M., Cagnetta A. et al. Novel anti-B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma. *Blood*. 2014; 123(20): 3128-38.
- Stein R., Gupta P., Chen X., Cardillo T.M., Furman R.R., Chen S. et al. Therapy of B-cell malignancies by anti-HLA-DR humanized monoclonal antibody, IMMU-114, is mediated through hyperactivation of ERK and JNK MAP kinase signaling pathways. *Blood*. 2010; 115(25): 5180-90.
- Tai Y.T., Anderson K.C. Antibody-based therapies in multiple myeloma. *Bone marrow research*. 2011; 2011: 924058.
- Gemmel C., Cremer F.W., Weis M., Witzens M., Moldenhauer G., Konieczek K.H. et al. Anti-CD20 antibody as consolidation therapy in a patient with primary plasma cell leukemia after high-dose therapy and autologous stem cell transplantation. *Annals of hematology*. 2002; 81(2): 119-23.
- Spector N.L., Blackwell K.L. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; 27(34): 5838-47.
- Mori K., Iida S., Yamane-Ohnuki N., Kanda Y., Kuni-Kamochi R., Nakano R. et al. Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies. *Cytotechnology*. 2007; 55(2-3): 109-14.

40. Zojer N., Kirchbacher K., Vesely M., Hubl W., Ludwig H. Rituximab treatment provides no clinical benefit in patients with pretreated advanced multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2006; 47(6): 1103-9.
41. Robillard N., Avet-Loiseau H., Garand R., Moreau P., Pigneau D., Rapp M.J. et al. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood*. 2003;102(3): 1070-1.
42. Tai Y.T., Catley L.P., Mitsiades C.S., Burger R., Podar K., Shringpaure R. et al. Mechanisms by which SGN-40, a humanized anti-CD40 antibody, induces cytotoxicity in human multiple myeloma cells: clinical implications. *Cancer research*. 2004; 64(8): 2846-52.
43. Tai Y.T., Li X., Tong X., Santos D., Otsuki T., Catley L. et al. Human anti-CD40 antagonist antibody triggers significant antitumor activity against human multiple myeloma. *Cancer research*. 2005; 65(13): 5898-906.
44. Nijhof I.S., Groen R.W., Noort W.A., van Kessel B., de Jong-Korlaar R., Bakker J. et al. Preclinical Evidence for the Therapeutic Potential of CD38-Targeted Immuno-Chemotherapy in Multiple Myeloma Patients Refractory to Lenalidomide and Bortezomib. *Clinical cancer research*. 2015; 21(12): 2802-10.
45. Ikeda H., Hideshima T., Fulciniti M., Lutz R.J., Yasui H., Okawa Y. et al. The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic Maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009; 15(12): 4028-37.
46. Tassone P., Gozzini A., Goldmacher V., Shammas M.A., Whiteman K.R., Carrasco D.R. et al. In vitro and in vivo activity of the maytansinoid immunoconjugate huN901-N2'-deacetyl-N2'-(3-mercaptopropyl)-maytansine against CD56+ multiple myeloma cells. *Cancer research*. 2004; 64(13): 4629-36.
47. Berkova Z., Tao R.H., Samaniego F. Milatuzumab — a promising new immunotherapeutic agent. *Expert opinion on investigational drugs*. 2010; 19(1): 141-9.
48. Hsi E.D., Steinle R., Balasa B., Szmania S., Draksharapu A., Shum B.P. et al. CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008; 14(9): 2775-84.
49. Cannons J.L., Tangye S.G., Schwartzberg P.L. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annual review of immunology*. 2011; 29: 665-705.
50. Veillette A., Guo H. CS1, a SLAM family receptor involved in immune regulation, is a therapeutic target in multiple myeloma. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2013; 88(1): 168-77.
51. Tai Y.T., Dillon M., Song W., Leiba M., Li X.F., Burger P. et al. Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. *Blood*. 2008; 112(4): 1329-37.
52. van Rhee F., Szmania S.M., Dillon M., van Abbema A.M., Li X., Stone M.K. et al. Combinatorial efficacy of anti-CS1 monoclonal antibody elotuzumab (HuLuc63) and bortezomib against multiple myeloma. *Molecular cancer therapeutics*. 2009; 8(9): 2616-24.
53. Lonial S., Dimopoulos M., Palumbo A., White D., Grosicki S., Spicka I. et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *The New England journal of medicine*. 2015; 373(7): 621-31.

Сведения об авторах:

Пазина Татьяна Юрьевна (Pazina T.Yu.) — аспирант отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Корнева Е.А. (Korneva E.A.) — доктор мед. наук, профессор, академик РАН, главн. научн. сотр. отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Орлов Дмитрий Сергеевич (Orlov D.S.) — канд. мед. наук, доцент, зав. лаб. иммунопатофизиологии отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

Шамова Ольга Валерьевна (Shamova O.V.) — доктор биол. наук, доцент, зав. отделом общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», e-mail: oshamova@yandex.ru

УДК 616-02

Гормезис физических нагрузок и умеренного питания: здоровье и долголетие

Пальцын А.А.^{1,2}¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, Москва, ул. Балтийская, 8² — Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования Российская медицинская Академия последипломного образования, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

Гормезис — благоприятное действие на здоровье малой дозы фактора, вызывающего в большей дозе повреждение. Это один из способов эволюции живой природы. Механизмы действия на здоровье физических нагрузок и умеренного питания во многом, хотя и не во всем, похожи. Расходование продуктов промежуточного метаболизма физической работой или недостаток этих продуктов в скудной пище одинаково создают отрицательный энергетический баланс, окислительный стресс. В зависимости от количественного выражения биологическое значение окислительного стресса изменяется от нормального необходимого для жизни уровня через уровень, в различной степени повреждающий клетку, и до уровня апоптоза и некроза. Окислительный стресс — непосредственная причина повреждения и гибели клеток при многих распространенных болезнях: атеросклерозе, гипертонической болезни, диабете, раке, ожирении, остеопорозе, депрессии, нейродегенеративных болезнях, деменции, саркопении. Миллионы лет эволюции движение и желание поесть развивались комплексно, поскольку голод — главная причина, заставляющая двигаться животных. Великолепное развитие живой природы доказывает, что к некоторому уровню окислительного стресса, развивающегося при движении и недостатке пищи, организмы приспособляются. Более того, приспособление осуществляется по замечательному эволюционному принципу гормезиса: повторяющиеся воздействия повышают устойчивость организма и позволяют в дальнейшем переносить без вреда воздействия большей интенсивности. Поэтому физические нагрузки и ограничение в еде есть естественный, сформированный эволюционным отбором, прием профилактики и лечения указанных болезней. Он заслуживает дальнейшего изучения и использования.

Ключевые слова: гормезис; окислительный стресс; физические нагрузки; умеренное питание.

Для цитирования: Пальцын А.А. Гормезис физических нагрузок и умеренного питания: здоровье и долголетие. Патогенез. 2017; 15(1): 11–18.

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, д.б.н., профессор, гл. научн. сотр. Института общей патологии и патофизиологии РАН, Москва, Россия, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.01.2017

Hormesis of exercise and calorie restriction: health and longevity

Paltsyn A.A.^{1,2}¹ — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, ul. Baltijskaya, 125315, Moscow, Russian Federation² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russia

Hormesis is a favorable action on health of a small dose of the factor causing damage in a bigger dose. This is one of the manners of the evolution of nature. Mechanisms of action of physical activities and calorie restriction on health are similar in many respects, though not in everything. The expenditure of intermediate metabolism products by physical work or by a lack of these products in poor food is equally create a negative energy balance, an oxidative stress. Depending on quantitative magnitude, the biological meaning of an oxidative stress changes from the normal level, necessary for life, through the level which damages cells in various degrees and to the level of apoptosis and necrosis. Oxidative stress is the immediate cause of cell damage and death in many widespread diseases: atherosclerosis, idiopathic hypertension, diabetes, cancer, obesity, osteoporosis, depression, neurodegenerative diseases, dementia, sarcopenia. During millions of years of evolution, the movement and desire to eat were developed comprehensively as hunger is the main reason that makes animals move. Excellent development of wildlife proves that there is a certain oxidative stress level developing under the movement and a lack of food to that organisms adapt. Moreover, adaptation is carried out by the remarkable evolutionary principle of hormesis: the repeating exposures increase resistance of an organism and allow to withstand further without harm impact of greater intensity. Therefore, physical activity and calorie restriction is a natural way of the prevention and treatment of previously mentioned diseases formed by evolutionary selection. It is worthy of further study and use.

Key words: hormesis; oxidative stress; physical exercise; calorie restriction.

For citation: Paltsyn A.A. Hormesis of exercise and calorie restriction: health and longevity. Patogenez. 2017; 15(1): 11–18 (In Russian).

For correspondence: Paltsyn Alexander Alexandrovich, Doctor of Biological Sciences, Professor, Ch. Scientific. Comp. Institute of General Pathology and Pathophysiology RAS, Moscow, Russia, e-mail: lrrp@mail.ru

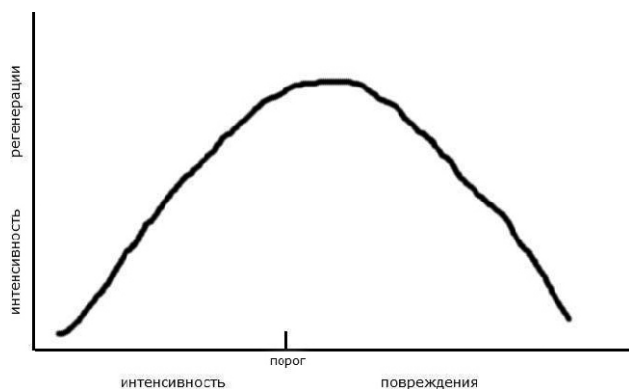
Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 12.01.2017

Гормезис — благоприятное действие на здоровье малой дозы фактора, вызывающего в большей дозе повреждение. Всякое воздействие среды на организм вызывает приспособительную реакцию организма. На повреждающее действие организм отвечает восстановлением, регенерацией. Для огромного числа испытанных факторов и веществ зависимость: доза воздействия — эффект воздействия описывается кривой, похожей на перевернутую букву U латинского алфавита (рисунок). Если эффектом обозначить благоприятное действие — регенерацию и вводить его значения по ординате, то до какой-то величины (порога) нарастание силы/дозы воздействия (вводимой по абсциссе) будет повышать интенсивность регенерации — восходящая ветвь перевернутой U. При дозе фактора, превышающей порог, в его действии станет преобладать повреждение (нисходящая ветвь). Зависимость доза-эффект нелинейная. Такой ответ организма стали называть гормезисом (non-linear (hormetic) dose-response model).

В современном мире особую актуальность приобрел вопрос о гормезисе при действии радиации. Причины очевидны. Обеспокоенность населения последствиями военных конфликтов (Япония, Сербия). Повышение радиоактивного фона вследствие испытаний ядерного оружия, аварий на атомных электростанциях, подводных лодках, загрязнения среды радиоактивными материалами. Развился страх осложнений лучевой и радиоизотопной диагностики и терапии. И все же главный повод краткого отвлечения к радиационному гормезису в этой статье о гормезисе физических нагрузок и питания не актуальность вопроса, а распространенное представление о том, что гормезиса в радиологии не существует. Утвердилась модель не гормезисной, а линейной (безпороговой) доза-эффект зависимости (linear no-threshold (LNT) dose-response model). Модель была принята Академией Наук США в 1956 году как итог работы группы генетиков во главе с Нобелевским лауреатом Германом Мюллером по проблеме: биологические эффекты атомной радиации. По накатанной в современном мире практике слепого перенимания американских стандартов, модель приобрела всеобщее распространение. Приверженность безпороговой модели обуславливала экстраполяцию патогенного действия высоких доз радиации на действие малых доз. Считали, что малые дозы тоже патогенны, только в меньшей степени. Иными словами, утверждалось, что безопасной, а тем более полезной, дозы радиации не существует. Однако результаты исследований на разных объектах от бактерий до человека представили много примеров того, что радиация не является исключением в правиле гор-



Зависимость «доза воздействия — эффект воздействия».

мезиса. Реакцией на эти результаты стали статьи многих, в том числе и американских авторов, с критикой модели LNT. Причем не только с научной, но и с нравственной позиции. Маститый радиобиолог из Массачусетского университета E.J. Calabrese назвал одну из своих статей: «On the origins of the linear no-threshold (LNT) dogma by means of untruths, artful dodges and blind faith» (Создание догмы LNT враньем, хитрыми уловками и слепой верой) [1]. Статья радиобиолога из Калифорнийского университета C.S. Marcus названа тоже выразительно: «Time to Reject the Linear No-Threshold Hypothesis and Accept Thresholds and Hormesis: A Petition to the U.S. Nuclear Regulatory Commission» (Пора отвергнуть LNT гипотезу и принять идею порога и гормезиса: петиция Комиссии США по ядерному регулированию) [2]. В качестве доказательства радиационного гормезиса привожу результат одного из клинических исследований. В статье Lehrer и Rosenzweig [3] приведена частота рака легкого у жителей штатов с высоким (последствия испытаний атомной бомбы) и низким уровнем радиации. Частота рака у первых (как у мужчин, так и у женщин) была ниже ($p < 0,001$). В исследовании учитывался важный для этой болезни фактор риска — курение.

Написание предыдущего абзаца понадобилось для того, чтобы исправить ошибку Академии Наук США и не вызывать у читателя сомнения в универсальности принципа гормезиса. Универсальность обуславливается главной особенностью живой материи — способностью приспособляться к среде. Лучшее доказательство всеобщности принцип гормезиса — эволюционная теория Дарвина. На Земле есть радиоактивный фон, обусловленный космическим излучением и радиоактивным распадом компонентов земной коры. Этот фон нарушает структуру ДНК всех живых клеток. Но существование и великолепное развитие живой природы доказывают, что к фоновому уровню нарушений природа приспособилась (создала систему репарации ДНК). Фон в разных регионах не одинаковый, значит и уровень приспособления различен, то есть меняется соответственно силе действующего фактора, что и выражается теорией гормезиса.

В этой статье будет рассмотрено, главным образом, приложение теории к работе мозга как области наиболее широкого интереса и задействованной во всех частных вопросах здоровья и долголетия. Изменения в мозге интегрируют ответ всех физиологических систем тела на режим физических нагрузок и питания. Другая причина акцента на мозге в том, что и движение, и питание проблемы энергетические, а мозг энергетически наиболее требовательный орган, наиболее чувствительный к уровню производства АТФ, раньше и острее других систем реагирующий на изменения этого уровня.

Необходимость движения и питания не менее постоянные условия сохранения жизни, чем необходимость нейтрализовать действие радиоактивного фона. Поиск воды и пищи, поиск и создание убежища, поиск и соединение с половым партнером, убежание от хищника и погоня за жертвой, сезонные миграции — по сути, любые сформированные эволюцией действия по поддержанию жизни представляют собою физическую активность, энергетически обеспечиваемую питанием. В нормальном организме эта активность целесообразна, а, следовательно, неразрывно связана с когнитивной активностью. С получением информации об окружающей среде, оценкой информации, обучением на успехах и ошибках, хра-

нением информации и использованием её в форме рациональных движений. Когнитивный процесс даже тогда, когда он осуществляется без одновременно совершающегося движения, в значительной мере осуществляется в виде двигательных представлений.

В эволюции утомление и голод были наиболее постоянными стрессорными факторами для организма, прежде всего, для мышц и для мозга. Следует уточнить значение слова голод в данной статье. Голод в смысле постоянного или длительного недостатка пищи для полного обеспечения энерготрат организма был на протяжении всей истории человечества и остается в наше время самым распространенным патогенным фактором [4]. Однако в нашей статье речь пойдет не о патогенном, а о лечебном действии голода или, точнее, умеренного питания. Комфортабельные особенности современной цивилизации (сверхраспространение транспортных средств, механизмов, заменяющих или облегчающих физическую работу человека, малоподвижных форм трудовой деятельности, предприятий быстрого питания и др.) вовлекли большие массы населения в противоположное голоду состояние — переизбыток. Треть современного человечества страдает от избыточного веса и ожирения [5] — это мера актуальности обсуждаемого вопроса.

Механизмы действия на здоровье физических нагрузок и умеренного питания во многом, хотя и не во всем, одинаковы. Умеренное питание — понятие неконкретное. В англоязычной литературе часто используется термин ограничение калорийности (*calorie restriction*), но в нем определенности не больше, чем в русском умеренном питании. Соответственно обсуждаемой проблеме — здоровье и долголетие я буду словами умеренное питание обозначать любое ограничение количества или состава пищи, оговаривая детали в каждом конкретном случае. В контексте нашей темы умеренность должна пресекать избыточность, не превращаясь в недостаточность питания.

Причина сходного действия на здоровье нагрузок и ограничения в пище очевидна: миллионы лет эволюции движение и желание поесть развивались комплексно, поскольку голод — главная причина, заставляющая двигаться и растительноядное и хищное животное. Питание снабжает энергией тело, а движение расходует энергию. Сходство действия нагрузок и умеренного питания создано эволюцией, которая сохраняла и развивала тех, кто мог без губительных последствий долго бежать и долго голодать. По теории гормезиса эволюция оставляла на Земле тех, для кого случавшиеся нагрузки и голодания не превышали порог приспособительного (а не разрушительного) ответа.

Расходование продуктов промежуточного метаболизма физической работой или недостаток этих продуктов в скудной пище одинаково создают отрицательный энергетический баланс. Последний, будучи в подпороговой величине, оказывает ряд благотворных действий, в частности подавляет секрецию провоспалительно действующих адипокинов, снижает превращение триптофана в кинуренин и вероятность нейропсихиатрических расстройств. Предотвращение ускоренного распада триптофана — важный фактор нормального биосинтеза серотонина и его производного — гормона эпифиза, регулятора циркадных ритмов — мелатонина [6].

Подобно продолжительной физической работе достаточно длительное (12–16 часов) голодание уменьшает запас гликогена в печени, вызывая этим снижение содержа-

ния глюкозы в крови на 20% и более. В этих условиях происходит мобилизация из адипоцитов жирных кислот и превращение их в печени в кетоновые тела. Они, при сниженном содержании глюкозы, становятся важным энергетическим субстратом для мышц и мозга. Недавно были обнаружены нейропротективные и сигнальные функции кетоновых тел, их способность ингибировать гистоновые деацетилазы [7] и стимулировать продукцию BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*, нейротрофический фактор мозга) [8]. Недостаток пищи уменьшает оксидативный стресс и воспалительные реакции, стимулирует биогенез митохондрий и нейрогенез в гиппокампе [9].

Движение — основной способ борьбы за существование. Оно обеспечивается не только мышцами, но, по существу, всеми органами и системами. Острая физическая нагрузка учащает ритмы сердца и дыхания, увеличивает концентрацию в крови глюкокортикоидов, катехоламина и глюкозы, повышает артериальное давление, стимулирует врожденный иммунитет, увеличивает расход энергии в мозге, мышцах и других органах [10].

Всеобщность охвата движением систем организма обуславливает возможность профилактического и лечебного действия нагрузок при многих болезнях. Приведу один выразительный пример. В последние годы стало очевидно, что почти все органы и ткани являются эндокринными железами. Самая крупная из них конечно мышцы. Сейчас известно много миокинов, а предполагается, что реальное их число более 50 [11]. Экспрессия и секреция большинства миокинов включается или усиливается сокращениями мышц. Огромное разнообразие регулирующих влияний, создаваемое даже не вообще мышцами, а только одним из миокинов — PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*) иллюстрируется тем фактом, что он индуцирует транскрипцию 984 генов и ингибирует транскрипцию 727 генов [12].

В афористической но, по сути, верной форме принцип гормезиса выражен фразой, приписываемой Ницше: «что не убивает, то делает меня сильнее». Рассматривая это положение в менее категоричном, менее эмоциональном, но зато более точном (научном) смысле, следует искать в физических нагрузках и в ограничении питания повреждающий фактор, недостаточный по силе воздействия, чтобы вызвать смерть организма, но достаточный, чтобы вызвать приспособительный ответ и сделать организм сильнее. Самый распространенный повреждающий фактор — окислительный (оксидативный) стресс.

Все обусловленные движением изменения в организме энергетически обеспечиваются повышением продукции и расходования АТФ. При производстве митохондриями АТФ (окислительном фосфорилировании) постоянно образуются содержащие кислород молекулы, легко вступающие в химические реакции — свободные радикалы кислорода: супероксид, гидроксил, перекись водорода. Другое название таких молекул: реактивные формы кислорода — *reactive oxygen species (ROS)*. При дыхании появляются и реактивные формы азота — *reactive nitrogen species (RNS)*: оксид азота, пероксинитрит. В покое ROS и RNS образуются в небольших количествах и устраняются (восстанавливаются) со скоростью равной скорости их появления. Восстановление ROS осуществляется комплексом ферментов, наиболее известны из них супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза. Участвуют в этом процессе и неферментные антиоксиданты: глутатион, ти-

оредоксин, витамины С и Е [13]. Одной из антистрессовых (устраняющих последствия стресса, вызванного избытком ROS) реакций является ускоренное образование белков теплового шока, в частности, шаперонов: HSP-70 (heat-shock protein 70) и GRP-78 (glucose-regulated protein 78) [14]. Равновесие скоростей образования и устранения ROS момент ответственный, поскольку ROS не только вредный побочный продукт фосфорилирования, но и сигнальные молекулы, увеличение их концентрации вызывает клеточный ответ на события в митохондриях. Сигналы воспринимаются как геномом митохондрий, так и геномом ядра [15, 16]. В сложных взаимодействиях сигнальных молекул при окислительном стрессе прямое действие ROS и RNS на геном может усиливаться их опосредованным действием через промежуточные сигнализаторы, транскрипционные факторы: NF- κ B (nuclear factor κ B-light-chain-enhancer of activated B cells); HIF-1 (hypoxia inducible factor-1); mtTFA (mitochondrial transcription factor A); PGC1 α и другие транскрипционные факторы, их больше 70 [13, 15]. Во всех случаях повышения концентрации ROS, в нейронах снижается содержание кислорода и глюкозы, повышается выход в межклеточное пространство глутамата. Активация глутаматных рецепторов способствует проникновению в клетку избыточного количества ионов Na⁺ и Ca²⁺. Возрастает потребность в АТФ для восстановления трансмембранного градиента ионов. Ионы кальция наряду с ROS и несвернутыми белками (unfolded protein response — UPR) становятся сигналами митохондрий, вызывающими непосредственный и через транскрипционные факторы ответ генома клетки на стресс [17, 18]. Сигналы ROS и Ca²⁺ нормальный, выработанный эволюцией механизм регулирования многих жизненно важных процессов: транскрипции, ферментативных функций, апоптоза, клеточного цикла, клеточного роста и адгезии, хемотаксиса, метаболизма глюкозы, избавления от генетически измененных клеток, двигательной активности. Конечно, жизнь не может существовать без постоянного приспособления уровня энергетических затрат к изменяющимся условиям среды и, следовательно неизбежного изменения концентрации ROS в процессе аэробного дыхания. Концентрация ROS увеличивается при любых гипоксических состояниях, возникает оксидативный стресс.

Стрессорное действие повышенной концентрации ROS обусловливается способностью свободных радикалов нарушать структуру биологических молекул. Наиболее чувствительны, по-видимому, липиды. Это очень важный момент патогенеза стресса, поскольку все клеточные мембраны содержат полиненасыщенные жирные кислоты. В структуре мембран появляются двойные связи, что приводит к появлению пероксидов — органических свободных радикалов, усиливающих свободнорадикальный каскад [19]. Другой объект повреждения свободными радикалами — ДНК. Совершающийся и в нормальных условиях процесс разрушения (однопочечные и двухпочечные разрывы) ядерной и митохондриальной ДНК [20] ускоряется окислительным стрессом и может стать причиной нейродегенеративных и опухолевых заболеваний [21]. Митохондриальная ДНК (мтДНК) более чувствительна, чем ядерная к повреждающему действию ROS. Она не закрыта гистонами или другими белками, поэтому транскрибируется быстрее ядерной [19] и, следовательно, быстрее в 10—20 раз [22] накапливает ошибки.

Понятно, что недостаточность функции главного устранителя ROS — митохондрий, создает порочный круг усиления оксидативного стресса. Порочность этого круга обусловливается тем обстоятельством, что мтДНК кодирует, главным образом, белки окислительного фосфорилирования. Следовательно, вызванное неполадками окислительного фосфорилирования изменение этой ДНК наносит удар «по больному месту». С развитием окислительного стресса к повреждению липидов и ДНК добавляется оксидативная деструкция белков, а также их распад и нитрозилирование под действием оксида азота и пероксинитрита [23, 24]. Оксидативная деструкция белков затрудняет их фолдинг и удаление из клетки. Так образуются характерные морфологические проявления старости, атеросклероза, нейродегенеративных болезней: скопления липофусцина, бета-амилоида, α -синуклеина и других белков [25].

Имеются многочисленные и всё увеличивающиеся в числе свидетельства того, что окислительный стресс является главным моментом патогенеза многих самых распространенных болезней: гипертонической болезни, атеросклероза, ревматоидного артрита, деменции, нейродегенеративных процессов, болезней Альцгеймера и Паркинсона, воспалительных процессов, диабета, рака, ускоренного старения [26—29].

В то же время существование замечательного свойства живой природы — гормезиса вооружает медицину *естественным* способом препятствовать появлению и лечить болезни вышеприведенного списка. Это наиболее перспективный и заслуживающий наибольшего внимания медицинской науки способ. Он прошел солидную «проверку временем», возникнув, намного раньше медицины и человека, а именно, с появлением жизни на Земле. Свидетельство его «эффективности» — великолепное развитие, гармония, красота, широчайшая приспособляемость и могущество не оскверненной человеком живой природы. Медицинское применение гормезиса уже принесло человечеству успех прививок в борьбе с инфекционными болезнями. «Подобрать ключ» к болезням вышеприведенного списка, по-видимому, сложнее, чем к оспе, но и техническая вооруженность и опыт открытий современной медицины богаче, чем в эпоху Дженнера.

Будучи главным «виновником и жертвой» оксидативного стресса, митохондрии привлекают и главное внимание в изучении гормезиса физических нагрузок и умеренного питания. По этой причине в статьях по обсуждаемой проблеме нередко используется термин митогормезис. Для того чтобы митогормезис не выходил за рамки гормезиса и не переходил в патологию, нагрузки и голодовки должны повторяться, но с интенсивностью и частотой, позволяющей организму восстановиться к моменту повторного действия совершившиеся изменения. По терминологии Селье они должны иметь характер эустресса, но не дистресса [30]. Повторяющиеся воздействия с интенсивностью эустресса повышают устойчивость организма к стрессу. В результате становится возможным переносить без вреда для здоровья нагрузки большей интенсивности. Поэтому нельзя согласиться с предложением Schieber и Chandel [31] называть малые концентрации ROS редокс-биологией, а высокие — оксидативным стрессом. Оздоровительным или стрессовым окажется действие зависит не только от концентрации, но, прежде всего от «истории встреч» объекта действия и действующего фактора. Парацельс прав: «самих по себе нет ни лекарств, ни ядов; всё определяет доза».

Большое число исследований свидетельствует о гормональной природе оксидативного стресса физических нагрузок и умеренного питания. Как любой патогенный фактор он включает репаративный ответ организма, например синтез антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы, глутатион пероксидазы и др. Уменьшение калорийности диеты активирует более эффективные метаболические пути, большую степень защиты от влияния повреждающих факторов, блокирует бесполезную трату энергии. Укажу лишь наиболее обсуждаемый, а возможно, и наиболее существенный механизм «рационализации» обмена в ответ на ограничение притока энергии — усиление экспрессии таких регуляторов транскрипции, как сиртуины. Механизм консервативен, обнаружен в обширном списке организмов от дрожжей до млекопитающих. Есть сведения, относящиеся к человеку [32]. Участники исследования — молодые люди (36,8 +/- 1,0 год) были распределены в 3 группы:

- 1) контроль — питание *ad libitum*;
- 2) сокращенный на 25% рацион;
- 3) сокращенный на 12,5% рацион и увеличение на 12,5% расхода энергии за счет физической нагрузки.

В итоге шестимесячного наблюдения обнаружили в мышцах испытуемых 2 и 3 групп кроме повышения содержания SIRT-1 мРНК, повышение экспрессии генов, кодирующих белки митохондриальных функций, увеличение содержания митохондриальной ДНК, меньшее сравнительно с контролем повреждение мтДНК. Ранними и последующими наблюдениями было установлено, что стимуляция биогенеза митохондрий и другие метаболические влияния сиртуинов осуществляются через транскрипционный фактор PGC-1 α [33–35].

Сиртуины заняли позицию «фактора молодости» когда было обнаружено, что снижение концентрации глюкозы в культуре способствует увеличению числа делений дрожжевых клеток и сочетается с увеличением экспрессии гена NAD⁺ зависимой деацетилазы — Sir2. Он стал наиболее вероятным регулятором «долговечности» дрожжей (первые публикации 1995—1997 гг. [36]. Были получены данные об активации гена Sir2 полифенолом — ресвератролом. Аналоги Sir2 в многоклеточных организмах (сиртуины) с участием ресвератрола удлинляли жизнь нематод, насекомых, мышей [36]. Схематически одним из путей благотворного действия голодания на метаболизм представляется накопление при недостатке нутриентов и, прежде всего, глюкозы NAD⁺, активирующего сиртуины [37]. В 2014 году были опубликованы результаты большой работы по исследованию механизма развития факторов риска сердечно сосудистых заболеваний у макак резус [38]. Обезьян в течение 2 лет содержали на диете обогащенной жирами и сахарозой. В результате увеличивались масса тела, содержание холестерина в плазме, липидная и макрофагальная инфильтрация сосудистой стенки, кальцификация её. Возрастала жесткость артериальной стенки, что выражалось увеличением скорости аортальной пульсовой волны. Добавление к той же диете ресвератрола, незначительно снижая систолическое давление и не уменьшая содержание холестерина, достоверно снижало массу тела и резко (даже ниже, чем у контрольных животных, содержащихся на стандартной диете) уменьшало скорость пульсовой волны: показателя воспаления и склероза артериальной стенки.

Горячий интерес к «фактору молодости», не доказав справедливости этого названия для человека, представил ценный материал о способности сиртуинов (SIRT 1-7) по меньшей мере «отодвинуть» болезнь в поздний возраст у млекопитающих и в том числе человека [39]. Сиртуины положительно влияют на метаболизм, геномную стабильность, стресс-устойчивость, стимулируют рост аксонов и дендритов, модулируют синаптическую пластичность и благодаря этому защищают от нарушений клиренса белковых агрегатов, нейродегенеративных болезней, в том числе Альцгеймера, Паркинсона, бокового амиотрофического склероза. Режим питания через сиртуины влияет на гипоталамус, эндокринные функции, циркадные ритмы, открывая этим перспективу терапевтического вмешательства в развитие диабета, метаболического синдрома, ожирения. В геронтологических исследованиях была сделана волнующая находка: возрастное снижение у мышей и даже у человека уровня NAD⁺, (косубстрата для SIRT1-7). Этот факт не только дает простое, молекулярное объяснение (конечно, не единственное) возрастного увеличения заболеваемости, но и соблазняет возможностью предотвратить, лечить или хотя бы отсрочить появление болезни диетой, с ресвератролом и/или предшественниками NAD⁺: никотинамид рибозидом, никотинамид мононуклеотидом [39].

Здоровье и долголетие различаются лишь формально, по сути это неразрывно связанные явления. Возможность увеличить умеренным питанием и движением продолжительность здоровой (без болезней) жизни, а также средний и максимальный срок жизни доказана сотнями исследований на различных организмах от дрожжей до обезьян. Понятно, что осуществить рандомизированные исследования влияния питания и/или движения на продолжительность жизни человека очень сложно. Скорее всего, таких данных пока нет. И надо признать, что они не представляют жгучего интереса для современного человечества. Поскольку подавляющее большинство людей умирают от болезней, а не «от старости», отсрочивание заболевания, снижение факторов риска, по сути, есть увеличение продолжительности жизни и именно к нему стремится здравомыслящий человек. Конечно, главным фактором риска обсуждаемых в этой статье болезней является возраст. Но невозможность влиять на этот параметр, заставляет исследователей искать в области реального и обнаруживать снижение и устранение факторов риска умеренным питанием и физическими нагрузками. Привожу пример. Для 72 людей (женщин — 54) с избыточным весом (возраст — 53 ± 9) активный стиль жизни в течение 9 месяцев включал 2—3 шестидесятиминутных сеанса в неделю «езды» на эргоцикле и упражнений с гантелями и резиновыми эспандерами. Кроме того, участникам исследования рекомендовали 1—2 неконтролируемых пеших или велосипедных прогулки в неделю. Интенсивность нагрузок соответствовала физическому статусу участников. Они соблюдали средиземноморскую диету: 2000—2400 ккал/день. В итоге наблюдения снизился уровень глюкозы от 5,5 ± 0,9 до 5,2 ± 0,6 ммоль/л, $p < 0,0001$; инсулина от 98 ± 57 до 82 ± 43 ммоль/л, $p = 0,003$. Главный итог: значительно снизилась инсулинорезистентность от 3,6 ± 2,5 до 2,8 ± 1,6, $p = 0,0008$. Иными словами, уменьшилась вероятность развития главных угроз для тучных: диабета, атеросклероза, гипертонической болезни [40]. Сообщений об уменьшении или устранении факторов риска в результате какого-то

курса диеты и/или работы много [41—44]. Такие находки, не будучи формальным доказательством продления жизни, тем не менее, не могут не выразиться продлением если даже не всего срока, то срока жизни без болезней. Понятно, что и умеренное питание, и физические нагрузки эффективнее в качестве постоянного образа жизни, нежели временного курса.

Механизмы положительного влияния нагрузок на когнитивное здоровье изучены хуже, чем их действие на физическое здоровье [45, 46]. Однако тот факт, что малая подвижность человека оказывается фактором риска когнитивных расстройств [47] убеждает, в существовании положительной связи мышечной работы с когнитивным здоровьем. И сегодня есть сведения о некоторых механизмах такой связи. Относительно молекулярных механизмов воздействия известно, что нагрузки увеличивают экспрессию генов BDNF, IGF-1 и VEGF в коре и особенно в гиппокампе [48].

Велика роль BDNF в гормезисной адаптации к окислительному стрессу. Он стимулирует транспорт глюкозы и биогенез митохондрий, обеспечивает биоэнергетическую защиту нейронов, увеличивает чувствительность к инсулину. Повышая скорость формирования и пластичность синапсов, BDNF способствует обучению и памяти, а также длительному сохранению этих характеристик мозга в старости [49]. BDNF играет важную роль в нейрогенезе, обеспечивая пролиферацию, дифференцировку и интеграцию в местные сети нейронов гиппокампа [50]. Показано, что антидепрессантное действие физических нагрузок опосредуется повышением концентрации BDNF [51].

Многочисленные отклики не только в профессиональной литературе, но и в интернете, вызвало сообщение в журнале *Cell* большой группы сотрудников Каролинского института о химическом механизме (по-видимому, не единственном) благотворного действия мышечной работы на эмоции, а конкретно, на депрессию [52]. Стресс и воспаление способствуют развитию депрессии, повышая в мозге уровень метаболита триптофана — кинуренина (уровень триптофана соответственно снижается). Индуцируемый в мышцах работой транскрипционный фактор PGC-1 α обеспечивает экспрессию фермента кинуренин-амино-трансферазы, которая превращает кинуренин в кинурениновую кислоту, не проникающую через ГЭБ и, следовательно, не имеющую токсического действия. Молекулярные изменения, создаваемые нагрузками, включают клеточные механизмы благотворного действия на когнитивные функции. Из этих механизмов сегодня наиболее известны ангиогенез, синаптогенез в различных областях мозга и нейрогенез в гиппокампе [53, 54]. Опубликован результат действия 12-месячного курса нагрузок (40-минутной ходьбы) на макроскопические изменения мозга (объем серого вещества гиппокампа) у пожилых (55—80 лет) людей. Вместо свойственного этому возрасту уменьшения объема исследователи обнаружили по МРТ увеличение в среднем на 2%. Этот результат сочетался с улучшением пространственной памяти и увеличением содержания BDNF в сыворотке [55].

Аэробные нагрузки особенно способствуют активации в мышцах PGC-1 α , что, в свою очередь, стимулирует биогенез митохондрий, окисление жирных кислот, ангиогенез и резистентность к саркопении [56]. Проведенный ка-

надскими исследователями анализ обширной литературы показал, что физическая пассивность способствует развитию хронических болезней и преждевременному наступлению смерти. Они считают, что есть неопровержимые свидетельства эффективности регулярных упражнений в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, гипертонической болезни, диабета, рака, ожирения, депрессии, остеопороза и преждевременной смерти [57]. Нагрузки стимулируют активность в мозге серотонина, повышают содержание в плазме и мозге триптофана и снижают содержание провоспалительных цитокинов [5]. Полагают, что увеличение синтеза триптофана создает антидепрессантный и противовоспалительный эффект умеренных нагрузок [58]. Однако интенсивные нагрузки могут увеличенной продукцией ROS снижать уровень триптофана и, наоборот, отрицательно влиять на настроение и иммунитет [5].

Регулярные физические нагрузки смягчают действие стрессовых факторов, улучшают психологические и физиологические функции, защищают от метаболических нарушений стрессовыми факторами и предотвращают развитие многих хронических болезней. Реакция организма на действие стрессовых факторов осуществляется через систему гипоталамус — гипофиз — надпочечник, вегетативную нервную систему, иммунную систему [59]. В ответ на физические нагрузки увеличивается секреция глюкокортикоидов (кортизола у человека, кортикостерона у грызунов) и адреналина. Их повышенная концентрация в начальной фазе стресса увеличивает сердечный ритм и кровяное давление, стимулирует когнитивные процессы, возбуждение, тревогу, внимание, мобилизуют иммунную систему. Эти изменения направлены, в конечном счете, на восстановление нарушенного стрессовым воздействием гомеостаза и оно происходит в ситуациях эустресса.

Принцип гормезиса: профилактика и лечение повреждением в допороговых дозах, предопределяет важность правильного определения дозы. Отмеченное выше противовоспалительное, повышающее уровень триптофана и серотонина, антидепрессантное действие умеренных нагрузок [5] при максимальных нагрузках сменяется повышением уровня провоспалительных цитокинов, ускоренным распадом триптофана, увеличением отношения кинуренин/триптофан, склонностью к депрессии [5, 60]. В связи с этим в последние годы пересматривается роль аптечных антиоксидантов, представлявших ранее абсолютной панацеей. Оказалось необходимым учитывать вполне реальную способность их нивелировать действие эндогенных антиоксидантных процессов. Так у здоровых молодых мужчин 4-недельный курс упражнений повышал содержание эндогенных медиаторов ROS-защиты: супероксид дисмутазы и глутатион пероксидазы, увеличивал чувствительность к инсулину. Иными словами, упражнения гасили проявления оксидативного стресса, включали антиоксидантную защиту. Однако в группе сравнения (получали в течение курса упражнений антиоксиданты: витамины С и Е) антиоксидантный эффект упражнений не проявлялся ($P < 0,001$) [61]. Таким образом, получается, что прооксидантное, повреждающее действие нагрузки ослаблялось химическими антиоксидантами и оказывалось недостаточным для создания положительного гормезисного эффекта.

Подавление принимаемыми антиоксидантными препаратами благотворного действия нагрузок — очень актуальное для современного здравоохранения наблюдение. Оно многократно подтверждено большими клиническими исследованиями, показавшими, что превентивная роль, широко рекламируемых и азартно раскупаемых антиоксидантных добавок, по меньшей мере, преувеличена. Рандомизированные контролируемые испытания обнаружили неэффективность аптечных антиоксидантов в качестве средств профилактики, лечения и продления жизни. Опубликовано немало результатов, сообщающих о вреде и побочных действиях антиоксидантов «не из диеты, а из пилюль и таблеток» [62]. В отличие от синтетических антиоксидантов потребление фруктов и овощей снижает риск сердечно-сосудистых, неврологических и опухолевых заболеваний. Однако в современном мире этот замечательный путь профилактики утрачивает былую привлекательность. Истощение и загрязнение почвы, неразумное использование пестицидов, пороки индустриальной обработки земли, транспортировки и хранения продуктов, а также приготовления пищи из них существенно уменьшили содержание незаменимых микроэлементов и антиоксидантов в современных фруктах и овощах [13].

В недавнем системном обзоре 3129 публикаций на английском и немецком языках [63] была поставлена цель, определить: «оказывается ли комбинация физических нагрузок с питанием/пищевыми добавками более эффективной для структуры, метаболизма и функции мозга, чем раздельно примененные физические нагрузки или питание/пищевые добавки». В исследованиях на людях не было обнаружено усиливающего эффекта. В экспериментах на грызунах найдено повышение благоприятного действия физических нагрузок, комбинированных с добавками омега-3-ненасыщенной докозагексаеновой кислоты [64].

Медицинские исследования убедительно свидетельствуют о профилактической и лечебной эффективности гормезиса физической работы и умеренного питания при многих, наиболее распространенных болезнях современного населения Земли. Это атеросклероз, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, гипертоническая болезнь, диабет, рак, ожирение, депрессии, воспалительные процессы, саркопения, остеопороз, преждевременное старение, деменция. Закрывая текст, следует упомянуть о социальной и духовной составляющих проблемы гормезиса. Кроме обсуждавшихся обстоятельств, на действительность гормезиса влияет множество факторов: климат, состояние сельского хозяйства, пищевой и фармацевтической промышленности, образ жизни, уровень культуры, традиции и привычки, материальное и моральное состояние человека, его интеллектуальное, духовное, нравственное и эмоциональное развитие.

Список литературы

1. Calabrese E.J. On the origins of the linear no-threshold (LNT) dogma by means of untruths, artful dodges and blind faith. *Environ Res.* 2015; 142: 432-42.
2. Marcus C.S. Time to Reject the Linear No-Threshold Hypothesis and Accept Thresholds and Hormesis: A Petition to the U.S. Nuclear Regulatory Commission. *Clin Nucl Med.* 2015; 40(7): 617-9.
3. Lehrer S., Rosenzweig K.E. Lung cancer hormesis in high impact states where nuclear testing occurred. *Clin Lung Cancer.* 2015; 16: 152-5.

4. Welch K.J., Mock N., Nettebenko O. Measuring hunger in the Russian Federation using the Radimer/Cornell hunger scale. *Bull World Health Organ.* 1998; 76(2): 143-8.
5. Strasser B., Fuchs D. Diet Versus Exercise in Weight Loss and Maintenance: Focus on Tryptophan. *Int J Tryptophan Res.* 2016; 10: 9-16.
6. Myint A.M., Kim Y.K. Network beyond IDO in psychiatric disorders: revisiting neurodegeneration hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014; 48: 304-13.
7. Shimazu T., Hirschey M.D., Newman J., He W., Shirakawa K., Le Moan N. et al. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science.* 2013; 339: 211-4.
8. Marosi K., Mattson M. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25: 89-98.
9. Longo V., Mattson M. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Cell Metab.* 2014; 19(2): 181-92.
10. van Praag H., Fleshner M., Schwartz M., Mattson M. Exercise, Energy Intake, Glucose Homeostasis, and the Brain. *J Neurosci.* 2014; 12; 34(46): 15139-49.
11. Raschke S., Eckardt K., Bjuvrklund Holven K., Jensen J., Eckel J. Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells. *PLoS ONE.* 2013; 8(4): e62008.
12. Schnyder S., Handschin C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. *Bone.* 2015; 80: 115-25.
13. Poljsak B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2011; 2011: 194586.
14. Mattson M. Hormesis. *Defined Ageing Res Rev.* 2008; 7(1): 1-7.
15. Merry T.L., Ristow M. Mitohormesis in exercise training. *Free Radic Biol Med.* 2016; 98: 123-30.
16. Bokkon I. Recognition of Functional Roles of Free Radicals. *Curr Neuropharmacol.* 2012; 10(4): 287-8.
17. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011; 194: 7-15.
18. Ristow M. Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 327-36.
19. Fanjul-Moles M.L., Lopez-Riquelme G.O. Relationship between Oxidative Stress, Circadian Rhythms, and AMD. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 7420637.
20. Caldecott K.W. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair.* 2004; 3: 875-82.
21. Ziech D., Franco R., Pappa A., Panayiotidis M. I. Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2011; 711(1-2): 167-73.
22. Lee J., Giordano S., Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal.* 2012; 441(2): 523-40.
23. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews.* 2007; 87(1): 315-424.
24. Hill B. G., Dranka B.P., Bailey S.M., Lancaster J.R., Darley-Usmar V.M. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *The Journal of Biological Chemistry.* 2010; 285(26): 19699-704.
25. Reeg S., Grune T. Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? *Antioxid Redox Signal.* 2015; 23(3): 239-55.
26. Poljsak B., Milisav I. The neglected significance of «antioxidative stress». *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 480895.
27. Merry T.L., Ristow M. Mitohormesis in exercise et raining. *Free Radic Biol Med.* 2016; 98: 123-30.
28. Meo S., Reed T., Venditti P., Victor V. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 1245049.
29. Manukhina E.B., Goryacheva A.V., Smirin B.V., Malyshev I.Yu., Budanova O.P., Downey H.F. Vascular risk factors of Alzheimer's disease and a possibility of their modification by adaptation to intermittent hypoxia. *Patogenez.* 2016, 14(1): 18-26. (in Russian)
30. Selye H. *Stress without distress.* M: Progress; 1979. 120 p. (in Russian)
31. Schieber M., Chandel N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology.* 2014; 24(10): 453-62.
32. Civitarese A.E., Carling S., Heilbronn L.K., Hulver M.H., Ukropcova B., Deutsch W.A. et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med.* 2007; 4(3): e76.

33. Nemoto S., Fergusson M.M., Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *J Biol Chem.* 2005; 280(16): 16456-60.
34. Lopez-Lluch G., Hunt N., Jones B., Zhu M., Jamieson H., Hilmer S. et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 1768-73.
35. Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev.* 2013; 27: 2072-85.
36. Guarente L. Aging research—where do we stand and where are we going? *Cell.* 2014; 159(1): 15-9.
37. Lopez-Lluch G., Navas P. Calorie restriction as an intervention in ageing. *J Physiol.* 2016; 594(8): 2043-60.
38. Mattison J.A., Wang M., Bernier M., Zhang J., Park S.S., Maudsley S. et al. Resveratrol prevents high fat/sucrose diet-induced central arterial wall inflammation and stiffening in nonhuman primates. *Cell Metab.* 2014; 20: 183-90.
39. Herskovits A.Z., Guarente L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron.* 2014; 81(3): 471-83.
40. Marquis-Gravel G., Hayami D., Juneau M., Nigam A., Guilbeault V., Latour E., et al. Intensive lifestyle intervention including high-intensity interval training program improves insulin resistance and fasting plasma glucose in obese patients. *Prev Med Rep.* 2015; 2: 314-8.
41. Weiss E.P., Albert S.G., Reeds D.N., Kress K.S., McDaniel J.L., Klein S. et al. Effects of matched weight loss from calorie restriction, exercise, or both on cardiovascular disease risk factors: a randomized intervention trial. *Am J Clin Nutr.* 2016; 104(3): 576-86.
42. Ravussin E., Redman L.M., Rochon J., Das S.K., Fontana L., Kraus W.E., et al. A 2-Year Randomized Controlled Trial of Human Caloric Restriction: Feasibility and Effects on Predictors of Health Span and Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015; 70(9): 1097-104.
43. Bertozzi B., Tosti V., Fontana L. Beyond Calories: An Integrated Approach to Promote Health, Longevity, and Well-Being. *Gerontology.* 2017; 63(1): 13-9.
44. Paltsyn A.A. Exercise and age-related cognitive decline. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2016; 2: 87-93. (in Russian)
45. Gomez-Pinilla F., Hillman C. The influence of exercise on cognitive abilities. *Compr. Physiol.* 2013; 3: 403-28.
46. Hamilton G. F., Rhodes J. S. Exercise regulation of cognitive function and neuroplasticity in the healthy and diseased brain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2015; 135: 381-406.
47. Norton S., Matthews F.E., Barnes D.E., Yaffe K., Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol.* 2014; 13: 788-94.
48. Duzel E., van Praag H., Sendtner M. Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? *Brain.* 2016; 139: 662-73.
49. Marosi K., Mattson M.P. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25: 89-98.
50. Lee J., Duan W., Mattson M.P. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem.* 2002; 82: 1367-75.
51. Sartori C.R., Vieira A.S., Ferrari E.M., Langone F., Tongiorgi E., Parada C.A. The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and pro BDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. *Neuroscience.* 2011; 180: 9-18.
52. Agudelo L.Z., Femenia T., Orhan F., Porsmyr-Palmertz M., Gojny M., Martinez-Redondo V. et al. Skeletal Muscle PGC-1 α Modulates Kynurenine Metabolism and Mediates Resilience to Stress-Induced Depression. *Cell.* 2014; 159(1): 33-45.
53. Vivar C., Potter M. C., van Praag H. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2013; 15: 189-210.
54. Stillman Ch., Cohen J., Lehman M., Erickson K. Mediators of Physical Activity on Neurocognitive Function: A Review at Multiple Levels of Analysis. *Front Hum. Neurosci.* 2016; 10: 626.
55. Erickson K., Voss M., Prakash R., Basak Ch., Szabo A., Chad-dock L. et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(7): 3017-22.
56. Arany Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2008; 18: 426-34.
57. Darren E.R., Shannon S.D. Bredin Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ.* 2006; 174(6): 801-9.
58. Wegner M., Helmich I., Machado S., Nardi A.E., Arias-Carri-on O., Budde H. Effects of exercise on anxiety and depression disorders: review of meta-analyses and neurobiological mechanisms. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014; 13: 1002-14.
59. Silverman M., Deuster P. Biological mechanisms underlying the role of physical fitness in health and resilience. *Interface Focus.* 2014; 4(5): 20140040.
60. Strasser B., Geiger D., Schauer M., Gatterer H., Burt-scher M., Fuchs D. Effects of Exhaustive Aerobic Exercise on Tryptop-han-Kynurenine Metabolism in Trained Athletes. *PLoS One.* 2016; 11(4): e0153617.
61. Ristow M., Zarse K., Oberbach A., Klötting N., Birringer M., Kiehnopf M. et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(21): 8665-70.
62. Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud C. Antioxidant supplements and mortality. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2014; 17 (1): 40-4.
63. Schdtin A., Baur K., Stutz J., Wolf P., de Bruin E. D. Effects of Physical Exercise Combined with Nutritional Supplements on Aging Brain Related Structures and Functions: A Systematic Review. *Front Aging Neurosci.* 2016; 8: 00161.
64. Wu A., Ying Z., Gomez-Pinilla F. Docosahexaenoic acid dietary supplementation enhances the effects of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Neuroscience.* 2008; 155: 751-9.

Сведения об авторе

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, профессор, лауреат Государственной премии СССР, главный научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов Института общей патологии и патофизиологии РАН, профессор кафедры общей патологии и патофизиологии РМАНПО.

УДК 632.938

Белки и пептиды нейтрофилов в регуляции системы комплемента

Берлов М.Н.^{1,2}, Умнякова Е.С.¹, Кокряков В.Н.^{1,2}¹ — ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12² — Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 9

В обзоре рассмотрено участие нейтрофилов и секретируемых ими белково-пептидных факторов в функционировании системы комплемента. Анализируются данные о влиянии эластазы, катепсина G, миелопероксидазы, лактоферрина на комплемент. Особый акцент сделан на взаимодействии с комплементом антимикробных пептидов дефензинов.

Ключевые слова: нейтрофилы, комплемент, дефензины.

Для цитирования: Берлов М.Н., Умнякова Е.С., Кокряков В.Н. Белки и пептиды нейтрофилов в регуляции системы комплемента. Патогенез. 2017; 15(1): 19—23.

Для корреспонденции: Берлов Михаил Николаевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории общей патологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург), berlov@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.10.2016

Neutrophil proteins and peptides in regulation of complement

Berlov M.N.^{1,2}, Umnyakova E.S.¹, Kokryakov V.N.^{1,2}¹ — Institute of Experimental Medicine, 12 ak. Pavlova str., Saint Petersburg, 197376² — Saint Petersburg State University, 9 Universitetskaya nab., Saint Petersburg, 199034

Involvement of neutrophils and their released proteins and peptides in complement functioning is reviewed. The data are presented describing effects of elastase, cathepsin G, lactoferrin, myeloperoxidase on complement. Interaction of complement with antimicrobial peptides defensins is especially emphasized.

Keywords: neutrophils, complement, defensins.

For citation: Berlov M.N., Umnyakova E.S., Kokryakov V.N. Neutrophil proteins and peptides in regulation of complement. Patogenez. 2017; 15(1): 19—23 (In Russian).

For correspondence: Berlov Mikhail Nikolaevich, PhD, senior researcher at the Laboratory of General Pathology FGBNU «Institute of Experimental Medicine», St. Petersburg, Russia, e-mail: berlov@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 14.10.2016

Система комплемента представляет собой сеть, состоящую более чем из тридцати индивидуальных сывороточных и ассоциированных с мембраной белков, формирующих и регулирующих каскад превращений, которые осуществляются за счет ограниченного протеолиза эндогенными сериновыми протеиназами и белок-белковых взаимодействий. Основными последствиями активации комплемента являются опсонизация патогена, облегчающая его последующий фагоцитоз, привлечение моноцитов/макрофагов, нейтрофилов и других клеток за счет генерации анафилатоксинов (C3a, C5a), а также прямой лизис грамотрицательных бактерий вследствие формирования на их клеточной поверхности мембраноатакующего комплекса (МАК) [1—3]. Роль комплемента не ограничивается участием в иммунном ответе, он также участвует в удалении апоптотических телец, клеточного дебриса, иммунных комплексов, участвует в регуляции гемостаза [4—6].

Недостаточная, чрезмерная или слабо контролируемая активация комплемента играет существенную роль в патогенезе целого ряда заболеваний [7—10]. Непосред-

ственно связаны с избыточной или нерегулируемой активацией комплемента такие патологии, как возрастная макулодистрофия, некоторые патологии почек, такие, как атипичный гемолитико-уремический синдром и мембранопролиферативный гломерулонефрит II типа, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (болезнь Маркиафавы—Микели), болезнь холодовых агглютининов, внутрисосудистая гемолитическая анемия. Еще одно заболевание, обычно включаемое в группу комплемент-зависимых болезней, ассоциированное с дефицитом сывороточного ингибитора C1inh, — это наследственная ангиоэдема. Однако данная патология, по всей видимости, связана не столько с нарушениями работы комплемента, сколько с дисрегуляцией калликреин-кининовой системы [11]. Двойную роль классический путь комплемента играет в развитии аутоиммунных заболеваний, таких, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит. Накопление или неполное удаление клеточного дебриса в условиях дефицита компонентов комплемента или его недостаточной активации может способствовать развитию аутоиммунных заболеваний, однако поздние этапы их

развития сопровождаются гиперактивацией комплемента. Аналогичная ситуация имеет место в случае нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера. В случае опухолевых заболеваний комплемент также может проявлять как сдерживающее, так и стимулирующее действие: опухолевые клетки могут быть мишенью МАК, в то же время активация комплемента и, в частности, образование анафилатоксинов создает микроокружение, благоприятствующее росту многих опухолей [9, 10, 12]. В настоящее время одной из серьезных проблем медицины является практически полное отсутствие терапевтических средств, регулирующих уровень активации комплемента. Источником новых медицинских препаратов для направленной коррекции активности комплемента могут быть природные регуляторы. В качестве относительно мало изученных регуляторов комплемента можно рассматривать белково-пептидные факторы, продуцируемые нейтрофилами.

Нейтрофилы (нейтрофильные гранулоциты, полиморфноядерные лейкоциты) — ключевые клетки, обеспечивающие фагоцитоз и инактивацию патогенных микробов в организме млекопитающих [1]. Традиционно в иммунологии взаимодействие нейтрофилов с системой комплемента рассматривают в контексте участия продуктов комплемента, действующих как хемоаттрактанты и опсонины, в привлечении нейтрофилов в очаг воспаления и стимуляции фагоцитоза. В частности, производное комплемента C5a рассматривается в качестве главного хемоаттрактанта нейтрофилов [13, 14], действующего как лиганд рецептора C5aR (CD88), в то же время C3a в мобилизации этих клеток не играет существенной роли [14, 15]. Нейтрофилы экспрессируют рецепторы CR1 (CD35 и CD), CR3 (CD11b/CD18, Mac-1) и CR4 (CD11c/CD18), которые распознают компоненты комплемента C3b, iC3b, C3d, C3dg, C4b на поверхности опсонизированной клетки, обуславливая ее поглощение в ходе фагоцитарного процесса [15—17]. Нейтрофилы также обладают двумя рецепторами к C1q, один из которых распознает его глобулярный домен (gC1qR), а другой — коллагеновый домен (сC1qR). gC1qR (или p33) опосредует хемотаксис нейтрофилов в ответ на C1q [18, 19]. сC1qR представляет собой комплекс кальретикулина и белка CD59, заякоренного в мембране через гликозилфосфатидилинозитол, и стимулирует фагоцитоз [20, 21].

Вместе с тем, нейтрофилы не только активируются комплементом, но и сами, в свою очередь, влияют на его активацию, секретируя биологически активные белки и пептиды в ходе дегрануляции. Первые научные данные о возможном взаимодействии продуктов фагоцитоза с системой комплемента были получены еще в конце XIX века в лаборатории И.И. Мечникова [23]. Мечников обратил внимание на то, что так называемое «пфейферовское явление» (инактивация холерного вибриона системой комплемента) эффективно протекает у морских свинок только в условиях лейкоцитоза. При этом существенным фактором являлась дегрануляция клеток («фаголиз» в терминологии Мечникова). Эти данные привели Мечникова к ошибочному отождествлению цитазы лейкоцитов и комплемента (алексина). Под цитазом (автор использовал этот термин в мужском роде) Мечников понимал совокупность внутриклеточных бактерицидных веществ белковой природы, обеспечивающих инактивацию фагоцитированного микроба [23]. Согласно современным дан-

ными, ряд белков комплемента действительно имеют лейкоцитарное происхождение. В частности, нейтрофилы являются одним из основных источников белка пропердина, стабилизирующего C3-конвертазу альтернативного пути [24], кроме того, нейтрофилы способны продуцировать C3, C6 и C7, а также, по некоторым данным, C1q, C4 и C9 [25—27]. Очевидно, что секреция компонентов комплемента лейкоцитами отчасти объясняет наблюдения Мечникова, однако, как будет показано ниже, не исключено действие и по другим механизмам. Как бы то ни было, во внутрифагосомной инактивации микробов участвуют не компоненты комплемента, а другие молекулярные факторы, в первую очередь, катионные антимикробные белки и пептиды гранул нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, такие как миелопероксидаза (МПО), лактоферрин, эластаза, катепсин G, лизоцим, дефенсины, кателицидины и др. [28]. Именно эти компоненты гранулярного аппарата фагоцитов соответствуют первоначальному определению цитазы [29].

Результаты экспериментов Мечникова нашли подтверждение в 1976 году в исследованиях лаборатории Г. Гевюрца [30], в которых было показано, что экстракт кислоторастворимых белков и пептидов из гранулярной фракции псевдоэозинофилов кролика (клеток, структурно и функционально гомологичных нейтрофилам человека) усиливает интенсивность лизиса клеток-мишеней в результате действия МАК. По заключению авторов, механизм состоял в нейтрализации неспецифических ингибиторов сборки МАК [30], которые, по всей видимости, представляли собой сывороточные липопротеины или протеогликаны [31, 32]. В этой связи можно отметить, что для одного из антимикробных белков нейтрофилов, а именно МПО была показана способность взаимодействовать с липопротеинами различной плотности [33, 34], поэтому не исключено, что именно этот белок опосредовал наблюдаемый эффект.

Но если в описанном примере участие определенных компонентов гранулярного аппарата нейтрофилов в активации комплемента не было выявлено прямо, то в ряде других работ описано участие индивидуальных белков во взаимодействии с комплементом. Показано, что эластаза и катепсин G, являющиеся сериновыми протеиназами, способны активировать систему комплемента путем непосредственного расщепления C3 и C5 [35—38], а только эластаза — и путем расщепления C4 [37]. Ряд авторов даже помимо трех общепризнанных путей активации комплемента (классический, альтернативный, лектиновый) выделяют также путь внешних протеаз (extrinsic protease pathway), рассматривая в качестве инициатора этого пути нейтрофильную эластазу, наряду с тромбином и калликреином [2, 39]. В то же время, по другим данным, протеолитическое действие эластазы на C3 приводит к обратному результату — инактивации этого белка [40], также может ингибировать комплемент за счет деградации связанного с клеткой мишенью iC3b [41—43]. Для МПО было показано взаимодействие с тремя различными белками комплемента. Образование комплекса МПО с C3b и продуктами его деградации не влияет на активацию комплемента, но позволяет, по гипотезе авторов, концентрировать МПО на поверхности патогенной клетки, создавая предпосылки для ее инактивации за счет токсических производных (таких, как гипохлорит), генерируемых МПО в присутствии пероксида водорода [44]. Комплекс МПО с пропердином непосредственно активирует комплемент по альтернативному пути

[45]. Образование комплекса МПО с C1q может приводить к различным результатам: с одной стороны, МПО усиливает интенсивность комплемент-опосредованного гемолиза по неферментативному механизму, с другой — катализирует образование гипохлорита, инактивирующего C1q [46]. Однако тот же гипохлорит непосредственно или через образование хлораминов может модифицировать C5, стимулируя сборку МАК без активации комплемента [47]. Противоречивые сведения имеются и о влиянии на активность комплемента лактоферрина. Так, лактоферрин усиливает независимое от антител связывание C1q с поверхностью клеток *Streptococcus agalactiae* [48]. В то же время, взаимодействия с C2, лактоферрин ингибирует комплемент [49]. По неизученному механизму может ингибировать комплемент лизоцим [50].

Наибольший интерес представляет регуляторное действие антимикробных пептидов (АМП) нейтрофилов (дефенсинов, кателицидинов), поскольку эти молекулы в силу их относительно небольшого размера являются наиболее перспективными кандидатами для разработки на их основе препаратов для направленной регуляции комплемента.

Было показано, что дефенсины кролика проявляют синергизм с комплементом в инактивации возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* [51]. В отношении возможных механизмов описываемого эффекта авторы предложили несколько гипотетических объяснений, заключающихся, в частности, как в активирующем действии дефенсинов на комплемент, так и в облегчении доступа дефенсинов к цитоплазматической мембране бактерий вследствие формирования МАК. Следует отметить, что дефенсины кролика и человека хотя и принадлежат к одному семейству АМП и проявляют гомологию по первичной структуре, тем не менее, заметно различаются по физико-химическим свойствам и функциональной активности [28].

В ряде последующих исследований было оценено взаимодействие дефенсинов и других АМП с белками комплемента. Начало этим работам было положено А. Панютинем и соавторами, которые изучали взаимодействие ряда АМП с комплексом белков, составляющих компонент комплемента C1 [52]. Было показано взаимодействие с C1 трех пептидов: α -дефенсина человека HNP-1, кателицидина свиньи протегрина-1, а также пептида из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus* тахиплезина-1. По данным цитируемой работы, среди белков комплекса C1 в связывании пептидов участвуют протеиназы C1r и C1s, а также ингибиторный белок C1inh, в то время как белок C1q непосредственно с пептидами не взаимодействует. Однако в дальнейшем в работах других авторов было выявлено взаимодействие упомянутых пептидов именно с C1q. Способность к формированию комплекса с C1q характерна как для α -дефенсинов [53–56], так и для β -дефенсинов (продуцируемых эпителиальными клетками) человека [56, 57]. Имеет место и взаимодействие α -дефенсинов с инициаторной молекулой лектинового пути активации комплемента — маннан-связывающим лектином [55]. Прямое взаимодействие с C1q было показано и для тахиплезина, за счет чего пептид способен стимулировать активацию комплемента на поверхности клеток карциномы простаты человека линии TSU [58]. Мы впервые показали формирование комплексов C1q с протегрином, а также с пептидом ареницином-1 [56, 59]. Пептиды, названные ареницинами,

были выделены из целомоцитов кольчатого червя пескожила *Arenicola marina* [60], они обладают гомологией с тахиплезинами и могут вместе с ними рассматриваться как представители единого семейства АМП [61]. Из исследованных нами АМП не взаимодействовал с C1q кателицин человека LL-37. Следует отметить, что все экспериментальные данные о взаимодействии АМП с C1q относятся к пептидам, для которых характерно доминирование в молекуле β -структуры, стабилизированной дисульфидными связями (α - и β -дефенсины, протегрин, тахиплезин, ареницин). Возможно, подобные структурные особенности благоприятствуют формированию комплексов пептидов с C1q. Несмотря на то, что протегрин относится к семейству кателицидинов, он проявляет черты структурного сходства с дефенсинами [62], а не с α -спиральным LL-37. Это не должно вызывать удивления, поскольку представители кателицидинов имеют гомологию лишь на стадии молекулы-предшественницы в области, удаляемой в ходе посттрансляционного процессинга, в то время как зрелые АМП, напротив, характеризуются высокой вариабельностью [63].

Данные о характере влияния дефенсинов и других β -структурных АМП на активацию комплемента противоречивы и зависят условий эксперимента. В работе, показавшей активирующее действие дефенсинов человека на комплемент, в экспериментальной системе отсутствовал дополнительный активатор комплемента, и, по мнению авторов, сами дефенсины, взаимодействуя с C1q, запускали каскад активации [53]. В работах, показавших ингибирующее действие дефенсинов, активатором и мишенью действия комплемента были либо сенсibilизированные антителами эритроциты, либо сорбированные на полистироловой поверхности иммуноглобулины M. По данным авторов, взаимодействие дефенсинов с C1q проходило с участием его коллагеноподобного домена [54, 55, 57]. В наших работах мы изучали активацию комплемента в гемолитическом и бактериолитическом тестах [56, 64, 65]. Мы показали, что дефенсины ингибируют комплемент-зависимый гемолиз, а характер их влияния на бактериолиз может быть различным в зависимости от условий эксперимента (ионная сила, концентрация пептида). Аналогичные результаты мы получили и для ареницина.

Вероятно, сродство катионных пептидов к поверхности бактериальных клеток позволяет им привлекать C1q к этим клеткам, что при некоторых условиях имеет следствием активацию комплемента. Можно предположить, что АМП в некоторой степени повышают избирательность действия комплемента, способствуя при определенных условиях его активации по отношению к бактериальным клеткам и ингибированию по отношению к собственным клеткам организма.

Анализ рассмотренных данных показывает сложный характер влияния белково-пептидных факторов, продуцируемых нейтрофилами, на активность комплемента. Некоторые из них могут проявлять разнонаправленное действие на комплемент на различных стадиях его активации, а также в зависимости от условий среды. Общая направленность действия может в значительной степени определяться локальными концентрациями индивидуальных нейтрофильных белков и пептидов. Вероятно, все это создает условия для осуществления тонкой настройки уровня активации комплемента с участием факторов нейтрофилов.

Список литературы

1. Kokryakov V.N. *Essays on innate immunity*. Spb: Nauka; 2006. (in Russian)
2. Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunol.* 2010; 11: 785-97.
3. Merle N.S., Church S.E., Fremeaux-Bacchi V., Roumenina L.T. Complement System Part I — Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* 2015; 6: 262.
4. Flierman R., Daha M.R. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology.* 2007; 212: 363-70.
5. Trouw L., Blom A., Gasque P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol. Immunol.* 2008; 45: 1199-207.
6. Merle N.S., Noe R., Halbwachs-Mecarelli L., Fremeaux-Bacchi V., Roumenina, L.T. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front. Immunol.* 2015; 6: 257.
7. Ricklin D., Lambris J.D. Complement-targeted therapeutics. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 1265-75.
8. de Cordoba S.R., Tortajada A., Harris C.L., Morgan B.P. Complement dysregulation and disease: from genes and proteins to diagnostics and drugs. *Immunobiology.* 2012; 217: 1034-46.
9. Ricklin D., Lambris, J.D. Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions. *J. Immunol.* 2013; 190: 3839-47.
10. Zipfel PF Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunol. Lett.* 2009; 126:1-7.
11. Carugati A., Pappalardo E., Zingale L.C., Cicardi M. C1-inhibitor deficiency and angioedema. *Mol. Immunol.* 2001; 38: 161-73.
12. Mamidi S., Hone S., Kirschfink M. The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. *Immunobiology.* 2017; 222: 45-54.
13. Ward PA, Newman LJ: Neutrophil chemotactic factor from human C5. *J. Immunol.* 1969; 102: 93-99.
14. Ehrenguber M.U., Geiser T., Deranleau D.A. Activation of human neutrophils by C3a and C5a. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Lett.* 1994; 346: 181-4.
15. Daffern P.J., Pfeifer P.H., Ember J.A., Hugli. T.E. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils: I. C3a stimulation is secondary to eosinophil activation. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 2119-27.
16. Ross G.D., Lambris J.D. Identification of a C3bi-specific membrane complement receptor that is expressed on lymphocytes, monocytes, neutrophils, and erythrocytes. *J. Exp. Med.* 1982; 155: 96-110.
17. Wright S.D., Rao P.E., van Voorhis W.C. Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; 80: 5699-703.
18. Vik D.P., Fearon D.T. Cellular distribution of complement receptor type 4 (CR4): expression on human platelets. *J. Immunol.* 1987; 138: 254-8.
19. Ghebrehiwet B., Lim B.-L., Peerschke E.I.B., Willis A.C., Reid K.B.M. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kDa cell surface glycoprotein that binds to the globular «heads» of C1q. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1809-21.
20. Leigh L.E., Ghebrehiwet B., Perera T.P., Bird I.N., Strong P., Kishore U. et al. C1q-mediated chemotaxis by human neutrophils: involvement of gC1qR and G-protein signalling mechanisms. *Biochem. J.* 1998; 330 (Pt 1): 247-54.
21. Ghiran L., Klickstein L.B., Nicholson-Weller A. Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 21024-31.
22. Otabor L., Tyagi S., Beurskens F.J., Ghiran L., Schwab P., Nicholson-Weller A. et al. A role for lipid rafts in C1q-triggered O₂⁻ generation by human neutrophils. *Mol. Immunol.* 2004; 41: 185-90.
23. Mechnikov I.I. *Immunity in infectious diseases*. Spb. izdanie K.L. Rikera; 1903. (in Russian)
24. Wirthmueller U., Dewald B., Thelen M., Schafer M.K., Stover C., Whaley K. et al. Properdin, a positive regulator of complement activation, is released from secondary granules of stimulated peripheral blood neutrophils. *J. Immunol.* 1997; 158: 4444-51.
25. Botto M., Lissandrini D., Sorio C., Walport M.J. Biosynthesis and secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 1992; 149: 1348-55.
26. Hogasen A.K., Wurzner R., Abrahamsen T.G., Dierich M.P. Human polymorphonuclear leukocytes store large amounts of terminal complement components C7 and C6, which may be released on stimulation. *J. Immunol.* 1995; 154: 4734-40.
27. Nguyen H.X., Galvan M.D., Anderson A.J. Characterization of early and terminal complement proteins associated with polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation.* 2008; 5: 26.
28. Kokryakov V.N. *Biology of animal antibiotics*. Spb: Nauka; 1999. (in Russian)
29. Kokryakov V.N., Berlov M.N. The concept of the Mechnikov «tsitazah» in the light of modern biomedical research. *Klinicheskaya patofiziologiya.* 2016; 22: 97-103. (in Russian)
30. Baker P.J., Lint T.F., Siegel J., Kies M.W., Gewurz H. Potentiation of C567-initiated lysis by leukocyte cationic proteins, myelin basic proteins, and lysine-rich histones. *Immunology.* 1976; 30: 467-73.
31. Baker P.J., Lint T.F., McLeod B.C., Behrends C.L., Gewurz H. Studies on the inhibition of C56-induced lysis (reactive lysis) VI. Modulation of C56-induced lysis by polyanions and polycations. *J. Immunol.* 1975; 114: 554-8.
32. Lint T.E., Behrends C.L., Gewurz H. Serum lipoproteins and C567-INH activity. *J. Immunol.* 1977; 119: 883-8.
33. Carr A.C., Myzak M.C., Stocker R., McCall M.R., Frei B. Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. *FEBS Lett.* 2000; 487: 176-80.
34. Sokolov A.V., Ageeva K.V., Cherkalina O.S., Pulina M.O., Zakharova E.T., Prozorovskii V.N. et al. Identification and properties of complexes formed by myeloperoxidase with lipoproteins and ceruloplasmin. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2010; 163: 347-55.
35. Johnson U., Ohlsson K., Olsson I. Effects of granulocyte neutral proteases on complement components. *Scand. J. Immunol.* 1976; 5: 421-6.
36. Orr F.W., Varani J., Kreutzer D.L., Senior R.M., Ward P.A. Digestion of the fifth component of complement by leukocyte enzymes. Sequential generation of chemotactic activities for leukocytes and for tumor cells. *Am. J. Pathol.* 1979; 94: 75-83.
37. Kirschfink M., Borsos T. Binding and activation of C4 and C3 on the red cell surface by non-complement enzymes. *Mol. Immunol.* 1988; 25: 505-12.
38. Maison C.M., Villiers C.L., Colomb M.G. Proteolysis of C3 on U937 cell plasma membranes. Purification of cathepsin G. *J. Immunol.* 1991; 147: 921-6.
39. Huber-Lang M., Sarma J.V., Zetoune F.S., Rittirsch D., Neff T.A., McGuire S.R. et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat. Med.* 2006; 12: 682-7.
40. Suter S., Nydegger U.E., Roux L., Waldvogel F.A. Cleavage of C3 by neutral proteases from granulocytes in pleural empyema. *J. Infect. Dis.* 1981; 144: 499-508.
41. Carlo J.R., Spitznagel J.K., Studer E.J., Conrad D.H., Ruddy S. Cleavage of membrane bound C3bi, an intermediate of the third component of complement, to C3c and C3d-like fragments by crude leucocyte lysosomal lysates and purified leucocyte elastase. *Immunology.* 1981; 44: 38191.
42. Gaither T.A., Hammer C.H., Gadek J.E., Katusha K., Santella M., Frank M.M. Cleavage of membrane-bound C3b and C3bi by viable human neutrophils (PMN). *Mol. Immunol.* 1983; 20: 623-35.
43. Tosi M.F., Zakem H., Berger M. Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized *Pseudomonas* as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J. Clin. Invest.* 1990; 86: 300-8.
44. Segelmark M., Persson B., Hellmark T., Wieslander J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? *Clin. Exp. Immunol.* 1997; 108: 167-74.
45. O'Flynn J., Dixon K.O., Faber Krol M.C., Daha M.R., van Kooten C. Myeloperoxidase directs properdin-mediated complement activation. *J. Innate Immun.* 2014; 6: 417-25.
46. Zabucchi G., Menegazzi R., Roncelli L., Bertoncin P., Tedesco F., Patriarca P. Protective and inactivating effects of neutrophil myeloperoxidase on C1q activity. *Inflammation.* 1990; 14: 41-53.
47. Vogt W. Complement activation by myeloperoxidase products released from stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Immunobiology.* 1996; 195: 334-46.
48. Rainard P. Activation of the classical pathway of complement by binding of bovine lactoferrin to unencapsulated *Streptococcus agalactiae*. *Immunology.* 1993; 79: 648-52.
49. Kijlstra A., Jeurissen S.H. Modulation of classical C3 convertase of complement by tear lactoferrin. *Immunology.* 1982; 47: 263-70.
50. Ogundele M.O. A novel anti-inflammatory activity of lysozyme: modulation of serum complement activation. *Mediators Inflamm.* 1998; 7: 363-5.

51. Borenstein L.A., Selsted M.E., Lehrer R.I., Miller J.N. Antimicrobial activity of rabbit leukocyte defensins against *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Infect. Immun.* 1991; 59: 1359-67.
52. Panyutich A.V., Szold O., Poon P.H., Tseng Y., Ganz T. Identification of defensin binding to C1 complement. *FEBS Lett.* 1994; 356: 169-73.
53. Prohaszka Z., Nemet K., Csermely P., Hudecz F., Mezo G., Fust G. Defensins purified from human granulocytes bind C1q and activate the classical complement pathway like transmembrane glycoprotein gp41 of HIV-1. *Mol. Immunol.* 1997; 34: 809-16.
54. van den Berg H.R., Faber-Krol M.C., Wetering S., Hiemstra P.S., Daha M.R. Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. *Blood.* 1998; 92: 3898-903.
55. Groeneveld T.W.L., Ramwadhoebe T.H., Trouw L.A., van den Ham D.L., van der Borden V., Drijfhout J.W. et al. Human neutrophil peptide-1 inhibits both the classical and the lectin pathway of complement activation. *Mol. Immunol.* 2007; 44: 3608-14.
56. Umnyakova E.S., Berlov M.N., Kokryakov V.N. Defensins as the regulators of the complement system. *Rossiyskii immunologicheskii zhurnal.* 2014; 8 (17): 414-417. (in Russian)
57. Bhat S., Song Y.-H., Lawyer C., Milner S.M. Modulation of the complement system by human β -defensin 2. *J. Burns Wounds.* 2007; 5: 75-83.
58. Chen J., Xu X.M., Underhill C.B., Yang S., Wang L., Chen Y. et al. Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 4614-22.
59. Berlov M.N., Umnyakova E.S., Leonova T.S., Milman B.L., Krasnodembskaya A.D., Ovchinnikova T.V. i dr. Arenitsina-1 interaction with the protein C1q. *Bioorganicheskaya himiya.* 2015; 41: 664-8. (in Russian)
60. Ovchinnikova T.V., Aleshina G.M., Balandin S.V., Krasnodembskaya A.D., Markelov M.L., Frolova E.I. et al. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina*. *FEBS Lett.* 2004; 577: 209-4.
61. Berlov M.N., Maltseva A.L. Immunity of the lugworm *Arenicola marina*: cells and molecules. *Inv. Surv. J.* 2016; 13: 247-56.
62. Kokryakov V.N., Harwig S.S.L., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V. et al. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* 1993; 327: 231-6.
63. Zanetti M., Gennaro R., Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 1995; 374: 1-5.
64. Berlov M.N., Umnyakova E.S., Leonova T.S., Pashinskaya L.D., Kokryakov V.N. The action of antimicrobial peptides on the activation of the complement system. *Rossiyskii immunologicheskii zhurnal.* 2016; 10 (19): 75-7. (in Russian)
65. Umnyakova E.S., Leonova T.S., Berlov M.N., Kokryakov V.N. Interaction of antimicrobial peptides with complement protein C1q. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal.* 2016; 16: 241-2. (in Russian)

Сведения об авторах

Берлов Михаил Николаевич, канд. биол. наук., ст. науч. сотр. лаборатории общей патологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург), e-mail: berlov@yandex.ru

Умнякова Екатерина Сергеевна, науч. сотр. лаборатории общей патологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург), e-mail: umka-biolog@mail.ru

Кокряков Владимир Николаевич, доктор биол. наук, профессор, зав. лабораторией общей патологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург), e-mail: kokryak@yandex.ru

УДК 57.085.23

Изучение регенеративного потенциала клеток плаценты в модельных экспериментах на мышах

Богданенко Е.В.¹, Сергиевич Л.А.², Карнаухов А.В.², Карнаухова Е.В.²,
Карнаухова Н.А.², Манохина И.А.², Карнаухов В.Н.²

¹ — ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, д. 3

Плацента может быть источником как мезенхимальных, так и гематopoэтических стволовых клеток. Человеческая плацента широко используется в косметологии, но ее свойства в свете возможного применения для трансплантации в регенеративной медицине до конца не ясны. С целью изучения закономерностей приживления пересаженных во взрослый организм клеток цельной фракции плаценты проведены модельные эксперименты на мышах линии C57BL/6. **Методы.** Для этого использовали суспензию плаценты от плодов 18–20-го дня беременности разных способов обработки. Один из родителей каждого плода нес ген зеленого флуоресцентного белка — Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J. Реципиентами являлись интактные или облученные в сублетальной дозе мыши 4–6-мес. возраста линии C57BL/6, не несущие этот трансген. Трансплантация суспензии проводилась внутривенно или внутрибрюшинно, при этом второй способ оказался предпочтительным как намного более безопасный. **Результаты.** Использование флуоресцентной микроскопии показало образование в селезенке экзocolоний, а в костном мозге — незначительное количество светящихся клеток только у облученных мышей, начиная с 11-х суток после облучения. Показано, что донорские GFP⁺-клетки обнаруживались в организме реципиента только в том случае, если использовались плаценты плодов от самок с геном GFP. Анализ суспензии клеток плаценты на маркеры CD45 и CD117 показал наличие среди них гематopoэтических стволовых клеток и их дифференцированных потомков — лейкоцитов. **Заключение.** Полученные в данной работе результаты могут быть в дальнейшем использованы при разработке способов лечения и продления жизни собственным клеточным материалом женщин, родивших детей и сохранивших после этого свою плаценту в криобанке.

Ключевые слова: плацента, регенеративная медицина, стволовые клетки, облучение, продление жизни, GFP, мыши, трансплантация, криоконсервация, информационная гипотеза старения.

Для цитирования: Богданенко Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухов А.В., Карнаухова Е.В., Карнаухова Н.А., Манохина И.А., Карнаухов В.Н. Изучение регенеративного потенциала клеток плаценты в модельных экспериментах на мышах. Патогенез. 2017; 15(1): 24–33.

Для корреспонденции: Богданенко Елена Валентиновна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярных основ болезней зависимости. НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: lenabogdval@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.01.2017

Study of the regenerative potential of placental cells in model experiments on mice

Bogdanenko E.V.¹, Sergievich L.A.², Karnaukhov A.V.², Karnaukhova E.V.²,
Karnaukhova N.A.², Manokhina I.A.², Karnaukhov V.N.²

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315 Russia

² — Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

A placenta may be a source of both mesenchymal and hematopoietic stem cells. The human placenta is widely used in cosmetology but its properties are not quite clear in light of its possible application for a transplantation in the regenerative medicine. The aim of this report was to study regularities of engraftment of an entire cellular placenta fraction transplanted to an adult organism in the model experiments on mice of the C57BL/6 strain. **Methods.** The placental suspension obtained from fetuses of the 18–20 days of pregnancy was used. One of their parents carried the Tg(ACTB-EGFP)1Osb/J green fluorescent protein gene. The 4 to 6 months old C57BL/6 mice without this transgene and intact or irradiated in the sublethal dose were used as recipients. The suspension was transplanted intravenously or intraperitoneally, the second route of administration was being preferable as much more safe. **Results.** The using of fluorescent microscopy showed the exocolony formation in a spleen and the presence of the negligible quantity of the luminous cells only in the bone marrow of the irradiated mice starting with the 11th irradiation day. It was shown that the donor cells were appeared in the recipient organism only in the case when the placentas of fetuses from the females carrying GFP gene were used. An analysis of the placenta cell suspension on CD45 and CD117 markers revealed among them the presence of the hematopoietic stem cells as well as leucocytes which were their differentiated progenies. **Conclusion.** Results obtained in this work may be used in future to develop the methods of therapy and life prolongation of the delivered women who reserved their own placenta by cryopreservation using their own cellular substance.

Key words: placenta, regenerative medicine, stem cells, radiation, life extension, GFP, mice, transplantation, cryopreservation, information hypothesis of aging.

For citation: Bogdanenko E.V., Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Karnaukhova N.A., Manokhina I.A., Karnaukhov V.N. Study of the regenerative potential of placental cells in model experiments on mice. *Patogenez*. 2017; 15(1): 24–33 (In Russian).

For correspondence: Bogdanenko Elena V., Doctor. *biol. Sciences, the Vedas. scientific. et al. lab. Depending on the molecular basis of diseases, Institute of General Pathology and Pathophysiology RAS, Moscow, Russia*, e-mail: lenabogdval@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 20.01.2017

Введение

Использование плаценты в косметологии началось еще несколько десятков лет назад и является широко используемым и разрекламированным средством для омоложения кожи. В целях омоложения стареющего организма, а также иммуностимуляции больных с различными видами заболеваний уже давно были рекомендованы внутримышечные введения суспензии плаценты [1]. Некоторые современные исследования, проведенные на мышах, также показали антивозрастной эффект сингенной трансплантации суспензии клеток терминальной плаценты (18-й день беременности), введенной внутривнутрибрюшинно [2].

Однако окончательной ясности о степени эффективности таких процедур и о механизмах их действия пока нет, в частности потому, что в состав суспензии входят различные типы клеток, а присутствие некоторых из них в плаценте было установлено совсем недавно [3–6]. В то же время предпочтение в экспериментальной медицине отдается использованию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) плаценты, так как они не содержат рецепторов главного комплекса гистосовместимости второго типа. МСК могут ингибировать Т-клеточную пролиферацию и дифференцировку дендритных клеток, которые считаются ключевыми звеньями активации аутоиммунных заболеваний и реакции «трансплантант против хозяина» [7]. Для улучшения приживаемости гематопозитических стволовых клеток (ГСК), выделенных из пуповинной крови, перспективной представляется возможность их трансплантации совместно с МСК [3, 8, 9].

Плацента является источником не только МСК, но и ГСК. В частности, для человеческой плаценты показано [3], что в ней содержатся ниши для ГСК с 6-й недели беременности и до стадии зрелой плаценты; она содержит незрелые ГСК плода и стволовые клетки, экспрессирующие CD34 в процессе онтогенеза. Зрелая плацента человека содержит в несколько раз больше таких клеток, чем пуповинная кровь [3]. Из зрелой плаценты человека выделяют также амниотические эпителиальные клетки. Они экспрессируют поверхностные маркеры Oкт-4 и nanog, присутствующие на эмбриональных стволовых клетках и клетках зародышевой линии, а также на плюрипотентных стволовых клетках [10].

Что касается модельных экспериментов на мышах, то в них был обнаружен гематопозитический потенциал CD117⁺ стволовых клеток из амниотической жидкости. Эти клетки оказались способными к репопуляции клеточного состава костного мозга у иммунодефицитных животных [11]. Также была показана функциональная стабильная интеграция стволовых клеток из амниотической

жидкости в скелетные мышцы мутантных мышей с мышечной дистрофией с увеличением их продолжительности жизни до 70% [12]. В работе [13] было обнаружено, что изогенные клетки плаценты на 15-й день беременности оказались пригодными для лечения гипопластической анемии мутантных мышей (WW^V) после их внутривнутрибрюшного введения облученным животным.

Таким образом, перспективы использования клеток плаценты для лечения различных болезней и омоложения выглядят привлекательными. В то же время еще в 60-х годах прошлого века было показано, что клетки плаценты являются иммунологически компетентными и содержат антигены, вызывающие их отторжение [14, 15]. У больных гемобластомами после трансплантации аллогенных ГСК введение МСК не снижало частоту возникновения реакции «трансплантант против хозяина» [16], а у детей с лейкозами введение МСК давало острую реакцию в виде острой нехватки воздуха, повышения температуры и давления, а также болевого синдрома [8]. Таким образом, введение культивированных клеток плаценты пока не дало убедительного результата, несмотря на успех в наработке нужного для трансплантации количества клеток. Неясно даже, клетки какого происхождения — детские или материнские — способны пролиферировать при культивировании [17, 18]. Работ по исследованию способов применения цельной фракции плаценты для трансплантации, как менее трудозатратных по сравнению с культивированием и выделением из нее отдельных фракций, очень мало. Остается также открытым вопрос о приживаемости клеток плаценты в организме реципиента. Некоторые авторы связывают положительное воздействие после их введения не со встраиванием в организм хозяина, а с паракринным эффектом [19]. Как и в случае с культивированием, до конца не выяснен вопрос, клетки какой части плаценты — материнской или детской — способны приживаться в организме реципиента [4].

Поэтому целью нашей работы было выяснение закономерностей приживания в организме реципиента и регенеративной способности клеток цельной фракции плаценты, как наиболее просто получаемой, и определение перспектив, связанных с применением плаценты в регенеративной медицине и геронтологии. В соответствии с этой целью мы провели модельные эксперименты на мышах инбредной линии C57BL/6.

Материалы и методы

Животные. В эксперименте использовались самки и самцы мышей в возрасте 4–6 мес., несущие ген зеленого флуоресцентного белка (Enhanced Green Fluorescent Pro-

tein — EGFP, Tg(CTB-EGFP)10sb/J,) разводимые на основе инбредной линии C57BL/6 EGFP^{-/-}.

Животные были получены при содействии А.М. Малащенко из Научного Центра биомедицинских технологий РАМН, куда они поступили из Jackson Laboratory, Bar Harbor, США с любезного разрешения А.В. Червонского. Трансген GFP в клетках донора (GFP⁺ мыши) использовался как метка для определения их приживаемости в организме не несущего трансген GFP реципиента (GFP⁻ мыши) [20—23]. Мыши содержались в виварии ИБК РАН по 1—3 мыши в клетке на рационе из гранулированного корма с дополнительной подкормкой зерносмесью, состоящей из пшеницы, ячменя, красного проса, семечек подсолнуха, кукурузы и травяных гранул.

Было сформировано четыре группы животных. 11 животных контрольной группы только облучали. В трех экспериментальных группах проводилась сингенная трансплантация клеток зрелой плаценты 18—20-го дня беременности 5, 11 и 5 мышам-реципиентам соответственно. В первой экспериментальной группе проводился безоблучательный вариант трансплантации. В других двух экспериментальных группах за сутки до введения клеток плаценты реципиенты получали дозу радиации 6,5 Гр (LD_{50/30}).

Для выяснения с помощью маркера GFP принадлежности прижившихся клеток плаценты матери или плоду проводились два варианта скрещивания самцов и самок:

- 1) GFP⁺♀ × GFP⁻♂ или GFP⁺○ × GFP⁺♂;
- 2) GFP⁻♀ × GFP⁺♂.

Так как часть клеток плаценты принадлежит матери, а часть плоду, то в первом варианте скрещивания белок GFP в материнской части экспрессируется всегда, а в детской части он или экспрессируется, или нет. Во втором варианте скрещивания в материнской части плаценты белок GFP не экспрессируется, а в детской части также возможен оба варианта.

В первом безоблучательном эксперименте при трансплантации использовались клетки плаценты, где как детская, так и материнская части плаценты экспрессируют GFP белок. Во втором эксперименте использовались клетки плаценты, где клетки материнской части экспрессировали GFP белок, а детской — в одном случае экспрессировали GFP белок, а в другом нет. В третьем эксперименте облученным мышам проводилась трансплантация клеток плаценты, где детская часть экспрессировала GFP белок, а материнская — нет.

Инъекции проводили внутривенно (в хвостовую вену) и внутрибрюшинно (первая экспериментальная группа) и внутрибрюшинно (вторая и третья экспериментальные группы).

Источник рентгеновского облучения. Облучение животных проводилось сотрудниками Группы источников излучений Института биофизики клетки РАН г. Пущино на рентгеновской установке РУТ-250-15-2 (РУМ 17), I = 15 мА, U = 200 кВ, с фильтрами из меди и алюминия, толщиной по 1 мм каждый, мощность излучения 1 Гр/мин.

Получение суспензии клеток плаценты и их трансплантация. Плаценту выделяли у самок на 18—20 день беременности и измельчали ее ножницами на часовом стекле в 400 мкл PBS.

Для выделения клеток массу, полученную после измельчения плаценты в 400 мкл PBS на часовом стекле, переносили в стеклянный гомогенизатор и перетирали ее

с помощью тefлонового пестика. Гомогенат разбавляли 400 мкл PBS, фильтровали через фильтр с размером ячеек 70 мкм и центрифугировали его при 300 g 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 400—500 мкл PBS в зависимости от количества используемых одновременно плацент (2 или 3) и вводили полученную суспензию внутрибрюшинно (3—5*10⁶ клеток) инсулиновым шприцем. Для внутривенного введения методика выделения клеток была аналогичной, но использовали только 1 плаценту у реципиента, а ресуспендирование после центрифугирования проводили в 100 мкл PBS (1,6 ± 0,2 млн клеток).

Для ферментативного выделения клеток к измельченной плаценте добавляли 2-кратный объем 0,1% раствора коллагеназы I, все тщательно перемешивали и ставили в термостат на 37°C. Через 25 мин смесь пипетировали и инкубировали еще 25 мин. Затем еще раз пипетировали полученную массу до устранения комочков, фильтровали через фильтр с размером ячеек 70 мкм и центрифугировали при 300 g 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 100—500 мкл в зависимости от способа введения. Количество клеток при таком выделении в расчете на 1 плаценту составило 2,7 ± 0,3 млн клеток.

Общее количество выделенных из плацент клеток подсчитывали в камере Горяева. Для определения в них процента GFP⁺ клеток 10 мкл готовой к введению суспензии наносили на полилизинное предметное стекло, которое накрывали покровным стеклом. Затем фотографировали 10—20 полей зрения равномерно по всему препарату; одно и то же поле снимали дважды — в свете флуоресценции и в ДИК (дифференциальном интерференционном контрасте). При освещении светом с длиной волны в диапазоне 395—475 нм GFP флуоресцирует в зеленой области спектра с максимумом флуоресценции на длине волны 508 нм. В работе использовали флуоресцентный микроскоп Axio-Imager Z1 с цветной цифровой камерой AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия).

Выделение селезенки, тимуса и костного мозга. Мышей-реципиентов забивали дислокацией шейных позвонков, начиная с 5-го дня после введения клеток плаценты. Затем извлекали тимус и селезенку и помещали их в фосфатно-солевой буфер, после чего промывали и взвешивали. Органы протирали с помощью скальпеля через капроновый фильтр с размером пор 70 мкм с использованием фосфатно-солевого буфера в объеме 1 мл для тимуса и 2 мл для селезенки. Костный мозг выделяли из одной бедренной кости путем ее измельчения в фарфоровой ступке с раствором фосфатно-солевого буфера в объеме 600 мкл. Полученную суспензию фильтровали через капроновый фильтр с диаметром пор 70 мкм.

Подсчет собственных колоний (эндоколоний) у облученных мышей проводили на диафрагмальной, а донорских колоний (экзоколоний) как на диафрагмальной, так и висцеральной поверхностях целой селезенки. Их количество служило показателем степени восстановления селезенки после облучения и приживаемости трансплантированных клеток плаценты.

Определение количества GFP⁺ клеток в органах реципиентов. По 10 мкл суспензии костного мозга, тимуса и селезенки помещали на предметные стекла, покрытые полилизинном (Thermo scientific, Германия), и накрывали покровным стеклом 20 x 20 мм. Присутствие GFP⁺ клеток выявляли таким же способом, как и в суспензии плаценты. GFP⁺ клетки в препарате подсчитывали на восьми го-

горизонтальных дорожках от левого до правого края покровного стекла через равные промежутки между ними. Количество клеток оценивали в условных единицах:

- 1 — от 5 до 40 клеток на препарат;
- 2 — от 41 до 160 клеток;
- 3 — 161 до 400 клеток;
- 4 — от 401 до 600 клеток;
- 5 — более 600 клеток на препарат.

Иммунофлуоресценция. Экспрессию мембранных рецепторов на клетках плаценты анализировали с использованием моноклональных антител к CD117 (BioLegend, Сан-Диего, штат Калифорния, США) и CD45R/B220 (BD Biosciences, Сан Хосе, Калифорния, США), меченных phycoerythrin (PE). Для этого клетки инкубировали в течение 1 ч при 4°C в темноте. Затем клетки промывали в фосфатно-солевом буфере и подсчитывали по методике, описанной выше для клеток плаценты.

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерного языка программирования МАТЕМАТИКА 5.2. Доверительную вероятность Р определяли стандартным образом с использованием критерия Стьюдента. Результаты представлены как $M \pm m$, где M — среднее значение, m — стандартная ошибка. Аппроксимацию экспериментальных данных проводили с использованием полиномиальных функций 1-го порядка с определением остаточного среднеквадратичного отклонения.

Результаты и обсуждение

Поскольку для человека, как правило, доступно и приемлемо использование только зрелой плаценты, то в модельных экспериментах на животных мы использовали зрелую плаценту мышей (18–20 день беременности). Для проверки приживаемости и регенеративной способности проводилась сингенная трансплантация клеток плаценты интактным и сублетально облученным мышам. Для такого варианта оказалось эффективным одновременное использование не менее двух плацент. Наибольшее количество клеток в расчете на плаценту было получено при использовании коллагеназы вместо простого механического измельчения органа, что составило $2,7 \pm 0,3$ млн клеток (из них $0,6 \pm 0,02$ млн GFP⁺ клеток) против $1,6 \pm 0,2$ млн (из них $0,16 \pm 0,02$ млн GFP⁺ клеток). Интересно, что такой способ обработки плаценты коллагеназой не привел к повышению приживаемости клеток трансплантата у облученных животных (табл. 1, 16-е сутки). Возможно, это связано с частичным нарушением функциональности клеток, обработанных коллагеназой.

В первом эксперименте клетки плаценты (в материнской и детской частях плаценты экспрессируется GFP белок) вводились необлученным GFP⁻ животным. Органы мышей-реципиентов исследовали на 5–8-й день после трансплантации, исходя из того, что в наших предыдущих экспериментах по безоблучательной сингенной трансплантации клеток костного мозга максимум заселения клетками донора селезенки и костного мозга реципиента наблюдался именно в эти сроки [21]. Прижившихся клеток донора, экспрессирующих GFP белок, в тимусе и костном мозге реципиентов выявлено не было, независимо от способа выделения клеток плаценты (с коллагеназой или без нее) как при внутривенном, так и при внутрибрюшинном введении суспензии плаценты. В селезенке были

обнаружены только единичные GFP⁺ клетки после внутрибрюшинного введения суспензии плаценты, не обработанной коллагеназой. При этом у реципиентов колоний на селезенке обнаружено не было, что совпадает с данными литературы о том, что они образуются только у облученных животных [24]. Таким образом, введение интактным животным цельной фракции клеток плаценты оказалось неэффективным.

Во втором эксперименте после внутривенного введения в большинстве случаев наступала мгновенная смерть облученных реципиентов, вероятно, по причине наличия в ней факторов тромбообразования (коллагена, мелкой взвеси ткани плаценты), что отмечают и другие исследователи [14, 15], хотя клеток при этом вводилось значительно (в 2–3 раза) меньше, чем при внутрибрюшинном введении. Поэтому, в конечном счете, мы остановились на варианте внутрибрюшинного введения. Родительские пары для плодов, от которых получали плаценты, подбирали по принципу:

$$\text{GFP}^+_{\text{♀}} \times \text{GFP}^+_{\text{♂}}$$

или

$$\text{GFP}^+_{\text{♀}} \times \text{GFP}^+_{\text{♂}}$$

Среди плацент отбирались те, у которых и детская, и материнская часть несли ген GFP (т.е. его несли и плод, и мать). На 8–29-е сутки после облучения у реципиентов были обнаружены GFP⁺ экзоколонии на селезенке или GFP⁺ клетки в ее суспензии. В небольшом количестве в нескольких случаях клетки донора были найдены в суспензии костного мозга и в единичном случае — в суспензии тимуса (табл. 1). Количество и размер флуоресцирующих экзоколоний в селезенке увеличивались, начиная с 11-х суток после облучения. Заселение начиналось вдоль сосудов на висцеральной стороне селезенки в области ее ворот с последующим расселением в паренхиме и образованием колоний, выходящих на противоположную, диафрагмальную сторону (рис. 1, А). К 21-му дню после облучения наблюдалось до 4-х достаточно крупных колоний (до 3 мм в диаметре), проросших на внешнюю сторону селезенки, при этом много больших флуоресцирующих колоний находилось на висцеральной стороне вдоль сосудов органа (рис. 1, Б). На 29-й день после облучения колонии, состоящие из разнородных флуоресцирующих клеток, оставались только в периферической области стромы селезенки с переходом на поддерживающие этот орган ткани. Несколько колоний было обнаружено в брыжейке как около желудка, так и в самом низу брюшной полости.

Для реципрокной трансплантации клеток плаценты в качестве реципиента была взята мышь, несущая ген GFP. Ей были трансплантированы клетки плаценты GFP⁻ плода, полученного от GFP⁻ родителей. На 15-е сутки после облучения на диафрагмальной поверхности селезенки этого животного были обнаружены 4 крупные несветящиеся черные колонии (рис. 1, В), что в корне отличалось от картины облученного контроля, в котором GFP⁺ и GFP⁻ мышей облучали без подсадки им клеток плаценты. В случае облученного контроля можно было наблюдать рост эндоколоний (т.е. образованных собственными клетками селезенки, рис. 1, Г, Д), а в эксперименте параллельно с этим происходило образование экзоколоний.

Внешне колонии представляют собой розовые выпуклости на поверхности селезенки, являющиеся новыми очагами гемопоэза в организме, в котором собственная кроветворная ткань разрушена радиацией. Колонии в селезенке у мышей регистрируются только после воздействия радиации на организм, за исключением мутантной линии WW^V [25]. Рост эндоколоний во 2-м эксперименте начинался с 11–14-х суток после облучения, когда на селезенке выделялись крупные колонии (6–10 штук), постепенно сливавшиеся друг с другом на 15–16 сутки (рис. 2 А, Б). Установлено [24], что у мышей эндоколонии не регистрируются вообще при дозе ЛД_{100/15}. Поскольку в нашем эксперименте мышей облучали сублетальной дозой (ЛД_{50/30}), то появление эндоколоний можно считать закономерным.

Следует отметить различие в динамике образования эндоколоний в этом эксперименте и в группе облученного контроля. В экспериментальной группе с 11-х суток после облучения можно было наблюдать до 10 средних эндоколоний, к 14-м суткам — до 6 более крупных колоний, к 15-м суткам — слившиеся эндоколонии (табл. 1, рис. 2 А, Б).

В то же время в группе облученного контроля к 12–14-м суткам колоний только начинали появляться, к 16-м суткам образовывалось много мелких и единичные большие и лишь к 17-м суткам можно наблюдать слившиеся колонии (табл. 2, рис. 2 В, Г). Это позволяет сделать вывод о том, что клетки трансплантата оказывают стимулирующее влияние на процесс колониеобразования в селезенке.

Таким образом, нами было показано, что трансплантация сингенных клеток цельной фракции плаценты завершается их приживлением, по крайней мере, на срок

нашего наблюдения за реципиентами. Также, судя по времени обнаружения эндоколоний, после облучения ускорялось восстановление селезенки у облученных экспериментальных животных по сравнению с контролем. Однако оставался нерешенным вопрос, клетки какой части плаценты — материнской или детской, или той и другой — приживаются в организме реципиента. Для ответа на него был проведен еще один эксперимент.

В третьем эксперименте облученным мышам проводилась трансплантация клеток плаценты, где детская часть экспрессировала GFP белок, а материнская — нет. На 15–21 сутки после облучения у реципиентов в суспензии костного мозга, селезенки, тимуса в наблюдаемый период GFP⁺ клеток обнаружено не было. На поверхности селезенки на 15–21 сутки наблюдались только слившиеся эндоколонии, а GFP⁺ колонии обнаружены не были. Данный результат согласуется с исследованиями других авторов [17, 18, 26], в которых с помощью кариотипирования было выяснено, что мезенхимальные стволовые клетки плаценты человека имеют материнское происхождение.

Для окончательного решения вопроса о принадлежности прижившихся клеток к материнской или детской части провели трансплантацию клеток плаценты, в которой детская часть была GFP⁺, а материнская — GFP⁻, к GFP-реципиенту. На 15-е сутки после облучения на висцеральной стороне селезенки было обнаружено множество мелких GFP⁺ колоний (рис. 1, Е). GFP⁺ клетки были обнаружены и в суспензии клеток селезенки реципиента. На основании результатов трех вариантов трансплантации нами был сделан вывод, что во всех случаях в организме реципиента приживаются только клетки материнской части плаценты.

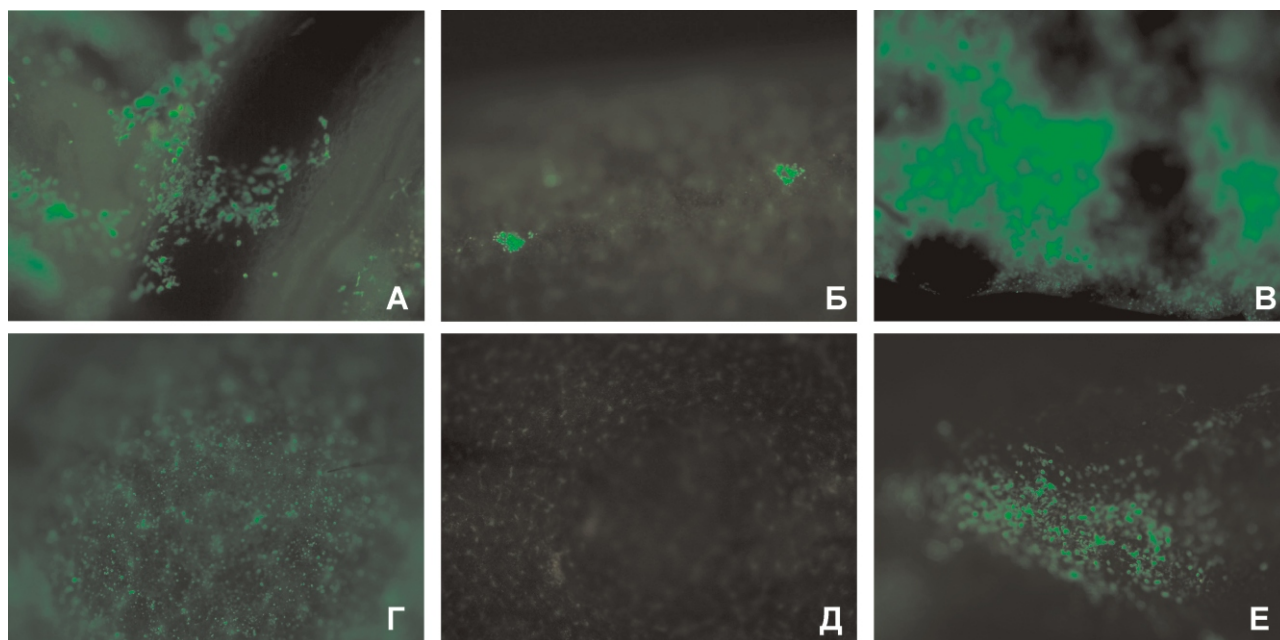


Рис. 1. Колонии в селезенке облученных (6,5 Гр) мышей (А–В, Е — после сингенной трансплантации клеток плаценты): А — 15-е сутки после облучения (п.о.), GFP⁻ мышь, висцеральная сторона селезенки (ув. x100), (в материнской и детской частях плаценты экспрессируется GFP); Б — 21-е сутки п.о., GFP⁻ мышь, диафрагмальная сторона селезенки (ув. x50), (в материнской и детской частях плаценты экспрессируется GFP); В — 15-е сутки п.о., GFP⁺ мышь, диафрагмальная сторона селезенки (ув. x100), (белок GFP не экспрессируется в плаценте); Г — облученный контроль, GFP⁺ мышь, 14-е сутки п.о., диафрагмальная сторона селезенки (ув. X50); Д — облученный контроль, GFP⁻ мышь, 12-е сутки п.о., диафрагмальная сторона селезенки (ув. X50); Е — 15-е сутки п.о., GFP⁻ мышь, висцеральная сторона селезенки (ув. x50), (в материнской частях плаценты экспрессируется GFP).

Приживаемость клеток плаценты, в материнской части которой экспрессируется белок GFP, в организме облученных в дозе 6,5 Гр GFP⁻ мышей

№	Сутки п.о.	Костный мозг, GFP	Селезенка, GFP	Тимус, GFP	Количество колоний в селезенке	Кол-во GFP ⁺ клеток *10 ⁵	Общее кол-во клеток *10 ⁶	Объем суспензии (мкл)	Кол-во плацент
1	8	—	++	+—	Нет	4,8 ± 0,7	4,8 ± 0,7	300 i.p.	3 GFP ⁺
2	11	+—	++	—	GFP ⁻ : 10 средних GFP ⁺ : много мелких колоний на висцеральной стороне вдоль сосудов	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	400 i.p.	2 GFP ⁺
3	12	—+	++	—	GFP ⁻ : 3—4 больших GFP ⁺ : то же	4,8 ± 0,7	4,8 ± 0,7	500 i.p.	3 GFP ⁺
4	13	—+	++	—	GFP ⁻ : то же GFP ⁺ : то же	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	450 i.p.	2 GFP ⁺
5	14	—	+—	—	GFP ⁻ : 6 больших слившихся GFP ⁺ : 10 средних и много мелких колоний на висцеральной стороне вдоль сосудов	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	400 i.p.	2 GFP ⁺
6	15	—	+	—	GFP ⁻ : 1 большая, остальные слившиеся GFP ⁺ : 12 средних и много мелких колоний на висцеральной стороне вдоль сосудов	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	500 i.p.	2 GFP ⁻
7	15	—	+	—	GFP ⁻ : слившиеся колонии GFP ⁺ : то же	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	400 i.p.	2 GFP ⁺
8	16	+	++	—	GFP ⁻ : то же GFP ⁺ : то же	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	430 i.p.	2 GFP ⁺
9	16	+—	+	—	GFP ⁻ : то же GFP ⁺ : то же	12,0 ± 1,7*	5,4 ± 4,0*	400 i.p.	2 GFP ⁺
10	21	+	+	—	GFP ⁻ : то же GFP ⁺ : 15 больших колоний на висцеральной стороне вдоль сосудов, 4 средних на диафрагмальной стороне селезенки (проросли)	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	400 i.p.	2 GFP ⁺
11	29	+	++	—	GFP ⁻ : нет колоний GFP ⁺ : колонии на периферической области стромы селезенки	4,8 ± 0,7	4,8 ± 0,7	400 i.p.	3 GFP ⁺

Примечание. Размер колоний: маленькая — 2 мм, средняя — 3 мм, большая — 4—5 мм; "*" выделение клеток плаценты с использованием фермента коллагеназы I, i.p. — внутрибрюшинно; п.о. — после облучения; P = 0,95

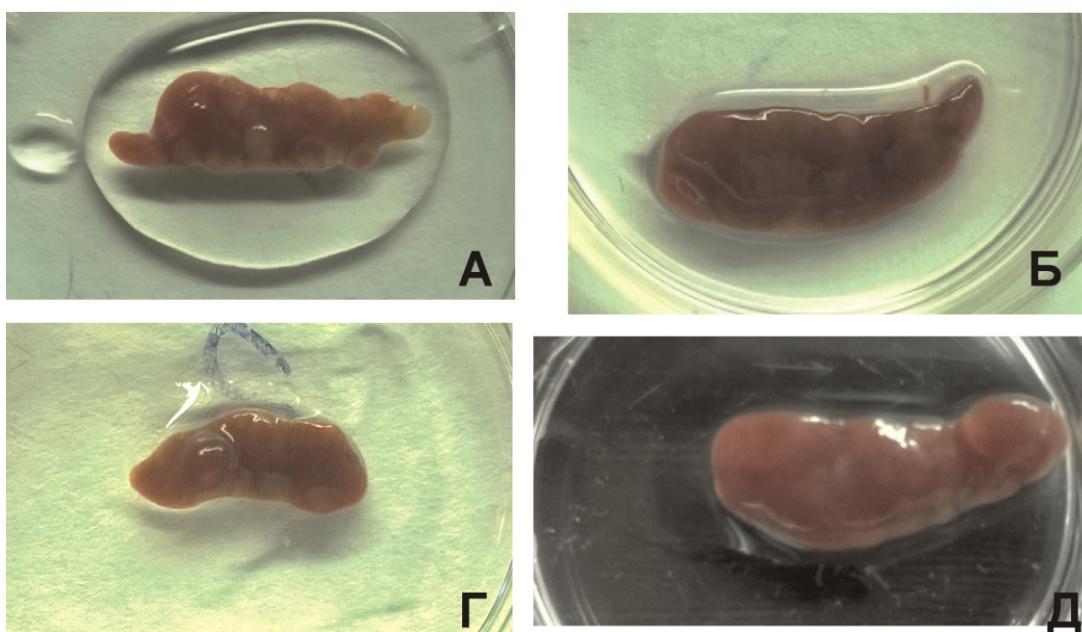


Рис. 2. Колонии в селезенке облученных мышей (6,5 Гр): А, Б, — GFP⁻ реципиент, В, Г — облученный контроль. А — 11-е сутки после облучения (п.о.); Б — 15-е сутки п.о.; В — 14-е сутки п.о.; Г — 16-е сутки п.о.

При безоблучательной трансплантации не наблюдалось существенных изменений в относительных массах селезенки и тимуса. У облученных животных как в опыте, так и в контроле к 21-м суткам после облучения было отмечено постепенное восстановление массы тимуса. Селезенка к этому сроку разрасталась, ее масса превышала контрольные показатели в несколько раз, что, очевидно, связано с колониобразованием и интенсивной пролиферацией собственных клеток, а также с массовой гибелью клеток системы крови реципиента после облучения (рис. 3).

Еще одним доказательством приживаемости клеток именно материнской части плаценты явился результат анализа на CD-маркеры суспензии трансплантируемой плаценты. Для этого нами была взята суспензия плаценты, в которой GFP⁺ клетки принадлежали только детской части плаценты; их насчитывалось 12,3% от общего числа клеток. Анализ такой суспензии на маркер дифференци-

ровки CD45 показал наличие 15,1% CD45 GFP⁻ клеток и 1,2% CD45 GFP⁺ клеток, а на маркер CD117 — наличие 1,3% CD117 GFP⁻ клеток и 0,5% CD117 GFP⁺ клеток от общего количества вводимых клеток. Таким образом, в такой мышинной плаценте GFP⁻ клеток, помеченных маркерами CD117 и CD45, было существенно больше, чем GFP⁺ клеток — в 2,6 и в 12,6 раза соответственно. Вероятно, в детской части плаценты стволовых клеток, способных к заселению, значительно меньше. Так как общая концентрация стволовых клеток в суспензии плаценты оказалась значительно ниже, чем в суспензии костного мозга (неопубликованные данные), то это, по-видимому, не позволило в исследуемые сроки в полном объеме восстановить пораженные органы, особенно костный мозг и тимус.

В литературе есть данные, что для трансплантации использовали только клетки от детской части плаценты, и

Таблица 2

Колонии в селезенке мышей на 12—17 сутки после облучения (облученный контроль, 6,5 Гр)

№	Сутки после облучения	Колонии в селезенке
1	12	Нет
2	12	1 маленькая
3	13	1 маленькая
4	13	1 большая
5	14	Нет
6	14	Нет
7	14	2 средних
8	14	5 средних
9	15	1 средняя
10	16	1 большая и много маленьких
11	17	Слившиеся колонии

Примечание. Размер колоний: маленькая — 2 мм, средняя — 3 мм, большая — 4—5 мм

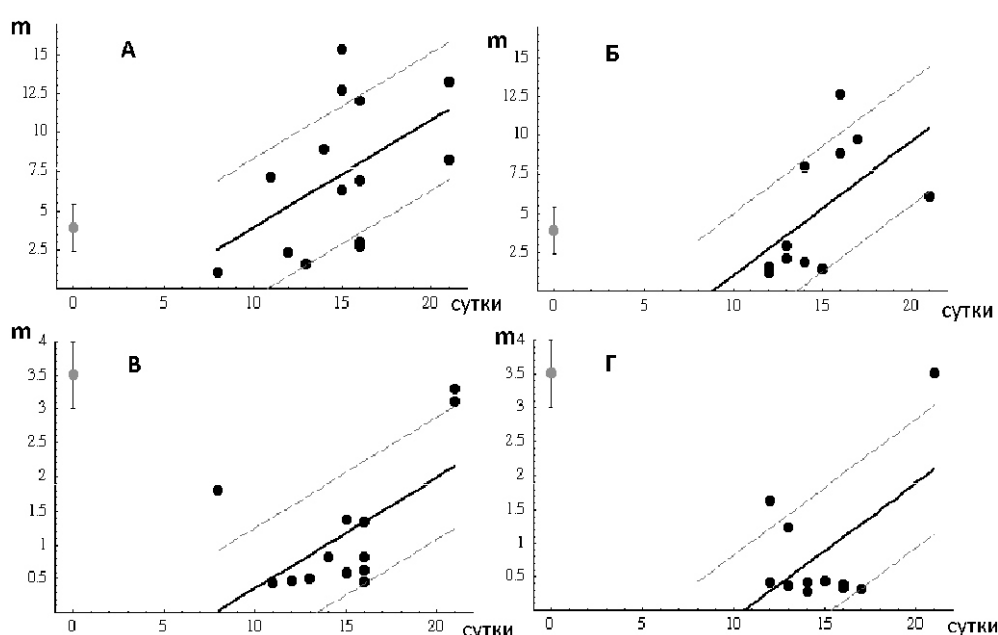


Рис. 3. Зависимости относительных масс селезенки и тимуса (m) от времени (сутки) после облучения: А — селезенка в опыте; Б — селезенка в облученном контроле; В — тимус в опыте; Г — тимус в облученном контроле (P = 0,8). По оси ординат — масса селезенки и тимуса.

именно этот тип клеток был эффективен при экспериментальном лечении мышей, при этом результат был более выраженным при введении 5–10 млн клеток плаценты. Также было показано, что для достижения терапевтического эффекта требуется 15-дневная, а не 18-дневная плацента [13]. В то же время известна работа по применению зрелой плаценты мышей, в которой внутрибрюшинное введение ее суспензии позволило увеличить продолжительность жизни животных в 1,7 раза [2].

Что касается зрелой человеческой плаценты, в которой была удалена отпадающая оболочка материнской части (maternal decidua), в процессе ее культивирования были получены мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки мезодермального материнского происхождения, обладающие высоким пролиферативным потенциалом [26]. У многих клеток плацентарной мембраны (placental septa) при культивировании найдены кластеры дифференцировки CD133, экспрессирующиеся ранними предшественниками недифференцированных гемопоэтических и эндотелиальных клеток — гемангиобластов, и CD34 — маркеры как гемопоэтических, так и эндотелиальных предшественников, [27, 28].

На основании вышесказанного можно предположить, что в наших экспериментах со зрелой мышью плацентой мы наблюдаем заселение селезенки реципиента клетками мезодермального происхождения материнской части плаценты, и среди прижившихся клеток помимо гемопоэтических, вероятно, имеются и общие клетки-предшественники гемопоэтических и эндотелиальных клеток — гемангиобласты.

Ранее мы сообщали о существенном удлинении сроков фертильности самок-реципиентов и увеличении продолжительности жизни мышей после безоблучательной трансплантации костного мозга [20–22, 29]. Эти результаты совместно с предложенной нами ранее информационной теорией старения [30], согласно которой, основной причиной старения является накопление ошибок в геноме вследствие воздействия внешних факторов, таких, как ионизирующее излучение, температура, свободные радикалы, позволяют сделать вывод о возможном терапевтическом эффекте для человека его собственных клеток, криосохраненных в молодом возрасте.

Полученные в данной работе результаты не выявили потенциала безоблучательной трансплантации цельной фракции плаценты, однако успех такой трансплантации облученным реципиентам говорит о том, что эти результаты могут быть использованы в дальнейшем при разработке способов терапии (в том числе лучевой болезни), а также продления жизни собственным клеточным материалом женщин, родивших детей и сохранивших после этого свою плаценту в криобанке.

Список литературы

1. Коркушко О.В., Калиновская Е.Г., Литовченко С.В., Кочубей Н.В. Лечение взвесью плаценты в профилактике преждевременного старения человека. В кн.: *Тканевая терапия по Филатову*. Одесса, 1977: 127–9.
2. Li J., Zhang H., Liu G. Research on anti-aging effect of mouse placenta cells transplantation. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi. Journal of biomedical engineering*. 2010; 27(6): 1312–6.
3. Serikov V., Hounshell C., Larkin S., Green W., Ikeda H., Walters M.C. et al. Human term placenta as a source of hematopoietic cells. *Exp. Boil. Med. (Maywood)*. 2009; 234(7): 813–23.

4. Robin C., Bollerof K., Mendes S., Haak E., Crisan M., Cerisoli F. et al. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(4): 385–95.

5. Rhodes K., Gekas C., Wang W., Lux T., Francis C.S., Chan D.N. et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(3): 252–63.

6. Шабалий В.А., Кучма М.Д., Кирик В.М., Онищенко А.Н., Лукаш Л.Л., Лобынцева Г.С. Криоконсервирование ткани плаценты человека - источник гемопоэтических прогениторных клеток и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012; 7(2): 54–62.

7. Aldinucci A., Rizzetto L., Pieri L., Nosi D., Romagnoli P., Biagioli T. et al. Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution: a new pathway of mesenchymal stem cell immune regulation. *J. Immunol*. 2010; 185(9): 5102–10.

8. Астрелина Т.А., Гомзяков А.Е., Кобзева И.В., Карпова Е.Э., Круглова Я.А., Скоробогатова Е.В. и др. Оценка качества и безопасности применения криоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в клинической практике для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013; 8(4): 82–7.

9. Battiwalla M., Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2009; 11(5): 503–15.

10. Miki T., Lehmann T., Cai H., Stolz D., Storm S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005; 23: 1549–59.

11. Ditadi A., de Coppi P., Picone O., Gautreau L., Smati R., Six E. et al. Human and murine amniotic fluid c-Kit⁺Lin⁻ cells display hematopoietic activity. *Blood*. 2009; 113(17): 3953–60.

12. Piccoli M., Franzin C., Bertin E., Urbani L., Blaauw B., Repele A. et al. Amniotic fluid stem cells restore the muscle cell niche in a HSA-Cre, Smn^{F7/F7} mouse model. *Stem Cells*. 2012; 30: 1675–84.

13. Dancis J., Jansen V., Brown G.F., Gorstein F., Balis M.E. Treatment of hypoplastic anemia in mice with placental transplants. *Blood*. 1977; 50: 663–70.

14. Dancis J., Douglas G.W., Fierer J. Immunological competence of mouse placental cells in irradiated hosts. *Am. J. Obst. & Gynec.* 1966; 94: 50–6.

15. Dancis J., Samuels B.D., Douglas G.W. Immunological competence of placenta. *Science*. 1962; 136: 136–7.

16. Петинати Н.А., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Любимова Л.С., Грибанова Е.О., Шипунова И.Н. и др. Лечение острой реакции «трансплантат против хозяина» у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками из костного мозга донора. *Терапевтический архив*. 2012; 7: 2630.

17. Barlow S., Brooke G., Chatterjee K., Price G., Pelekanos R., Rossetti T. et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008; 17(6): 1095–107.

18. Heazlewood C.F., Sherrell H., Ryan J., Atkinson K., Wells C.A., Fisk N.M. High incidence of contaminating maternal cell overgrowth in human placental mesenchymal stem/stromal cell cultures: a systematic review. *Stem Cells Transl. Med*. 2014; 3(11): 1305–11.

19. Шахпазян Н.К., Астрелина Т.А., Яковлева М.В. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012; 7(1): 23–33.

20. Карнаухова А.В., Карнаухова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Богданенко Е.В., Смирнов А.А. и др. Информационная теория старения: изучение влияния трансплантации костного мозга на продолжительность жизни мышей. *Биофизика*. 2014; 59(4): 790–5.

21. Карнаухова А.В., Карнаухова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Богданенко Е.В., Манохина И.А. и др. Сравнительный анализ эффективности безоблучательной сингенной и аллогенной трансплантации EGFP⁺ клеток костного мозга мышей с использованием метода микроспектрального флуоресцентного анализа. *Биофизика*. 2014; 59(6): 1135–42.

22. Богданенко Е.В., Карнаухова А.В., Карнаухова Е.В., Сергиевич Л.А., Карнаухова Н.А., Манохина И.А. и др. Изучение

возможностей клеточной терапии для продления женской половой функции в модельных экспериментах на мышах. *Патогенез*. 2015; 13(3): 13-7.

23. Сергиевич Л.А., Карнаухова А.В., Карнаухова Е.В., Карнаухова Н.А., Смирнов А.А., Богданенко Е.В. и др. Применение флуоресцентного микроспектрального анализа при исследовании трансплантации EGFP⁺ клеток костного мозга мышей с использованием 5-фторурацила. *Биофизика*. 2014; 59(4): 740-8.

24. Переверзев А.Е. *Кроветворные колониобразующие клетки и физические стресс-факторы*. Л.: Наука; 1986. 172 с.

25. Stroud A.N., Brues A.M. Recovery and regeneration of spleen and thymus after single and divided dose of total body X-ray. *Fed. Proc.* 1955; 14: 148.

26. Semenov O. V., Koestenbauer S., Riegel M., Zech N., Zimmermann R., Zisch A. H. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemnes after isolation. *Am. J. Obst. & Gynec.* 2010; 202: 193.e1-13.

27. Pelosi E., Valtieri M., Coppola S., Botta R., Gabbianelli M., Lulli V. et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 2002; 100: 3203-8.

28. Huber T. L., Kouskoff V., Fehling H. J., Palis J., Keller G. Hemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*. 2004; 432: 625-30.

29. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Manokhina I.A. et al. Informational Theory of Aging: The Life Extension Method Based on the Bone Marrow Transplantation. *Journal of Biophysics*. 2015; Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jbp/aip/686249/>.

30. Карнаухов А.В., Карнаухова Е.В. Информационная гипотеза старения: каким образом «ускользает» от старения зародышевая линия? *Биофизика*. 2009; 54(4): 726-32.

References

1. Korkushko O.V., Kalinovskaya E.G., Lytovchenko S.V., Kochubey N.V. Treatment with a suspension of the placenta in preventing early human aging. In: *Filatov tissue therapy*. Odessa, 1977: 127-9 (in Russian).

2. Li J., Zhang H., Liu G. Research on anti-aging effect of mouse placenta cells transplantation. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi. Journal of biomedical engineering*. 2010; 27(6): 1312-6.

3. Serikov V., Hounshell C., Larkin S., Green W., Ikeda H., Walters M.C. et al. Human term placenta as a source of hematopoietic cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2009; 234(7): 813-23.

4. Robin C., Bollerof K., Mendes S., Haak E., Crisan M., Cerisoli F. et al. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(4): 385-95.

5. Rhodes K., Gekas C., Wang W., Lux T., Francis C.S., Chan D.N. et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(3): 252-63.

6. Chabaliy V.A., Kuchma M.D., Kirik V.M., Onishchenko A.N., Lukash L.L., Lobyntseva G.S. Cryopreservation of human placental tissue - a source of hematopoietic progenitor cells and multipotent mesenchymal stromal cells. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2012; 7 (2): 54-62. (in Russian).

7. Aldinucci A., Rizzetto L., Pieri L., Nosi D., Romagnoli P., Biagioli T. et al. Inhibition of immune synapse by altered dendritic cell actin distribution: a new pathway of mesenchymal stem cell immune regulation. *J. Immunol.* 2010; 185(9): 5102-10.

8. Astrelina T.A., Gomzyakov A.E., Kobzeva I.V., Karpova E.E., Kruglov J.A., Skorobogatov E.V. et al. Evaluation of the quality and safety of cryopreserved placental multipotent mesenchymal stromal cells in clinical practice for clinical applications. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2013; 8 (4): 82-7 (in Russian).

9. Battiwalla M., Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2009; 11(5): 503-15.

10. Miki T., Lehmann T., Cai H., Stolz D., Storm S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005; 23: 1549-59.

11. Ditadi A., de Coppi P., Picone O., Gautreau L., Smati R., Six E. et al. Human and murine amniotic fluid c-Kit⁺Lin⁻ cells display hematopoietic activity. *Blood*. 2009; 113(17): 3953-60.

12. Piccoli M., Franzin C., Bertin E., Urbani L., Blaauw B., Repele A. et al. Amniotic fluid stem cells restore the muscle cell niche in a HSA-Cre, Smn^{F7/F7} mouse model. *Stem Cells*. 2012; 30: 1675-84.

13. Dancis J., Jansen V., Brown G.F., Gorstein F., Balis M.E. Treatment of hypoplastic anemia in mice with placental transplants. *Blood*. 1977; 50: 663-70.

14. Dancis J., Douglas G.W., Fierer J. Immunological competence of mouse placental cells in irradiated hosts. *Am. J. Obst. & Gynec.* 1966; 94: 50-6.

15. Dancis J., Samuels B.D., Douglas G.W. Immunological competence of placenta. *Science*. 1962; 136: 136-7.

16. Petinati N.A., Kuzmin L.A., Parovichnikova E.N., Lubimova L.S., Gribanova E.O., Shipunova I. et al. Treatment of "graft versus host" acute reaction with multipotent mesenchymal stromal cells from the bone marrow donor in patients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Terapevticheskiy Archiv*. 2012; 7: 2630 (in Russian).

17. Barlow S., Brooke G., Chatterjee K., Price G., Pelekanos R., Rossetti T. et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008; 17(6): 1095-107.

18. Heazlewood C.F., Sherrell H., Ryan J., Atkinson K., Wells C.A., Fisk N.M. High incidence of contaminating maternal cell overgrowth in human placental mesenchymal stem/stromal cell cultures: a systematic review. *Stem Cells Transl. Med.* 2014; 3(11): 1305-11.

19. Shahpazyan N.K., Astrelina T.A., Yakovleva M.V. Mesenchymal stem cells from various human tissues: biological properties and assessment of quality and safety for clinical application. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2012; 7(1): 23-33. (in Russian).

20. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Smirnov A.A. et al. Information theory of aging: study of the effect of bone marrow transplantation on the life span of mice. *Biofizika*. 2014; 59(4): 790-5. (in Russian).

21. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Manokhina I.A. et al. Comparative analysis of the effectiveness of non-irradiated syngeneic and allogeneic transplantation of EGFP⁺ bone marrow cells of mice using the method of microspectral fluorescence analysis. *Biofizika*. 2014; 59(6): 1135-42. (in Russian).

22. Bogdanenko E.V., Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Manokhina I.A. et al. The study of stem cell therapy possibility for extension of female sexual function in model experiments on mice. *Patogenez*. 2015; 13(3): 13-7 (in Russian).

23. Sergievich L.A., Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Karnaukhova N.A., Smirnov A.A., Bogdanenko E.V. et al. Application of microspectral fluorescence analysis to study engraftment of EGFP⁺ bone marrow cells of mice with 5-fluorouracil. *Biofizika*. 2014; 59(4): 740-8 (in Russian).

24. Pereverzev A.E. *Hematopoietic colony forming cells and physical stress factors*. L.: Nauka; 1986. 172 p. (in Russian).

25. Stroud A.N., Brues A.M. Recovery and regeneration of spleen and thymus after single and divided dose of total body X-ray. *Fed. Proc.* 1955; 14: 148.

26. Semenov O.V., Koestenbauer S., Riegel M., Zech N., Zimmermann R., Zisch A. H. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemnes after isolation. *Am. J. Obst. & Gynec.* 2010; 202: 193.e1-13.

27. Pelosi E., Valtieri M., Coppola S., Botta R., Gabbianelli M., Lulli V. et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 2002; 100: 3203-8.

28. Huber T. L., Kouskoff V., Fehling H. J., Palis J., Keller G. Hemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*. 2004; 432: 625-30.

29. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V., Sergievich L.A., Karnaukhova N.A., Bogdanenko E.V., Manokhina I.A. et al. Informational Theory of Aging: The Life Extension Method Based on the Bone Marrow Transplantation. *Journal of Biophysics*. 2015. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jbp/aip/686249/>.

30. Karnaukhov A.V., Karnaukhova E.V. Information hypothesis of aging: how the germ-line "escapes" from aging? *Biofizika*. 2009; 54 (4): 726-32 (in Russian).

Сведения об авторах:

Богданенко Елена Валентиновна (Bogdanenko E.V.) — доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярных основ болезней зависимости, e-mail: lenabogdval@mail.ru

Сергиевич Лариса Анатольевна (Sergievich L.A.) — канд.биол.наук, ст. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: larserg@mail.ru

Карнаухов Алексей Валерьевич (Karnaikhov A.V.) — канд.физ.-мат. наук., вед. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: AlexeyKarnaikhov@yandex.ru

Карнаухова Елена Викторовна (Karnaikhova E.V.) — канд.физ.-мат. наук., старший науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: AlexeyKarnaikhov@yandex.ru

Карнаухов Валерий Николаевич (Karnaikhov V.N.) — канд.биол.наук, зав. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: nakarnauhova@mail.ru

Карнаухова Наталья Алексеевна (Karnaikhova N.A.) — ст. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: nakarnauhova@mail.ru

Манохина Ирина Анатольевна (Manokhina I.A.) — млад. науч. сотр. лаб. микроспектрального анализа клеток и клеточных систем, e-mail: Iriman@mail.ru

УДК 616-092.4

Уровень экспрессии гена *sdc1* в стенках дуги аорты и концентрация растворимого фрагмента синдекана-1 в сыворотке крови у АпоЕ-нокаутных мышей

Леонова Е.И.¹, Солонин А.С.¹, Галзитская О.В.², Шайхутдинова Э.Р.³, Лобанов А.В.^{3,4}, Мурашев А.Н.^{3,4}

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., 142290

² Институт белка Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., 142290

³ Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., 142290

⁴ Пушкинский научный центр Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., 142290

Гепарансульфат протеогликан синдекан-1 (CD138), как один из представителей эндотелиального гликокаликса, выполняет функцию защиты стенок сосудов от проникновения патогенов и механического воздействия при движении крови. Одна из важных характеристик CD138 — это его постоянное обновление за счет периодического разрушения и синтеза новых молекул. Процесс разрушения сопровождается отщеплением внеклеточного домена CD138 с поверхности мембраны, которая поступает в кровоток. При развитии воспаления этот процесс усиливается. Отщепленный фрагмент CD138 принято называть «растворимым фрагментом» CD138. Целью данной работы является изучение динамики обновления CD138 в организме АпоЕ нокаутных мышей при развитии атеросклеротической бляшки. **Методы.** Уровень экспрессии гена синдекана-1 (*sdc1*) измеряли с помощью ПЦР в реальном времени. Уровень «растворимого фрагмента» CD138 в сыворотке крови экспериментальных мышей был определен с помощью метода иммуноферментного анализа (Elisa — enzyme-linked immunosorbent assay). **Результаты.** Показано, что концентрация растворимого фрагмента CD138 в сыворотке крови у АпоЕ нокаутных (АпоЕ^{-/-}) мышей и у мышей C57Black увеличивается с возрастом. Причем, у АпоЕ^{-/-} мышей уровень CD138 выше, чем у мышей дикого типа за счет более высокого исходного уровня. При этом с возрастом уровень экспрессии гена *sdc1* в дуге аорты у АпоЕ^{-/-} мышей уменьшается, а у мышей C57Black увеличивается. **Заключение.** Повышенная концентрация растворимого фрагмента CD138 в сыворотке крови мышей свидетельствует о наличии хронической патологии. При развитии атеросклеротической бляшки синтез CD138 замедляется, в то время как отщепление его эктодомена усиливается.

Ключевые слова: синдекан-1; *sdc1*, CD138, атеросклероз; дуга аорты; атерома; гепарансульфат протеогликан, АпоЕ нокаутные мыши.

Для цитирования: Леонова Е.И., Солонин А.С., Галзитская О.В., Шайхутдинова Э.Р., Лобанов А.В., Мурашев А.Н. Уровень экспрессии гена *sdc1* в стенках дуги аорты и концентрация растворимого фрагмента синдекана-1 в сыворотке крови у АпоЕ-нокаутных мышей. Патогенез. 2017; 15(1): 34–39.

Для корреспонденции: Леонова Елена Ивановна, аспирант, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., 142290, e-mail: 1102.elena@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.05.2016

Expression of *sdc1* gene in aortic arch and the serum concentration of «soluble» CD138 in ApoE knockout mice

Leonova E.I.¹, Solonin A.S.¹, Galzitskaya O.V.², Shaykhutdinova E.R.³, Lobanov A.V.^{3,4}, Murashev A.N.^{3,4}

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Moscow Region, Pushchino, 142290, Russia

² Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Moscow Region, Pushchino, 142290, Russia

³ Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow Region, Pushchino, 142290, Russia

⁴ Pushchino scientific center, Russian Academy of Sciences, Moscow Region, Pushchino, 142290, Russia 142290, Russia

Background. Heparan sulfate proteoglycan Syndecan-1 (CD138), as a part of the endothelial glycocalyx, protects vessel walls from the penetration of pathogens and mechanical effects of blood pressure. The ability of constant remodeling is one of the important characteristics of CD138. The CD138 ectodomain is constitutively shed from the cell surface converting the soluble form which enters the bloodstream. This process enhances in response to inflammation. The shed form of CD138 is named «soluble» CD138. The main goal of the work is the analysis of dynamics of CD138 remodeling in the organism of ApoE knockout mice during the atherosclerotic plaque formation. **Methods.** The *sdc1* gene expression in aortic arch was determined by real time PCR. En-

zyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect «soluble» CD138. **Results.** In this paper we showed that the level of «soluble» CD138 in serum of ApoE knockout (ApoE^{-/-}) mice and wild type mice was increased with age. However, the total amount of «soluble» CD138 was higher in ApoE^{-/-} mice. In contrast, the level of *sdc1* gene expression in aortic arch of ApoE^{-/-} mice was decreased in comparison with wild-type mice. **Conclusions.** The increasing concentration of «soluble» CD138 in murine blood serum reflects the chronic pathology; during the atherosclerotic plaque formation CD138 synthesis is slowed down, while the shedding is increased.

Key words: syndecan-1, *sdc1*, CD138, atherosclerosis, aortic arch, atheroma, Heparan sulfate proteoglycan, ApoE knockout mice.

For citation: Leonova Elena I., Solonin Alexandr S., Galzitskaya Oxana V., Shaykhutdinova Elvira R., Lobanov Alexandr V., Murashev Arkady N. Expression of *sdc1* gene in aortic arch and the serum concentration of «soluble» CD138 in ApoE knockout mice. *Patogenez.* 2017; 15(1): 34–39 (In Russian).

For correspondence: Leonova Elena Ivanovna, PhD student, Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms. G.K. Scriabin, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 1102.elena@gmail.com

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 21.05.2016

Введение

Гепарансульфат протеогликан синдекан-1 (CD138) представляет собой трансмембранный белок семейства синдеканов, который состоит из трех доменов: внеклеточного, трансмембранного и цитоплазматического. Цитоплазматический домен CD138 связывается со структурными белками клетки через PDZ-связывающий мотив, расположенный на С-конце (рис. 1).

Трансмембранный домен отвечает за кластеризацию на мембране за счет образования гомо- и гетеродимеров [1–3]. К внеклеточному домену CD138 ковалентно присоединены цепи гликозаминогликанов: гепарансульфата, расположенного ближе к N-концу, и хондроитинсульфата, расположенного ближе к мембране [4]. Гепарансульфат состоит из повторяющихся дисахаридов: N-ацетилглюкозамин — глюкуроновая кислота и N-ацетилглюкозамин — идуроновая кислота; хондроитинсульфат из: N-ацетилгалактозамин — глюкуроновая кислота. Цепи гликозаминогликанов содержат сульфатные группы, что делает их отрицательно заряженными. Благодаря своему трансмембранному расположению и экспрессии гена в различных органах и тканях, CD138 способен выполнять широкий спектр функций. Так, например, в клетках печени CD138 выполняет функцию рецептора по утилизации липопротеинов богатых триглицеридами [5, 6], а в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов обеспечивает защиту последних от проникновения патогенов и от механического воздействия движения крови [7]. Более того, CD138 играет значимую роль в процессе регенерации поврежденных тканей [8] и в миграции лейкоцитов в зону повреждения или воспаления [9]. Эктодомен CD138 периодически удаляется с поверхности мембраны, что приводит к разрушению протеогликана. Освобожденный эктодомен образует так называемую растворимую форму и поступает в кровотока (рис. 1). Этот процесс может усилиться в условиях воспаления под действием клеточного стресса и различных внеклеточных медиаторов: хемокинов, трипсина, вирулентных форм бактерий. На данный момент детальный механизм активации отщепления эктодомена до конца еще не изучен. Было показано, что экспериментальный инфаркт миокарда у мышей индуцировал отщепление эктодомена и, как результат, уровень растворимого фрагмента CD138 в сыворотке крови повышался [10]. При этом на фоне увеличения экспрессии гена *sdc1* площадь поврежденной сердечной мышцы

у мышей уменьшалась, и, наоборот, у мышей с выключенным геном *sdc1* патологический процесс прогрессировал, то есть зона некроза миокарда увеличивалась [10]. Таким образом, увеличение экспрессии гена *sdc1* сопровождается кардиопротекторным действием. Следует отметить, что концентрация растворимого фрагмента CD138 у здоровых организмов находится на низком уровне, что осложняет его определение. Известно, что CD138 начинает активно секретироваться В-лимфоцитами (плазматическими клетками) на последней стадии дифференцировки. Показано, что во время развития множественной миеломы CD138 активно отщепляется с поверхности мембраны плазматических клеток. Вследствие этого растворимый фрагмент CD138 стал использоваться в качестве независимого прогностического фактора при множественной миеломе [11]. В условиях гипоксии уровень синтеза CD138 значительно уменьшается, при этом ускоряется созревание моноцитов в макрофаги [12]. Показано, что под действием ангиотензина II экспрессия гена *sdc1* в макрофагах усиливается, что способствует формированию пенных клеток и развитию атеросклеротической бляшки [13]. Однако взаимосвязь между CD138 и развитием атеросклероза мало изучена.

Целью данной работы является изучение динамики обновления CD138 у ApoE нокаутных (ApoE^{-/-}) мышей при развитии атеросклеротической бляшки. При этом оценивали различия в экспрессии гена CD138 в стенках дуги аорты, а также в концентрации растворимого фрагмента CD138 в сыворотке крови у ApoE нокаутных мышей при развитии атеросклероза и у мышей дикого типа C57Black.

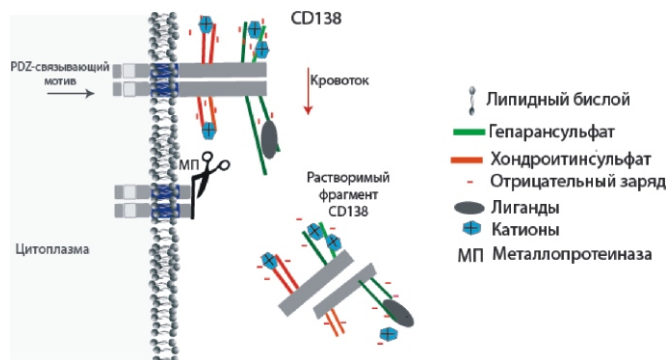


Рис. 1. Схематическое изображение гомодимера CD138. Пояснения в тексте.

Экспериментальные группы мышей

Генотипы мышей	Возраст, месяцы	Средняя масса, г
АпоЕ ^{-/-}	3	25,7 ± 1,3
АпоЕ ^{-/-}	8	29,8 ± 1,6
C57black	3	27,3 ± 1,6
C57black	8	32,4 ± 1,7

Примечание. В каждой группе было по 12 мышей

Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации рефересных генов *hprt*, *gapdh* и мРНК CD138

Название	Последовательность -5' -3'
Hprt1_F	AGCTACTGTAATGATCAGTCAACG
Hprt1_R	AGAGGTCCTTTTCACCAGCA
Gapdh_F	CTCCCACTCTTCCACCTTCG
Gapdh_R	CCACCACCCTGTTGCTGTAG
CD138_F	GGGCTCTGGAGAACAAGACTTC
CD138_R	CTCCGGCAATGACACCTCC

Материалы и методы

Исследование концентрации растворимого фрагмента CD138 проводили в сыворотке крови двух линий мышей: дикого типа C57Black и АпоЕ^{-/-}. Инбредная линия C57Black характеризуется низкой чувствительностью к образованию раковых опухолей, но в то же время им свойственна генетическая предрасположенность к ожирению. Высококалорийная диета приводит у мышей C57Black к развитию ожирения и диабета 2 типа [13, 14]. Линия АпоЕ^{-/-} мышей была создана из линии C57Black путем инактивации гена *apoE*. АпоЕ играет важную роль в метаболизме липидов. У мышей, нокаутированных по гену *apoE*, нарушается обмен жиров, в результате чего атеросклеротическая бляшка образуется в течение 6 месяцев в условиях нормальной диеты [15]. Поэтому в данной работе линия мышей C57Black используется в качестве контрольной группы. Животные были разделены на 4 группы по возрасту (3- и 8-месячные особи) и генотипу (АпоЕ^{-/-} и C57Black) (табл. 1).

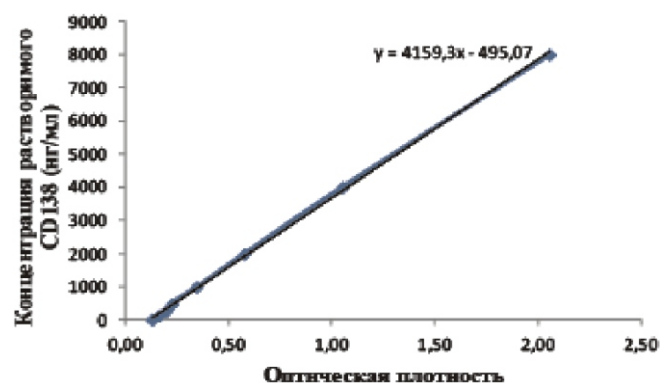


Рис. 2. Калибровочная кривая, построенная на основе измерения оптических плотностей разведенных стандартов с уже известной концентрацией антител к CD138. По оси ординат — концентрация растворимого CD138 в нг/мл.

Мыши содержались в стандартных условиях. Работа выполнена в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований в 1986 году в Страсбурге.

Для оценки состояния дуги аорты у мышей линии АпоЕ^{-/-} и C57Black в возрасте 5 месяцев был проведен макроскопический анализ. Для этого животных подвергали эвтаназии в CO₂-камере. Перед вскрытием грудной клетки производили фиксирование тканей и органов посредством перикардиальной перфузии 4% нейтральным раствором формалина со скоростью 8 мл/мин. в объеме 60 мл/животное. Затем вскрывали грудную клетку и очищали от прилежащих тканей дугу аорты. Фотографировали с помощью бинокулярного микроскопа Olympus SZ-CTV (Japan) с камерой «Sony CCD-IRIS model DXC-107AP» при одинаковых условиях увеличения объекта.

Кровь для анализа отбирали из орбитального венозного синуса. Измерение концентрации растворимого фрагмента CD138 в сыворотке крови экспериментальных мышей проводили с помощью иммуноферментного анализа ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), в основе которого заложен принцип взаимодействия антиген-антитело. Используя готовые стандарты с заведомо известной концентрацией, строили калибровочную кривую, на основании которой проводили количественную оценку уровня растворимого фрагмента CD138 в сыворотке исследуемой крови (рис. 2).

Измерение уровня экспрессии гена в дуге аорты проводили с помощью метода ПЦР в реальном времени. Предварительно выделяли РНК из дуги аорты тризольным методом, и далее синтезировали кДНК с помощью обратной транскрипции. Количество кДНК измеряли после каждого цикла амплификации с помощью интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBRGreen. Работа проводилась на амплификаторе компании «ДНК-Технология». При определении экспрессии мРНК гена CD138

использовали праймеры для 2 референсных генов: *hprt*, *gapdh*. Праймеры были подобраны с помощью программы Primer-3plus. Синтез праймеров заказывали в компании Синтол (табл. 2).

Статистическую обработку результатов измерения уровня концентрации растворимого CD138 и уровней экспрессии референсных генов и гена *sdcl* проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента (*t*-тест), позволяющего оценивать относительно небольшие размеры выборки. Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее значение и стандартное отклонение. Различия определяли при трех уровнях значимости: при $p < 0,05$ (допустимая ошибка составляет не более 5%), при $p < 0,01$ (не более 1%), при $p < 0,001$ (не более 0,1%) [16].

Результаты и обсуждение

На основании полученных измерений концентрации растворимого фрагмента CD138 в сыворотке крови у АпоЕ^{-/-} и C57Black мышей методом ELISA был построен график (рис. 3). Во избежание ошибки каждый образец измеряли дважды. В результате статистической обработки данных, используя *t*-критерий Стьюдента, были выявлены статистически значимые различия между группами. На рис. 3 видно, что средняя концентрация растворимого фрагмента CD138 в сыворотке крови у АпоЕ^{-/-} мышей в возрасте 3 мес. была заметно больше, чем у C57Black того же возраста, примерно на 39–62%. К 8 мес. уровень CD138 в сравниваемых группах значительно увеличивался, но по абсолютной величине у АпоЕ^{-/-} мышей этот показатель был выше, чем у мышей C57Black (соответственно 33,4 нг/мл и 26,2 нг/мл, разница 22%). Полученные данные позволили предположить, что увеличение концентрации растворимого фрагмента CD138 до 30 нг/мл у мышей может свидетельствовать о наличии хронической патологии.

При измерении количества кДНК после каждого цикла амплификации методом ПЦР в реальном времени, были получены данные, отображающие уровень мРНК CD138 в дуге аорты у мышей АпоЕ^{-/-} и у мышей C57Black в возрасте 3 и 8 месяцев. Каждый образец также измеряли дважды. Полученные данные анализировали методом прямого сравнения графиков накопления ДНК по максимуму второй производной на графике (Cp — crossing point) [17]. Расчеты Cp показали, что с возрастом относительное содержание мРНК CD138 в стенке дуги аорты у АпоЕ^{-/-} мышей уменьшается в 1,8 раза ($p < 0,05$), в то время как у мышей C57Black этот показатель увеличивается в 3,3 раза ($p < 0,01$) (рис. 4).

Увеличение содержания мРНК CD138 в дуге аорты у мышей дикого типа C57Black с возрастом на фоне увеличения концентрации растворимого CD138 в сыворотке крови, может свидетельствовать о повышенном уровне разрушения и синтеза CD138 в стенках сосудов. Как было описано ранее, подобные процессы усиливаются в ответ на воспаление или повреждение тканей [10]. Этот факт дает основание предположить, что уже в возрасте 8 месяцев у C57Black мышей, предрасположенных к ожирению, начинают происходить патологические процессы как в стенках сосудов, так и в эндотелиальном гликокаликсе. Однако, несмотря на повышенный синтез CD138, атероматоз у мышей C57Black в стенках сосуда не развивается, что

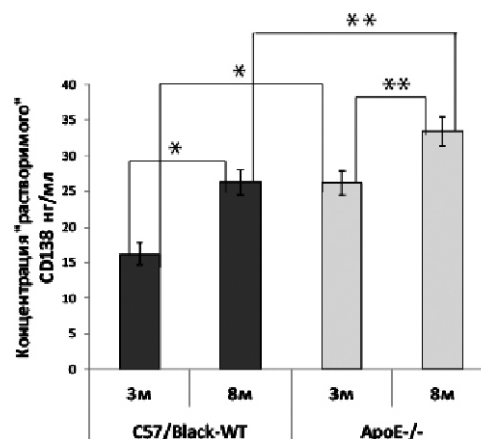


Рис. 3. По оси ординат — уровень растворимого фрагмента CD138 в сыворотке крови у АпоЕ^{-/-} и C57Black мышей, ($n = 12$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ по Стьюденту).

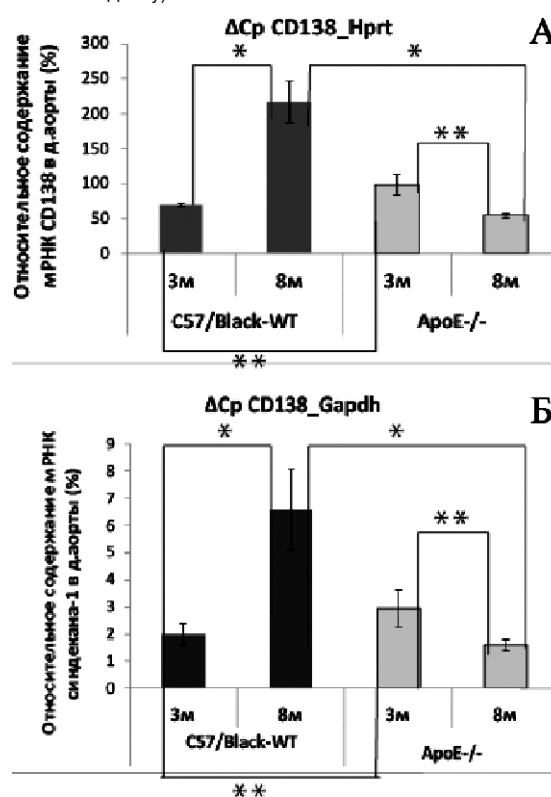


Рис. 4. По оси ординат — относительное содержание мРНК CD138 в стенке дуги аорты у АпоЕ^{-/-} мышей и у C57Black мышей. А — по отношению референсного гена *hprt*; Б — по отношению референсного гена *gapdh*, ($n = 12$, * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$ по Стьюденту).

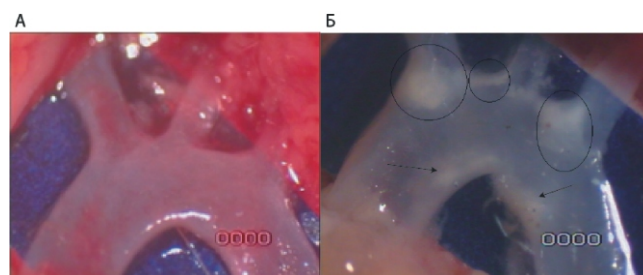


Рис. 5. Макроскопический анализ дуги аорты. А — дуга аорты мыши C57Black в возрасте 5 месяцев. Б — дуга аорты линии мышей АпоЕ^{-/-} в возрасте 5 месяцев. Кружками и стрелками обозначены места образования атеросклеротических бляшек. Фотографировали с помощью бинокулярного микроскопа Olympus SZ-CTV (Japan) с камерой «Sony CCD-IRIS model DXC-107AP» при одинаковых условиях увеличения объекта.

подтверждается при макроскопическом анализе дуги аорты (рис. 5).

Между тем у АпоЕ^{-/-} мышей с возрастом, наоборот, на фоне повышения концентрации растворимого фрагмента CD138, уровень мРНК CD138 падает. На основании этих данных можно предположить, что при развитии атеромы синтез новых молекул CD138 замедляется, а процесс отщепления эктодомена CD138 усиливается. Кроме этого, происходит разрушение эндотелиальных клеток сосуда, и это приводит к прекращению синтеза CD138 и, как следствие, к разрушению гликокаликсного слоя, выстилающего внутреннюю стенку сосуда. Одна из теорий развития атеросклероза связана с повреждением гликокаликсного слоя, приводящего к беспрепятственному проникновению в стенку сосуда липопротеинов низкой плотности (ЛНП), которые содержат большое количество холестерина [18, 19]. Чем выше концентрация ЛНП и, как следствие, холестерина, тем активнее происходит их инфильтрация в стенку сосуда. Известно, что у АпоЕ^{-/-} мышей уровень холестерина в 3–6 раз превышает норму, что приводит к формированию атеросклеротической бляшки в сосудах в течение 5–6 месяцев даже в условиях нормальной диеты [15]. Эти данные подтвердились при макроскопическом анализе дуги аорты (рис. 5), который показал, что у мышей C57Black в дуге аорты атеросклеротические бляшки отсутствуют (рис. 5А), в то время как у АпоЕ^{-/-} мышей эти образования к 5 месяцам четко визуализируются (рис. 5Б). Высокий уровень растворимого фрагмента CD138 у 8-месячных мышей с моделью атеросклероза позволяет предположить, что в печени активируется процесс разрушения и синтеза CD138. Как уже упоминалось выше, CD138 выполняет в гепатоцитах функцию рецептора по утилизации липопротеинов, богатых триглицеридами [5, 6]. Известно, что АпоЕ является основным лигандом для липопротеиновых рецепторов печени, включая CD138. Но, в отличие от других рецепторов, CD138 может поглощать липопротеины богатые триглицеридами через лиганд АпоAV [20–22]. На основании этого можно предположить, что увеличение синтеза CD138 в клетках печени может выступать в качестве компенсаторного механизма в ответ на удаление лиганда АпоЕ, так как другие липопротеиновые рецепторы не способны выполнять эти функции. Увеличение синтеза CD138 может сопровождаться и повышенным удалением эктодомена с образованием растворимого фрагмента CD138, который поступает в кровоток. Эта гипотеза требует дополнительного экспериментального подтверждения.

Заключение

На основании полученных данных можно предположить, что уменьшение степени экспрессии гена *sdc1* у АпоЕ^{-/-} мышей на фоне повышенного отщепления эктодомена CD138 является одним из факторов формирования атеросклеротической бляшки. Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать следующее заключение: если наблюдается увеличение концентрации растворимого фрагмента CD138 в сыворотке крови мышей, то можно говорить о наличии хронической патологии, в частности, атеросклероза. Для более точного описания процесса необходимы дополнительные исследования.

References

1. Barrett P.J., Song Y., Van Horn W.D., Hustedt E.J., Schaffer J.M., Hadziselimovic A., Beel A.J., Sanders C.R. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*. 2012; 336: 1168–71.
2. Dews I.C., Mackenzie K.R. Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: 20782–7.
3. Leonova E.I., Galzitskaya O.V., Structure and functions of syndecans in vertebrates, *Biochem. Biokhimiia*. 2013; 78: 1071–85.
4. Kokenyesi R., Bernfield M. Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 12304–9.
5. van Barlingen H.H., de Jong H., Erkelens D.W., de Bruin T.W. Lipoprotein lipase-enhanced binding of human triglyceride-rich lipoproteins to heparan sulfate: modulation by apolipoprotein E and apolipoprotein C. *J. Lipid Res.* 1996; 37: 754–63.
6. Leonova E.I., Galzitskaya O.V. Role of Syndecans in Lipid Metabolism and Human Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015; 855: 241–58.
7. Thi M.M., Tarbell J.M., Weinbaum S., Spray D.C. The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: A "bumper-car" model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101: 16483–8.
8. Vanhoutte D., Schellings M.W.M., Gotte M., Swinnen M., Herias V., Wild M.K., Vestweber D., Chorianopoulos D., Cortes V., Rigotti A., Stepp M.-A., Van de Werf F., Carmeliet P., Pinto Y.M., Heymans S. Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation*. 2007; 115: 475–82.
9. Savery M.D., Jiang J.X., Park P.W., Damiano E.R. The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. *Microvasc. Res.* 2013; 87: 83–91.
10. Vanhoutte D., Schellings M.W.M., Gotte M., Swinnen M., Herias V., Wild M.K., Vestweber D., Chorianopoulos D., Cortes V., Rigotti A., Stepp M.-A., Van de Werf F., Carmeliet P., Pinto Y.M., Heymans S. Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation*. 2007; 115: 475–82.
11. Kim C.W., Goldberger O.A., Gallo R.L., Bernfield M., Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol. Biol. Cell.* 1994; 5: 797–805.
12. Asplund A., Ostergren-Lunden G., Camejo G., Stillemark-Billton P., Bondjers G. Hypoxia increases macrophage motility, possibly by decreasing the heparan sulfate proteoglycan biosynthesis. *J. Leukoc. Biol.* 2009; 86: 381–8.
13. van der Heijden R.A., Sheedfar F., Morrison M.C., Hommelberg P.P.H., Kor D., Kloosterhuis N.J., Gruben N., Youssef S.A., de Bruin A., Hofker M.H., Kleemann R., Koonen D.P.Y., Heeringa P. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging*. 2015; 7: 256–68.
14. Zhou J., Werstuck G.H., Lhotak S., Shi Y.Y., Tedesco V., Trigatti B., Dickhout J., Majors A.K., DiBello P.M., Jacobsen D.W., Austin R.C. Hyperhomocysteinemia induced by methionine supplementation does not independently cause atherosclerosis in C57BL/6J mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2008; 22: 2569–78.
15. Deuchar G.A., McLean D., Hadoke P.W.F., Brownstein D.G., Webb D.J., Mullins J.J., Chapman K., Seckl J.R., Kotelevtsev Y.V. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency accelerates atherogenesis and causes proinflammatory changes in the endothelium in apoe^{-/-} mice. *Endocrinology*. 2011; 152: 236–46.
16. Plavinskii S.L. Biostatistics. Planning, processing and presentation of the results of biomedical research using the SAS system. SPb: Izdatel'skii dom SPb MAPO; 2005. (in Russian)
17. Rebrekov D.V. PCR "real time". Moskva, BINOM, laboratoriya znaniy, 2 izdanie; 2009. (in Russian)
18. Koletsy S., Snajdar R.M. Atherosclerosis following balloon catheter injury to the carotid artery and the aorta of hypertensive rats with normolipidemia or hyperlipidemia. *Am. J. Pathol.* 1981; 103: 105–15.
19. Tulis D.A. Rat carotid artery balloon injury model. *Methods Mol. Med.* 2007; 139: 1–30.
20. Getz G.S., Reardon C.A. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J. Lipid Res.* 2009; 50: 156–61.
21. Gonzales J.C., Gordts P.L.S.M., Foley E.M., Esko J.D. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 2742–51.
22. Stanford K.I., Bishop J.R., Foley E.M., Gonzales J.C., Niesman I.R., Witztum J.L., Esko J.D. Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 3236–45.

References

1. Barrett P.J., Song Y., Van Horn W.D., Husted E.J., Schaffer J.M., Hadziselimovic A., Beel A.J., Sanders C.R. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*. 2012; 336: 1168-71.
2. Dews I.C., Mackenzie K.R. Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: 20782-7.
3. Leonova E.I., Galzitskaya O.V., Structure and functions of syndecans in vertebrates, *Biochem. Biokhimiia*. 2013; 78: 1071-85.
4. Kokenyesi R., Bernfield M. Core protein structure and sequence determine the site and presence of heparan sulfate and chondroitin sulfate on syndecan-1. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 12304-9.
5. van Barlingen H.H., de Jong H., Erkelens D.W., de Bruin T.W. Lipoprotein lipase-enhanced binding of human triglyceride-rich lipoproteins to heparan sulfate: modulation by apolipoprotein E and apolipoprotein C. *J. Lipid Res.* 1996; 37: 754-63.
6. Leonova E.I., Galzitskaya O.V. Role of Syndecans in Lipid Metabolism and Human Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015; 855: 241-58.
7. Thi M.M., Tarbell J.M., Weinbaum S., Spray D.C. The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: A "bumper-car" model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004; 101: 16483-8.
8. Vanhoutte D., Schellings M.W.M., Gotte M., Swinnen M., Herias V., Wild M.K., Vestweber D., Chorianopoulos E., Cortes V., Rigotti A., Stepp M.-A., Van de Werf F., Carmeliet P., Pinto Y.M., Heymans S. Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation*. 2007; 115: 475-82.
9. Savery M.D., Jiang J.X., Park P.W., Damiano E.R. The endothelial glycocalyx in syndecan-1 deficient mice. *Microvasc. Res.* 2013; 87: 83-91.
10. Vanhoutte D., Schellings M.W.M., Gotte M., Swinnen M., Herias V., Wild M.K., Vestweber D., Chorianopoulos D., Cortes V., Rigotti A., Stepp M.-A., Van de Werf F., Carmeliet P., Pinto Y.M., Heymans S. Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation*. 2007; 115: 475-82.
11. Kim C.W., Goldberger O.A., Gallo R.L. Bernfield M., Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol. Biol. Cell.* 1994; 5: 797-805.
12. Asplund A., Ostergren-Lunden G., Camejo G., Stillemark-Billton P., Bondjers G. Hypoxia increases macrophage motility, possibly by decreasing the heparan sulfate proteoglycan biosynthesis. *J. Leukoc. Biol.* 2009; 86: 381-8.
13. van der Heijden R.A., Sheedfar F., Morrison M.C., Hommelberg P.P.H., Kor D., Kloosterhuis N.J., Gruben N., Youssef S.A., de Bruin A., Hofker M.H., Kleemann R., Koonen D.P.Y., Heeringa P. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging*. 2015; 7: 256-68.
14. Zhou J., Werstuck G.H., Lhotak S., Shi Y.Y., Tedesco V., Trigatti B., Dickhout J., Majors A.K., DiBello P.M., Jacobsen D.W., Austin R.C. Hyperhomocysteinemia induced by methionine supplementation does not independently cause atherosclerosis in C57BL/6J mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2008; 22: 2569-78.
15. Deuchar G.A., McLean D., Hadoke P.W.F., Brownstein D.G., Webb D.J., Mullins J.J., Chapman K., Seckl J.R., Kotelevtsev Y.V. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency accelerates atherogenesis and causes proinflammatory changes in the endothelium in apoe^{-/-} mice. *Endocrinology*. 2011; 152: 236-46.
16. Plavinskii S.L. Biostatistics. Planning, processing and presentation of the results of biomedical research using the SAS system. SPb: Izdatel'skii dom SPb MAPO; 2005. (in Russian)
17. Rebrekov D.V. PCR "real time". Moskva, BINOM, laboratoriya znanij, 2 izdanie; 2009. (in Russian)
18. Koletsky S., Snajdar R.M. Atherosclerosis following balloon catheter injury to the carotid artery and the aorta of hypertensive rats with normolipidemia or hyperlipidemia. *Am. J. Pathol.* 1981; 103: 105-15.
19. Tulis D.A. Rat carotid artery balloon injury model. *Methods Mol. Med.* 2007; 139: 1-30.
20. Getz G.S., Reardon C.A. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J. Lipid Res.* 2009; 50: 156-61.
21. Gonzales J.C., Gordts P.L.S.M., Foley E.M., Esko J.D. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 2742-51.
22. Stanford K.I., Bishop J.R., Foley E.M., Gonzales J.C., Niesman I.R., Witztum J.L., Esko J.D. Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice., *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 3236-45.

Сведения об авторах

Леонова Елена Ивановна — аспирантка РАН, специальность молекулярная биология, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скребина Российской академии наук, Пущино, Московская обл., e-mail: 1102.elena@gmail.com

Солонин Александр Сергеевич — канд. биол. наук, заведующий лабораторией молекулярной микробиологии, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скребина Российской академии наук, Пущино, Московская обл.

Галзитская Оксана Валериановна — доктор физ.-мат. наук, рук. группы биоинформатики, Институт белка Российской академии наук, Пущино, Московская обл.

Шайхутдинова Эльвира Рауильевна — канд. биол. наук, лаборатория биоорганической химии, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пущино, Московская обл.

Лобанов Александр Владимирович — канд. биол. наук, лаборатория биоорганической химии Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Пущино, Московская обл., Пущинский научный центр Российской академии наук, e-mail: lobanov-av@yandex.ru

Мурашев Аркадий Николаевич — доктор биол. наук, заведующий лабораторией биоорганической химии Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Пущинский научный центр Российской академии наук, Пущино, Московская обл.

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616-001.17- 085. 831

Заживление термических ожогов кожи в условиях экспериментальной фототерапии

Расулов М.М.¹, Моторина И.Г.², Юшков Г.Г.³, Щукина О.Г.³, Малышкина Н.А.³

¹ Государственный научный центр Российской Федерации «Государственный НИИ химии и технологии элементоорганических соединений» Государственной корпорации «Ростехнологии», 105118 г. Москва, Шоссе Энтузиастов, 38

² ГБУДПО Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ (ГБУДПО ИГМАПО); 664079, г. Иркутск, микрорайон «Юбилейный», дом 100

³ ФГБУ ВО Ангарский государственный технический университет Министерства образования и науки РФ (ФГБУ АнГТУ), 665835, г. Ангарск Иркутской области, ул. Чайковского, дом 60

Исследования, посвященные изучению эффективности светолечения ран кожи и патогенетическому обоснованию этого метода недостаточны. Целью данной работы было оценить заживляющее действие полихроматического поляризованного некогерентного света (аппарат «БИОПТРОН-компакт») и лазерного красного волнового диапазона (аппарат АЗОР 2К-02) на стандартную термическую рану кожи. Методы. У кроликов на боковой поверхности тела вызывали кожный ожог 3–4 степени, размером 24 см² и проводили курсовое лечение ожоговой раны ежедневно в течение 10 дней, начиная со стадии пролиферации — с 5 дня от момента нанесения раны. В качестве оценочных критериев использованы типовые гематологические, биохимические, морфологические и планиметрические показатели. Результаты. Существенных различий в величинах гематологических показателей не обнаружено. В то же время отличия облученных животных от необлученных практически по всем другим показателям оказались статистически достоверными. Морфологические и планиметрические исследования показали существенное ускорение процесса регенерации при обоих типах светового облучения, но ранозаживляющий эффект света лазера красного волнового диапазона оказался более выраженным, чем при лечении поляризованным светом. Заключение. Несмотря на принципиальные отличия указанных типов облучения по физическим параметрам в обоих случаях положительный эффект был связан с активацией пролиферации макрофагального и фибробластического ряда, что ускоряло заживление ожоговой раны и предупреждало переход острого воспаления в хроническое.

Ключевые слова: ожоговые раны, кожа, физиотерапия, светотерапия, кролики.

Для цитирования: Расулов М.М., Моторина И.Г., Юшков Г.Г., Щукина О.Г., Малышкина Н.А. Заживление термических ожогов кожи в условиях экспериментальной фототерапии. Патогенез. 2017; 15(1): 40–47.

Для корреспонденции: Расулов Максуд Мухамеджанович, докт. мед. наук, профессор, Государственный научный центр Российской Федерации «Государственный НИИ химии и технологии элементоорганических соединений» Государственной корпорации «Ростехнологии», 105118 Москва. e-mail: maksud@bk.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.08.2016

The healing of thermal burns on the skin in experimental phototherapy

Rasulov M.M.¹, Motorina I.G.², Yushkov G.G.³, Schukina O.G.³, Malysheva N.A.³

¹ State Scientific Center of the Russian Federation, Federal State Unitary Enterprise «State Research Institute for Chemistry and Technology of Organoelement Compounds», 105118 Moscow, Enthusiasts highway, 38

² Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education; 664079, Irkutsk, area «Jubilee», house 100. [http:// www.igmapo.ru](http://www.igmapo.ru)

³ Angarsk State Technical University; 665835, Irkutsk region, Angarsk, ul. Chaykovskogo, 60. www.angtu.ru

The studies dedicated to the efficacy of skin wound phototherapy and pathogenetic substantiation of this method are insufficient. The aim of this work was to assess the healing effect of the polychromatic polarized incoherent light (the «BIOPTRON compact» device) and laser red wave range (AZOR-02) to the standard thermal skin wound. Methods. The 3rd and 4th-degree skin burn wounds with the size of 24cm² were caused on the lateral body surface in rabbits and then treated with phototherapy. The course of treatment was performed by a daily irradiation during 10 days, starting from the stage of proliferation, i.e. on the 5th day after wounding. As evaluation criteria, the hematological, biochemical, morphological, and planimetric indicators were used. Results. No significant differences in the values of hematological parameters were found. At the same time, the differences between irradiated and non-irradiated animals by almost all other indicators were statistically significant. The morphological and planimetric study showed significant acceleration of the regeneration process in both types of light exposure, but the wound healing effect of the laser light of red wavelength range was more pronounced than in the treatment by polarized light. Conclusion. Received data allowed to conclude that, in cause of thermal treatment of skin wounds, optical polarized light and especially laser irradiation of red spectrum have a positive effect on activating of proliferation of macrophagal and fibroblastic cell

branches, thus accelerating burn wound healing and preventing the transition of inflammation from acute to chronic form.

Keywords: burn wound of the skin, the light therapy, rabbits.

For citation: Rasulov M.M., Motorina I.G., Yushkov G.G., Schukina O.G., Malyshkina N.A. The healing of thermal burns on the skin in experimental phototherapy. *Patogenez*. 2017; 15(1): 40–47 (In Russian).

For correspondence: Rasulov M.M. M.D., professor, State Scientific Center of the Russian Federation, Federal State Unitary Enterprise «State Research Institute for Chemistry and Technology of Organoelement Compounds», Moscow, Russia, e-mail: maksud@bk.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 06.08.2016

Введение

Лечение ран остается одной из актуальнейших проблем практической медицины, включающее в целом хирургические, консервативные и физиотерапевтические методы [1]. Последние привлекают все большее внимание отчетливой эффективностью применения, что стимулирует исследования по оценке получаемого эффекта и обоснованию механизмов ускорения заживления [2, 3]. Руководства по ожогам указывают на развитие гемоконцентрации с эритроцитозом и лейкоцитозом, повышение содержания в крови гемоглобина при обширных (более 15% поверхности тела) и глубоких ожогах. Анемия может возникать по завершении стадии токсемии, тогда, когда целесообразны дополнительные, консервативные приемы лечения, что дает возможность использовать гематологические показатели для оценки эффективности различных способов светолечения. Важным остается также анализ как биохимических изменений в крови — объективные свидетельства заживления, так и структурных изменений в месте раневого повреждения.

Биофизические воздействия могут существенно влиять на динамику регенерации [3, 4], что важно учитывать при формировании программ рациональной физиотерапии. Наряду с этим отметим, что в условиях экспериментально-биологического исследования использование клинико-лабораторных приемов диагностики динамики заживления локальной ожоговой раны, не подпадающей под категорию «ожоговая болезнь» изучены недостаточно. Поэтому целью настоящего исследования явилась оценка ранозаживляющего действия светового облучения на заживление ожоговой раны в эксперименте.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 42 кроликах серой масти, массой 3600 ± 150 г, выращенных в специализированном виварии НИИ биофизики АГТА (ветудостоверение 238 № 0018942), находившихся в стандартных условиях содержания при свободном доступе к воде и корму. Рану наносили под тиопенталовым наркозом (2–4 мл 0,1% раствора, в/в) прибором «Аппарат для ожога тепловым излучением»,

температура обжигающей поверхности на выбритую кожу боковой поверхности тела 800°C , время контакта 3 с, размер раны 24 см^2 (III–IV ст.). Все работы проводились в соответствии с существующими этическими требованиями при работе с экспериментальными животными [5]. Все животные были разделены на 3 группы по 14 особей:

- группа 1 — контроль — кролики с ожогом и не облученные;
- группа 2 — кролики с ожогом и облученные поляризованным светом с помощью серийного аппарата «Биоптрон компакт» — 10 сеансов;
- группа 3 — кролики с ожогом и облученные лучом красного диапазона с помощью серийного аппарата «Азор-2К-02» — 10 сеансов (табл. 1).

Кролики подвергались светолечению ежедневно, на протяжении 10 дней, начиная с 5-го дня после нанесения ожогового поражения, когда наступает пролиферативная стадия процесса заживления (согласно существующей классификации). При этом продолжительность сеансов облучения животных варьировала. Так, при использовании аппарата «Биоптрон компакт» первый сеанс длился 5 мин, второй, на следующий день — 6 мин, затем, на третий день — 7 мин, на четвертый — 8 мин, на пятый — 9 мин, а с 6 по 10 сеансы продолжались по 10 мин. При использовании аппарата «Азор-2К-02» длительность всех 10 сеансов составляла 2 мин. Характеристики излучений иллюстрирует табл. 1.

Образцы крови брали из краевой вены уха до и после всех воздействий. Полученную сыворотку исследовали на содержание: глюкозы — глюкозооксидазным методом с использованием реактивов Diocap, мочевины — кинетическим уреазным методом, общего белка — биуретовым методом, холестерина — ферментным методом, креатинина — по Попперу, аланинаминотрансферазы (АлТ) — колориметрически.

Образцы тканей для морфологического исследования брали из пограничной области. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили через спирты, заключали в парафин или воск, готовили срезы толщиной 5–7 мкм, окрашивали их гематоксилин-эозином и по Ван Гизону. По качественным характе-

Таблица 1

Методические приемы физиотерапии ожоговых ран в условиях эксперимента

Тип аппарата	Оптический диапазон	Длина волны (нм)	Режим	Мощность излучения	Расстояние от торца излучателя до раны
Биоптрон компакт	Поляризованный свет	480-3400	Непрерывный	20 Вт	5 см
Азор-2К-02	Красный	630	Непрерывный	30 мВт	1 см

ристикам оценивали воспалительный процесс: степень деструкции клеток в очаге воспаления, отек, ростовую активность эпидермиса, направление коллагеновых волокон, наличие плазматических клеток, фибробластов. Эти процессы документировали микроснимками. С целью определения площади и скорости уменьшения плоскостных ран, измеряли площадь раны. Регистрация показателей проводилась на пятые и пятнадцатые сутки от момента нанесения раны.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2007 и «Biostat».

Результаты и обсуждение

К 5-му дню после нанесения раны (начало стадии пролиферации) выявили следующие изменения биохимических показателей (табл. 2): содержание глюкозы в среднем уменьшалось на 19%, а уровень холестерина, мочевины, креатинина и общего белка увеличивалось на 20%, 17% ($p < 0,05$), 11% ($p < 0,05$) и 15% соответственно.

Содержание АлТ в сыворотке крови, через пять дней возросло на 50% относительно исходного уровня и продолжало повышаться в течение всего периода лечения у животных группы контроля и у получавших лечение поляризованным светом. В то же время у кроликов, подвергавшихся красному облучению уровень АлТ после 5-го дня исследования начал понижаться, но, тем не менее, оставался повышенным на 33% относительно нормы к концу эксперимента (табл. 2). Однако это повышение содержания АлТ в сыворотке крови, безусловно, не связано с повреждением клеток кожи, а индуцировано за счет повышения уровня аланина в крови — постоянного спутника ожоговой травмы. Одним из подтверждающих признаков этого служит и повышение содержания глюкозы как у контрольных, необлученных, животных, так и в группах со светолечением. Однако в группе животных, леченых красным излучением, глюкоза оказалась повышенной на 8%, в то время как в остальных группах уровень глюкозы был на 30% выше исходных значений (табл. 2).

Таблица 2

Биохимические показатели сыворотки крови кроликов в процессе заживления ожога кожи при светолечении (M ± m)

Прием светолечения	До нанесения ожоговой раны	Начало лечения (через 5 дней после нанесения раны)	Конец лечения (через 15 дней после нанесения раны)
Глюкоза (ммоль/л)			
Контроль (нелеченные)	6,2 ± 0,04	5,0 ± 0,14	8,9 ± 0,38 *
Биоптрон	6,1 ± 0,08	5,2 ± 0,07	8,8 ± 0,3 *
Азор-2К-02	6,2 ± 0,08	4,9 ± 0,1	6,7 ± 0,1 *
Общий холестерин (ммоль/л)			
Контроль (нелеченные)	1,5 ± 0,04	1,8 ± 0,1 *	1,4 ± 0,08 *
Биоптрон	1,5 ± 0,03	1,8 ± 0,6	0,9 ± 0,1 *
Азор-2К-02	1,5 ± 0,05	1,8 ± 0,05	0,8 ± 0,07 *
Мочевина (ммоль/л)			
Контроль (нелеченные)	6,2 ± 0,06	7,5 ± 0,2 *	8,1 ± 0,2 *
Биоптрон	6,2 ± 0,03	7,4 ± 0,1 *	7,1 ± 0,09 * **
Азор-2К-02	6,2 ± 0,06	7,5 ± 0,06 *	7,0 ± 0,03 *
Креатинин (мкмоль/л)			
Контроль (нелеченные)	106,6 ± 0,5	118,6 ± 1,8 *	112,8 ± 1,98 *
Биоптрон	106,5 ± 0,7	119,6 ± 0,65 *	99,5 ± 1,6 *
Азор-2К-02	106,0 ± 0,38	119,8 ± 0,4 *	103,8 ± 3,5
Аланинаминотрансфераза (ед./л)			
Контроль (нелеченные)	29,5 ± 0,3	57,5 ± 1,1 *	63,1 ± 2,7 *
Биоптрон	29,5 ± 0,3	56,6 ± 1,9 *	95,4 ± 5,6 * **
Азор-2К-02	28,8 ± 0,5	60,4 ± 2,8 *	42,8 ± 4,6 *
Общий белок (г/л)			
Контроль (нелеченные)	66,1 ± 0,7	76,5 ± 0,9	70,1 ± 0,8
Биоптрон	68,3 ± 0,8	77,1 ± 1,1	70,9 ± 0,9
Азор-2К-02	66,2 ± 0,4	79,0 ± 0,8 *	71,2 ± 1,1 *

Примечание. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,05$ — по сравнению с исходными показателями и контролем соответственно.

Из теории термического ожога следует, что с момента травмы в организме возникает ряд метаболических процессов, направленных на поддержание баланса между уровнем гликемии и повышенным энергопотреблением, источником которого являются глюкоза и жирные кислоты при обширном ожоге. Учитывая полученные данные эксперимента с локальной травмой, можно предполагать, что и в данном случае запускается тот же механизм, хотя и выраженный в меньшей степени, о чем свидетельствует динамика глюкозы и холестерина в сыворотке крови животных. Облучение существенно на этот механизм не повлияло, за исключением динамики общего холестерина, уровень которого по окончании обоих типов светолечения снизился, примерно, на 43% относительно исходных данных, что статистически достоверно. Уровень общего белка в сыворотке крови к концу наблюдений снижался относительно 5-го дня от нанесения раны, причём лечение поляризованным светом привело к фактической его нормализации, в отличие от действия красного облучения, при котором уровень общего белка к концу наблюдений превышал норму на 7% (табл. 2). Относительная гиперпротеинемия, по-видимому, связана с некоторой дегидратацией у животных, о чем свидетельствовало повышение содержания мочевины в сыворотке крови, равно как и в результате активированного синтеза мочевины, уровень которой оставался достоверно повышенным и по окончании светолечения. Увеличение содержания в сыворотке крови креатинина, связано с угнетением клубочковой фильтрации из-за разрушения мышечных белков в течение первых пяти дней после термической травмы. В процессе светолечения уровень креатинина восстановился до контрольного уровня. Таким образом, биохимические показатели сыворотки крови животных при локальном термическом ожоге отражают ответ организма на этот вид травмы.

Изменения гематологических показателей у животных с термической раной не подвергавшихся физиотерапевтическому воздействию патогенетически обусловлены стадией развития ожогового процесса. Особенности этих изменений, как правило, не обсуждаются и соотносятся с неспецифической адаптацией, в том числе стрессорными, и другими системными реакциями на обширный и глубокий ожог кожи. Кроме этого указывается и на изменения базовых функций полиморфно-ядерных лейкоцитов, преимущественно в ранний период развития острого воспаления, вызванного ожогом кожи в условиях эксперимента [6].

Из табл. 3, в которой представлены результаты гематологического анализа, следует, что на пятый день эксперимента закономерно возросло содержание лейкоцитов и лимфоцитов в крови животных (в среднем на 36—37%) как следствие ожоговой раны во всех группах. Количество эритроцитов в крови резко уменьшилось (~ 50%), с последующим неполным восстановлением к концу наблюдений и в контроле и в группах с лечением. Уменьшение уровня гемоглобина и количества тромбоцитов было незначительным. По окончании светолечения гемоглобин приближался к нормальным значениям, а количество тромбоцитов превышало нормальные значения на 27% в контроле и 18% на фоне лечения поляризованным светом, в то время как красное облучение восстанавливало уровень тромбоцитов до нормальных показателей.

Также светолечение в обоих случаях возвращало к нормальным показателям количество лейкоцитов и лимфоцитов, тогда как у нелеченых животных показатели оставались повышенными на 32% и 18% соответственно. Наряду с этим уменьшение количества лейкоцитов до нормального уровня, согласно данным литературы [7], свойственно также для физиотерапии с помощью лазеров с инфракрасным излучением. Проведенный на-

Таблица 3

Гематологические показатели у кроликов при светолечении ожогов кожи

Показатели	Группы животных		
	Контроль (нелеченные)	Биоптрон	Азор-2К-02
Лейкоциты ($10^9/л$)			
Исходное количество	5,9 ± 0,1	6,2 ± 0,2	6,1 ± 0,2
Через 5 дней после нанесения раны	9,6 ± 0,1	9,5 ± 0,4	9,3 ± 0,3*
Через 10 дней лечения	8,6 ± 0,2	6,3 ± 0,3*	6,8 ± 0,2**
Лимфоциты ($10^9/л$)			
Исходное количество	2,8 ± 0,5	2,9 ± 0,4	3,0 ± 0,5
Через 5 дней после нанесения раны	4,7 ± 0,5	4,4 ± 0,5	4,5 ± 0,4*
Через 10 дней лечения	3,4 ± 0,4	2,8 ± 0,3	3,1 ± 0,4
Эритроциты ($10^{12}/л$)			
Исходное количество	4,8 ± 0,1	4,8 ± 0,2	4,7 ± 0,3
Через 5 дней после нанесения раны	2,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3	2,4 ± 0,3*
Через 10 дней лечения	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,4	3,4 ± 0,2*
Гемоглобин (г/л)			
Исходное количество	121,1 ± 3,0	121,8 ± 3,0	121,1 ± 3,3
Через 5 дней после нанесения раны	111,0 ± 4,4	112,6 ± 5,0	111,3 ± 3,1*
Через 10 дней лечения	116,2 ± 3,6	114,8 ± 4,4	116,2 ± 3,6
Тромбоциты ($10^9/л$)			
Исходное количество	325,0 ± 4,9	336,2 ± 4,8	326,5 ± 1,9
Через 5 дней после нанесения раны	315,2 ± 2,4	319,7 ± 4,1	318,3 ± 4,0
Через 10 дней лечения	443,3 ± 12,2*	409,3 ± 10,2*	347,7 ± 25,6

Примечание. * $p < 0,05$ — отличия от контроля и исходных данных достоверны

ми эксперимент согласуется с этими представлениями. Тем не менее, следует учесть, что спектр излучения в проведенных экспериментах начинался выше диапазона ультрафиолетового света и содержал видимую, а также небольшую долю (нижний диапазон) инфракрасных лучей. В отличие от лазерного луча, имеющего узкий спектр (когерентный, монохроматический свет, излучаемый аппаратом Азор-2К-02), световой луч в проведенных нами экспериментах полихроматический, содержащий волны разной длины. Можно полагать, что именно этот фактор, в сочетании с поляризацией, оказывал благотворное действие на клетки кожи, стимулируя заживление раны.

В результате морфологических исследований установлено, что после моделирования раны у кроликов с двумя видами светолечения и в группе без облучения, в эпидермисе и дерме на пятые сутки регистрировались деструк-

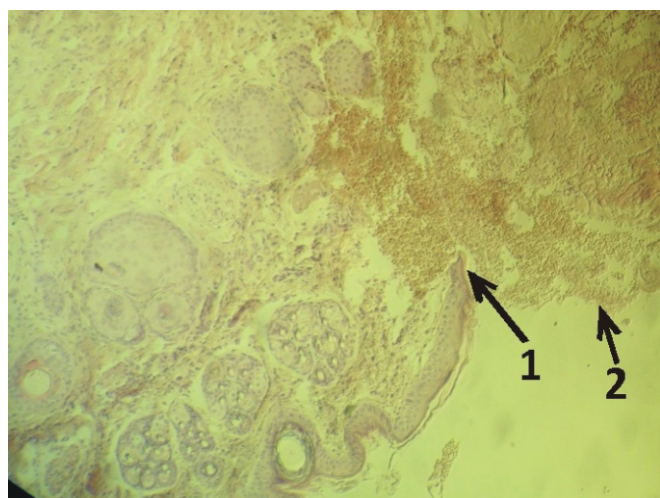


Рис. 1. Препарат ожога кожи кролика. Контроль без лечения, 10 суток. Неактивная пролиферация в сторону раневой поверхности (1); некротические массы, очаги воспалительной инфильтрации (2). Окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 120$.

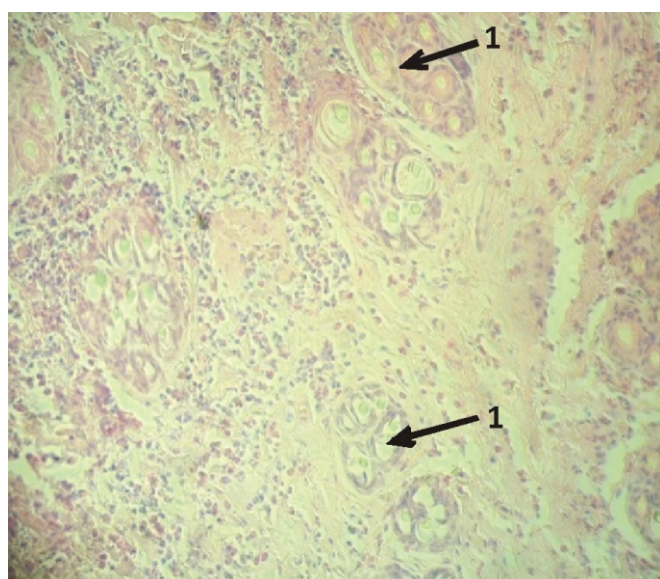


Рис. 2. Препарат ожога кожи кролика. Контроль без лечения, 10 суток. Проллиферация эпителия волосяных фолликулов на фоне отека соединительно-тканых пучков дермы (1). Окраска гематоксилин-эозином, ув. $\times 120$.

тивные процессы с воспалительным отеком. Поверхность раны была покрыта гнойно-некротическими массами. Базальная поверхность эпидермиса выглядела сглаженной, набухание проявлялось и в клетках волосяных фолликулов и сальных железах, коллагеновые волокна с явлениями отека и разрушения. В дерме — полнокровие капилляров с краевым стоянием лейкоцитов с преобладанием нейтрофилов (до 80%), которые мигрировали в ткань, образуя очаговые скопления и микроабсцессы. На периферии зоны воспаления зачатки формирования грануляционной ткани. Воспалительный отек и лейкоцитарная инфильтрация распространялись в дерму на большую глубину.

При спонтанном заживлении (без лечения) на 10-е сутки образовался выраженный бесструктурный струп, ограниченный от дермы пластом гистиолейкоцитарных клеток и некротическими массами с краевым вялотекущим ростом эпидермиса. В дерме сохранялись очаги скопления нейтрофилов с появлением плазматических клеток. По периферии зоны воспаления видны редкие очаги грануляционной ткани с небольшим количеством микроабсцессов. Сосочки и гребешки сглажены, коллагеновые волокна отекают, расположены хаотично. Волосяные фолликулы и сальные железы в состоянии выраженных дегенеративных изменений (рис. 1, 2). Таким образом, спонтанное заживление развивалось относительно медленно.

В группе кроликов, леченых с помощью поляризованного облучения, на десятые сутки наблюдения отмечен малодифференцированный струп, ограниченный от дермы гистиолейкоцитарным инфильтратом, состоящим на 70% из нейтрофилов, 30% из лимфоцитов и макрофагов. По краям раны умеренная пролиферация эпидермиса. Воспалительный отек в дерме уменьшился, хотя видны концентрические вакуоли средних размеров (с гиалиноподобным содержимым). В сосочковой зоне дермы коллагеновые волокна были расположены беспорядочно и рыхло. Вблизи раны волосяные фолликулы и сальные железы восстановили характерную структуру (рис. 3). Это значит, что особенности раневого процесса в условиях светолечения заключались в ограничении развития воспалительного отека, уменьшении миграции в очаг лейкоцитов и увеличении количества макрофагов.

Раневая поверхность кожи кроликов, облучавшихся лазерным красным светом (аппарат «Азор»), через 10 дней лечения представлена умеренно выраженной полоской струпа, под которой видна эпидермальная пластинка с регенераторной реакцией, направленной к центру раны (рис. 4). Эпидермис пролиферировал слабее, чем у животных, облученных поляризованным светом, но образовывал небольшие гребешки. Лейкоцитарный вал был выражен очень слабо, представлен нейтрофилами до 20%, грануляционная ткань в дне раны с умеренной пролиферацией капилляров. Отечность эпидермиса и дермы незначительная: концентрические вакуоли в эпидермисе не встречались, а в дерме — в единичном количестве мелкого размера, окруженные лейкоцитами, фибробластами. Коллагеновые волокна дермы расположены местами однонаправленно, местами рыхло. Плазматические клетки располагались диффузно и не образовывали очагов скопления. Это значит, что морфологическая картина соответствовала фибробластической фазе воспаления.

Из данных морфологического исследования следует, что энергии света, направленного из любого источника, оказалось недостаточной для полного купирования процессов деструкции тканевых структур, что проявилось в сохранении выраженного гистиолейкоцитарного инфильтрата, наличии вакуолей и плазматических клеток.

Характерными морфологическими признаками перехода острого раневого воспаления в хроническое являются миграция в рану мононуклеарных клеток с параллельным уменьшением гранулоцитарных [6], наличие в ране мозаично рассеянных микроабсцессов, микрофлегмон и очагов некроза, появление плазматических клеток Унны, которые не встречаются при нормальном течении заживления [8]. Очевидно, что воздействие поляризованного облучения в эксперименте тормозило переход острого воспаления в хроническое. Наряду с этим отметим, что облучение мы начинали на стадии пролиферации, т.е.

в более отдалённой фазе от момента ожога. При этом установлено, что одновременно с созреванием в грануляционной ткани происходит эпителизация многослойным плоским эпителием.

В табл. 4 представлены результаты планиметрического изучения динамики заживления ран при фототерапии.

По каждой серии экспериментов приведены два показателя: площадь раневой поверхности (S , см²) и процент сокращения площади раны (Y_t , %) на определённый срок лечения (5 и 15 сутки). Видно, что спонтанное заживление раны проходило медленно, динамика сокращения площади составила около 1,84% по окончании эксперимента. Использование метода светолечения ускорило процесс регенерации. При лечении поляризованным светом регенерация составила 3,27%, что почти вдвое больше, чем среди контрольных животных. С другой стороны, облучение раны лазером красного диапазона, увеличивал

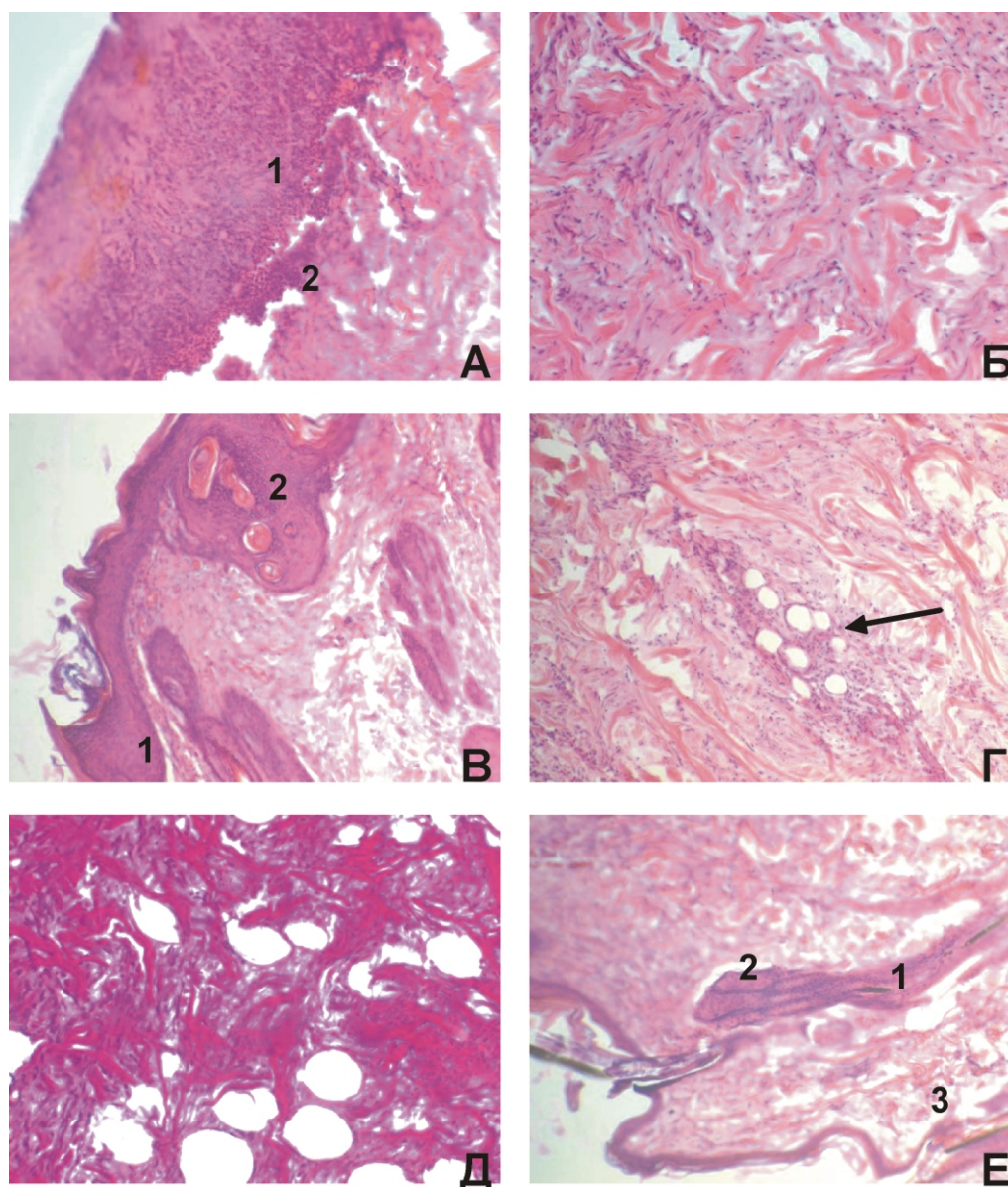


Рис. 3. Срез кожи кролика после термического ожога и облучения поляризованным светом (аппарат «Биоптрон»). А — центр раны: выраженная полоска струпа (1) и гисто-лейкоцитарный инфильтрат (2). Б — сосочковая зона дермы: пучки коллагеновых волокон расположены беспорядочно, рыхло. В — эпидермис на границе с раной: активная пролиферация эпидермиса (1), наличие округлых вакуолей с гиалиноподобным содержанием (2). Г и Д — дерма: концентрические вакуоли. Е — участок кожи вблизи раны: волосяные фолликулы (1) и сальные железы (2) в пределах нормы, дерма с явлениями отёчности (3). А, Б, В, Г и Е — окраска гематоксилин — эозином; Д — пикрофуксином. ув. x120.

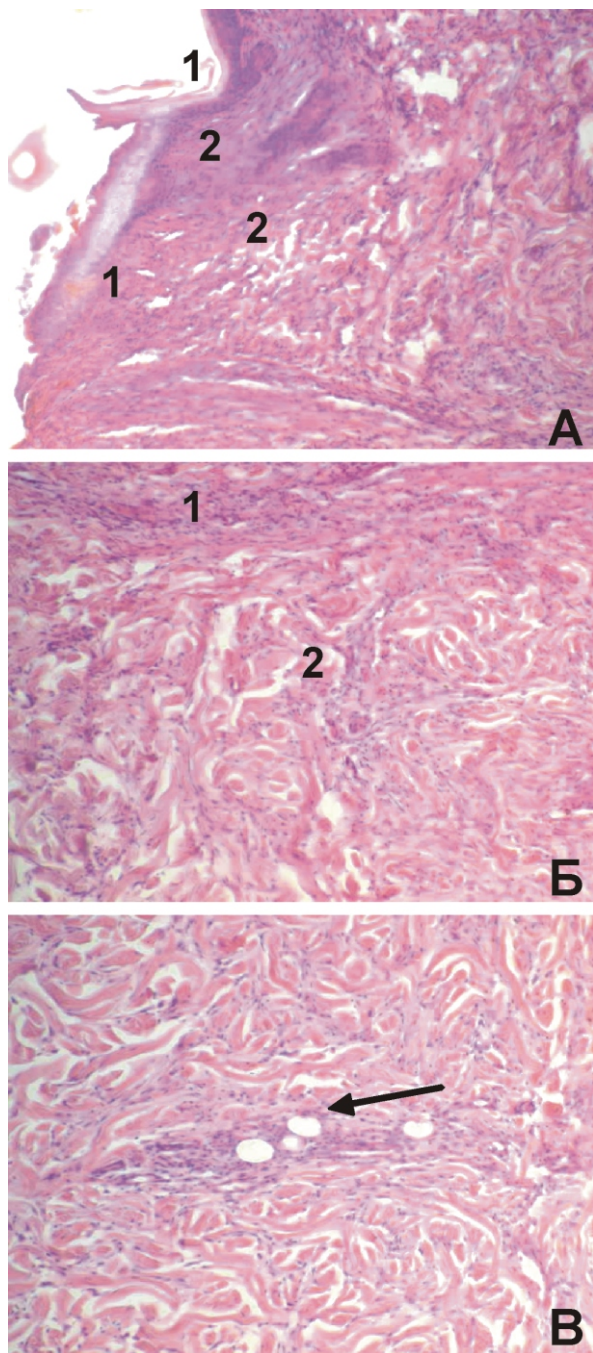


Рис. 4. Раневая поверхность кожи кролика после термического ожога и светолечения аппаратом «Азор-2к-02». А — край раны: полоска струпа (1), эпидермис, закрывающий раневую поверхность под струпом (2). Б — дерма: коллагеновые волокна, расположенные компактно (1) и рыхло (2). В — дерма: единичные концентрические пустоты. Окраска гематоксилин-эозином. ув. $\times 120$.

площадь заживления до 8,75%, т.е. был более чем вдвое эффективней поляризованного света.

Представленные результаты дают основание полагать, что в ускорении процесса заживления раны главную роль играют фотохимические реакции, возникшие под воздействием на рану как когерентного, так и поляризованного света (биофотоэффект). При этом допустимо, что некоторые фотохимические реакции, например — генерация синглетного кислорода, или/и триплет-синглетные переходы могут играть роль триггерного или «пейсмекерного» (в терминах П.К.Анохина) механизма, запускающего выявленные нами метаболические изменения в клетках и последствия этих изменений в тканях. Эти изменения на молекулярном и клеточном уровне, во многом обуславливают глубокие вторичные и третичные эффекты, возникающие и на уровне тканей, органов, и целого организма. В случае повреждения клетки, как лазерное излучение, так и поляризованный свет способствуют восстановлению всей цепочки ее функционирования — от цитоплазматической мембраны, через «эстафету мессенджеров» активирует метаболические (обменные) процессы и продукцию ферментов в цитозоле клетками. Поляризованные световые лучи, равно как и когерентные лучи, проникая вглубь кожи, способствуют нормализации капиллярного кровообращения, улучшению питания тканей, их снабжению кислородом и уменьшению отеков. Это общее представление о механизмах заживления экспериментального ожога, которое, на наш взгляд, требует объяснения некоторых деталей, их следующую интерпретацию.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что, несмотря на очень большие различия в физических параметрах потока лучей, воздействующих на раневую поверхность в проведенных экспериментах, мы отмечаем практически однотипные ответные реакции — ускорение заживления ожоговых ран, уменьшение рубцевания, а также гематологические и биохимические изменения. Это не противоречит общепринятым представлениям о развитии реакции «стресс». Биофизический смысл выявленных феноменов может состоять в том, что поляризованное излучение с широким диапазоном длин волн, а также лазерные лучи красного диапазона, которые мы использовали в проведенных опытах, вне сомнений, воздействовали на мембраны разных клеток. Взяв в качестве главного объекта, например, мембраны фибробластов, мы можем полагать, что в условиях биофотоэффекта изменялось, например, время основных конформационных переходов (цис-транс-гош) или/и ряда их промежуточных форм в мембране. Это могло бы увеличить или уменьшить как пористость, так и порозность (т.е. количество пор либо их диаметр) мембран, а также длину, форму, и электромагнитные характеристики,

Таблица 4

Влияние разных типов светолечения на площадь ожоговых ран

Срок наблюдения	Контроль		Поляризованный свет (Биоптрон)		Красный свет (Азор-2К-02)	
	S, см ²	Y _t %	S, см ²	Y _t %	S, см ²	Y _t %
До лечения	21,4 ± 0,05	0	21,3 ± 0,04	0	21,6 ± 0,04	0
5 сутки	21,7 ± 0,06	0	21,4 ± 0,04	0	21,7 ± 0,04	0
15 сутки	21,3 ± 0,04	1,84 ± 0,02	20,7 ± 0,02*	3,27 ± 0,03*	19,8 ± 0,03	8,75

Примечание. Y_t% — процент уменьшения площади раны; *p<0,05 — по сравнению с контролем

как ионных каналов, так и всей мембраны и, как следствие — изменение проницаемости мембран для различных ионов, важных для метаболизма. Наряду с этим сеансы облучения длительностью по 2 минуты, а также поляризованным светом в течение 5—10 минут при мощности излучения 20 Вт либо 30 мВт, как минимум на время облучения изменяли энергию активации биохимических реакций в самих цитоплазматических мембранах фибробластов. Естественным в таком случае, следствием изменений в ионных каналах и мембранах, должны стать изменения в цитозоле, приводящие в результате изменений обмена веществ между цитоплазмой и межклеточной жидкостью, как минимум, к положительному дисбалансу между процессами, определяющими пролиферацию, и процессами апоптоза в фибробластах. При этом определенным, видимым микроскопически результатом, становится не только ускоренное заживление ожоговой раны, но и уменьшение рубцевания. Принимая во внимание, что келоидные рубцы являются, в основном, следствием нарушений при ожоге гликопротеинового обмена, можно полагать, что и поляризованный свет, и лазерное облучение в проведенных экспериментах, либо ингибировали синтез гликозаминогликанов (основы рубцовой ткани), либо ускоряли их деградацию.

Выявленные нами изменения крови могут быть интерпретированы в рамках этой же логики, но с учётом особенностей форменных элементов, в частности — возможностей деления клеток, а также их иммунных компетенций. При этом следует помнить главные отличия не только в характеристиках излучений, но и в коэффициентах поглощения лучей определённого вида.

Заключение

Таким образом, поляризованные волны оптического диапазона, а также облучение красным спектром при лечении термических поражений кожи оказывают положительное действие за счет активации пролиферации элементов макрофагального и фибробластического ряда, ускоряя, тем самым, заживление ожоговых ран и предупреждая переход острого воспаления в хроническое. Этот вид фототерапии можно считать эффективным и возможным для использования в условиях монолечения ожогов кожи.

Сведения об авторах

Расулов Максуд Мухамеджанович, докт. мед. наук, профессор, начальник отдела государственного научного центра Российской Федерации «Государственный НИИ химии и технологии элементоорганических соединений» Государственной корпорации «Ростехнологии», Москва, Шоссе Энтузиастов, 38.

Моторина Ирина Геннадьевна, канд. мед. наук, ассистент кафедры, ГБУДПО Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ (ГБУДПО ИГМАПО); 664079, Иркутск, микрорайон «Юбилейный», дом 100; сайт: <http://www.igmapo.ru>

Юшков Геннадий Георгиевич, доцент кафедры, ФГБУ ВО Ангарский государственный технический университет Министерства образования и науки РФ (ФГБУ АнГТУ); Angarsk State Technical University: 665835, г. Ангарск Иркутской области, ул. Чайковского, дом 60; сайт: www.angtu.ru

Щукина Ольга Геннадьевна, канд. биол. наук, инженер-исследователь, ФГБУ ВО Ангарский государственный технический университет Министерства образования и науки РФ

Малышкина Наталья Александровна, канд. биол. наук, доцент кафедры, ФГБУ ВО Ангарский государственный технический университет Министерства образования и науки РФ

Список литературы

1. Оболенский В.Н., Родоман Г.В., Никитин В.Г., Карев Н.А. Трофические язвы нижних конечностей — обзор проблемы. *Русский медицинский журнал*. 2009; 25: 1647-50.
2. Пономаренко Г.Н. Применение полихроматического поляризованного некогерентного излучения аппаратов «Биоптрон» в комплексном лечении больных с ранами, трофическими язвами, ожогами и пролежнями. *Физиотерапевт*. 2010; 7: 48-59.
3. Шарипова М.М., Воронова С.Н., Рукин Е.М., Волмянко А.М. Сравнительная оценка ранозаживляющих эффектов при использовании аппаратов «Биоптрон», «Минитаг», «Орион+» и ламп полого катода. *Вопросы курортологии*. 2011; 4: 42-5.
4. Пузырева Г.А., Фролков В.К., Боровицкий И.П. Метаболические механизмы репаративного действия металлозависимого спектрального светового потока лампы с полым катодом. *Вопросы курортологии*. 2010; 3: 7-10.
5. Хабриев Р.У. *Руководство по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005. 41-53 с.
6. Макарова О.П., Богатова Н.П. Функции нейтрофильных лейкоцитов крови после термического ожога кожи у крыс. *Успехи современного естествознания*. 2004; 2: 53-4.
7. Маянский Д.Н. *Хроническое воспаление*. М.: Медицина; 1991. 272 с.
8. Кузин М.И., Костюченко Б.М. *Раны и раневая инфекция*. М.: Медицина; 1990. 221.

References

1. Obolenskii V.N., Rodoman G.V., Nikitin V.G., Karev N.A. Trophic ulcers of the lower extremities. *Overview. Russkii meditsinskii zhurnal*. 2009; 25: 1647-50. (in Russian)
2. Ponomarenko G.N. The use of the polarized polychromatic non-coherent radiation devices «Bioptron» in the complex treatment of patients with wounds, trophic ulcers, burns and bedsores. *Fizioterapevt*. 2010; 7: 48-59. (in Russian)
3. Sharipova M.M., Voronova S.N., Rukin E.M., Volmyanko A.M. Comparative evaluation of wound-healing effects when using apparatuses «BIOPTRON», «MINITAG», «Orion» and the hollow cathode lamp. *Voprosy kurortologii*. 2011; 4: 42-5. (in Russian)
4. Puzyreva G.A., Frolov V.K., Borovitskii I.P. Metabolic mechanisms of reparative action of the hollow cathode lamp with metallo-dependent spectral luminous flux. *Voprosy kurortologii*. 2010; 3: 7-10. (in Russian)
5. Khabriev R.U. *Guidance for experimental study of new pharmacological substances*. Moskva: Meditsina; 2005. 41-53 p. (in Russian)
6. Makarova O.P., Bogatova N.P. Neutrophilic leukocytes function after thermal skin burn in rats. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2004; 2: 53-4. (in Russian)
7. Mayanskii D.N. *Chronic inflammation*. Moskva: Meditsina; 1991. 272 p. (in Russian)
8. Kuzin D.N., Kostyuchenok B.M. *Wounds and wound infection*. Moskva: Meditsina; 1990. 221 p. (in Russian)

УДК 615.03

Биохимический анализ крови недиабетических крыс при пероральной нагрузке препаратами ванадия

Еркудов В.О.¹, Пуговкин А.П.¹, Багрина Я.В.¹, Сергеев И.В.²

¹ ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России (Педиатрический медицинский университет), Санкт-Петербург, 194100, ул. Литовская, дом 2

² Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034, набережная Макарова, дом 6

Цель работы состояла в изучении гипогликемических и токсических свойств препаратов, созданных на основе ванадилсульфата, метванадата натрия и комплекса ванадия с винной кислотой у недиабетических крыс. **Методы.** В течение 28 дней указанные препараты добавляли в питьевую воду крыс. После окончания опыта у крыс проводили анализ биохимических показателей крови. **Результаты.** Анализ результатов показал, что у животных, получавших метванадат натрия и ванадил сульфат, наблюдалось уменьшение содержания общего белка, мочевины, падение активности АЛТ и АСТ и небольшое снижение уровня альбумина. Указанные препараты уменьшали уровень глюкозы с 6,3 ммоль до 4,3 ммоль. Препарат, содержащий комплекс ванадия и винной кислоты, не влиял на указанные показатели. **Заключение.** Результаты работы свидетельствуют о возможности применения ванадия в фармакологии гипергликемического состояния и сахарного диабета.

Ключевые слова: крысы, ванадий, гипогликемия, аланинаминотрансфераза, аспаратаминотрансфераза.

Для цитирования: Еркудов В.О., Пуговкин А.П., Багрина Я.В., Сергеев И.В. Биохимический анализ крови недиабетических крыс при пероральной нагрузке препаратами ванадия. Патогенез. 2017; 15(1): 48—53.

Для корреспонденции: Еркудов Валерий Олегович, канд. мед. наук кафедры нормальной физиологии СПбГПМУ, e-mail: verkudov@gmail.com.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.11.2016

Biochemical analysis of the blood in nondiabetic rats after per os treatment with vanadium-containing substances

Erkudov V.O.¹, Pugovkin A.P.¹, Bagrina Y.V.¹, Sergeev I.V.²

¹ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 194100, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2, Russia

² Pavlov Insitut of Physiology of the Russian Academy of Science, 199034, Saint-Petersburg, Makarova nab, 6, Russia

The aim of the study was to reveal hypoglycemic and toxic effects of chronic peroral treatment of nondiabetic rats with compounds containing vanadilsulphate, or sodium metvanadate or vanadium tartrate. In the first and second groups the treatment was followed by hypoglycemia, total plasma protein, albumin and carbamide concentration together with decrease of alaninaminotransferase (ALT) aspartateaminotransferase (AST) activity. None of these effects were observed after treatment with vanadium tartrate. Possible mechanism of hypoglycemic action of vanadium-containing compounds and their pharmacological application in hyperglycemia treatment are discussed.

Key words: rat, vanadium, hypoglycemia, alaninaminotransferase, aspartateaminotransferase.

For citation: Erkudov V.O., Pugovkin A.P., Bagrina Y.V., Sergeev I.V. Biochemical analysis of the blood in nondiabetic rats after per os treatment with vanadium-containing substances. Patogenez. 2017; 48—53 (In Russian).

For correspondence: Erkudov Valeriy O., candidate of medical sciences of the Department of Normal Physiology SPbSPU, St.-Petersburg, Russia, e-mail: verkudov@gmail.com

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 29.11.2016

Введение

Уже более 20 лет известны инсулинмиметические свойства соединений ванадия [1, 2] и их способность стимулировать выделение инсулина β -клетками поджелудочной железы [2, 3]. В опытах на животных с экспериментальным диабетом показано, что препараты, содержащие как органические, так и неорганические соединения этого металла, стимулируют поступление глюкозы в клетку,

глюконеогенез, гликолиз, активируют синтез гликогена, а также обладают антилипидемическими свойствами [2, 4]. Соединения ванадия давно входят в состав некоторых антидиабетических пищевых добавок [5]. В то же время остается неизвестным, можно ли путем введения препаратов ванадия воспроизвести гипогликемическую реакцию, аналогичную той, которая наблюдается у здоровых лиц (то есть, без диабета) при введении инсулина. С другой стороны, широкое применение токсичных соединений ванадия в промышленности и аналитической химии,

загрязненность ими окружающей среды в некоторых регионах [6–9], делает актуальным изучение изменений биохимического и клеточного состава крови под действием таких соединений. *Целью работы* являлся экспериментальный анализ способности препаратов ванадия регулировать содержание глюкозы в крови с целью выяснения механизмов влияния этих соединений на метаболизм глюкозы. Кроме того, был проведен мониторинг биохимического состава плазмы крови у животных с целью выявления последствий токсических влияний соединений ванадия на организм [6–8].

Методы

Эксперименты проводились в соответствии с соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными [10]. Методика перорального введения испытуемых препаратов и их дозировки соответствовали распространённым рекомендациям [11, 12]. Сорок крыс-самцов линии Вистар были разделены слепым случайным образом на четыре экспериментальные группы: одна группа — контроль, а остальные три получали препараты ванадия с питьевой водой, причем каждая крыса индивидуально. Первая группа «контроль» (11 крыс) в течение 28 дней не получала никаких препаратов ванадия. Второй группе ($n = 10$) в питьевую воду в течение 28 дней добавляли «ванадий + винная кислота» (он же тартрат ванадия). Известно, что ванадий более интенсивно всасывается в кишечнике при введении в форме органических соединений [1]. Дозировка в этом случае составила (μ ; 95%CI) 4,70 мг/кг (4,5–4,9 мг/кг), что суммарно за 28 дней составляло 131,5 мг/кг (114,1–148,9 мг/кг). Третьей группе крыс ($n = 9$) в эти же сроки добавляли в воду «метванадат натрия»: суточная дозировка составляла (μ ; 95%CI) 4,74 мг/кг (4,6–4,9 мг/кг); суммарно за 28 дней животные получали 132,7 мг/кг (119,0–146,5 мг/кг) [2, 4, 11]. Четвертая группа крыс ($n = 10$) получала ванадил сульфата в дозировке (μ ; 95%CI) 4,54 мг/кг (4,4–4,7 мг/кг), суммарно за 28 дней животные получили 127,1 мг/кг (120,8–133,3 мг/кг) [2, 4, 13]. Авторы выражают признательность сотрудникам кафедры неорганической химии Санкт-Петербургского государственного технологического института (Технический университет) А.В. Еремину и Е.М. Никандрову за предоставленные химические реактивы.

Дозировку ванадия рассчитывали следующим образом. Раствор, содержащий ванадий с заданной концентрацией 50 мкг/мл, заливали в стандартную поилку объемом 60 мл и взвешивали ее. Расход раствора ванадия фиксировали по ежедневному изменению массы поилки. Суточную дозировку ванадия рассчитывали по формуле (1).

$$\text{Сут. доза, } \frac{\text{мг}}{\text{кг}} = \frac{\text{Изменение массы поилки, г} \cdot 0,05 \text{ мг / мл}}{\text{Масса крысы, кг}} \quad (1)$$

В течение 28 дней опыта ежедневно проводили изменение массы тела животного (табл. 1). После окончания опыта, на 29-й день, животных наркотизировали уретаном (1 мг/г) и для проведения биохимических исследований производили забор венозной крови в количестве 5–6 мл путем венесекции яремной вены. Используя анализатор биохимический автоматический RX Imola, (Ran-

dox lab., Великобритания), после предварительного центрифугирования (1500 об./мин) в течение 10 мин с целью отделения плазмы, определяли содержание альбумина, общего белка, глюкозы, мочевины, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы.

На первом этапе статистической обработки полученные значения сравнивались с применением непараметрического U-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Статистически значимыми считали отличия при значении $p < 0,05$. Вычисления производились с применением встроенных функций Excel из прикладного пакета Microsoft Office 2010 и программы статистической обработки данных Past version 2.17, Norway, Oslo, 2012 [14]. Данные представлены в виде: средние значения; 95% доверительный интервал (μ ; 95%CI).

В тех случаях, когда анализируемые выборки имели статистически значимые отличия, для количественной оценки изменений биохимических показателей вычисляли разницу средних (размер эффекта), p -значения для разницы средних с применением t -критерия Стьюдента (статистически значимыми считали $p < 0,05$) и стандартизированный размер эффекта по Коуэну [15] — формула (2).

$$d_c = \frac{SE}{S_{\text{pooled}}}, \quad (2)$$

где:

d_c — стандартизированный размер эффекта по Коуэну;

SE — разница средних (размер эффекта);

S_{pooled} — объединённое стандартное отклонение, вычисляемое по формуле (3).

$$S_{\text{pooled}} = \sqrt{S_1^2 + S_2^2}, \quad (3)$$

где:

S_1 — стандартное отклонение в контрольной выборке;

S_2 — стандартное отклонение в опытной выборке.

Интерпретацию значений стандартизованного эффекта по Коуэну осуществляли по методике, предложенной [15]: 0–0,2 — ничтожный эффект; 0,2–0,6 — малый эффект; 0,6–1,2 — умеренный эффект; 1,2–2,0 — высокий эффект; 2,0–4,0 — очень высокий эффект; 4 — исключительно высокий эффект.

Для подтверждения альтернативной гипотезы о неравенстве значений биохимических и гематологических показателей в контрольной и опытных группах вычисляли 95% доверительный интервал (95% CI) для разницы средних. Если вычисленный 95%CI не включал в себя значения «0», то оцениваемое этим интервалом неизвестное значение разности средних статистически значимо отличалось от «0» на уровне значимости $\alpha = 0,05$. Это дает основания отклонить нулевую гипотезу о равенстве значений биохимических и гематологических показателей в контрольной и опытной группах и принять альтернативную об их неравенстве.

Для вычисления размера эффекта и стандартизованного эффекта по Коуэну использовали приложение для Excel из прикладного пакета Microsoft Office 2010 Exploratory Software for Confidence Intervals (ESCI-JSMS), Melbourne, Australia, 2001. Данные представлены в виде: средние значения; 95% доверительный интервал (μ ; 95%CI).

Результаты

Анализ прибавок массы тела у экспериментальных животных с 1 по 28 день опыта выявил статистически значимо большую прибавку веса с умеренным размером данного эффекта у крыс, получавших метванадат натрия и ванадил сульфат по сравнению с крысами в контрольной группе (табл. 1). А именно, несмотря на исходно меньшую массу крыс в этих группах, их масса достигла контрольного уровня. При этом не наблюдалось статистически значимых отличий прибавок веса тела у животных, получавших комплекс ванадия с винной кислотой, по сравнению с контролем (табл. 1).

Сравнение биохимических показателей у животных, получавших комплекс ванадия с винной кислотой с показателями у животных из контрольной группы не выявило статистически значимых изменений количества альбумина, общего белка, глюкозы, мочевины, активности АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы (табл. 2).

У крыс, получавших метванадат натрия и ванадил сульфат, обнаружены существенные изменения по сравнению с контрольной группой (табл. 2, 3): значительное уменьшение содержания общего белка с очень высоким размером эффекта в обеих группах; уменьшение активности АЛТ с умеренным размером эффекта в группе «ванадил сульфат»; уменьшение активности

АСТ с высоким и умеренным размером эффекта соответственно; а также падение уровня мочевины с высоким размером эффекта в обеих группах. Наблюдалось также существенное уменьшение содержания глюкозы с высоким размером эффекта в обеих группах. Следует отметить, что содержание альбумина уменьшалось незначительно, хотя и достоверно, а изменения уровня щелочной фосфатазы были недостоверными. Рассчитанные 95% CI для разностей средних значений содержания альбумина, общего белка, активности АЛТ (только в группе «ванадил сульфат»), активности АСТ, содержания мочевины и глюкозы у животных в контрольной группе и крыс, получавших метванадат натрия и ванадил сульфат не включали в себя значения «0», следовательно оцениваемое этим интервалом неизвестное значение разности средних статистически значимо отличалось от «0» на уровне значимости $\alpha = 0,05$. Соответственно, мы имеем право отклонить нулевую гипотезу о том, что значения биохимических показателей в контрольной и опытных группах равны и принять альтернативную о их неравенстве (табл. 3). Статистически значимых отличий активности щелочной фосфатазы в обеих группах и АЛТ в группе «метванадат натрия» по сравнению с контрольной группой не обнаружено (табл. 2).

Таблица 1

Влияние препаратов, содержащих ванадий, на массу животных на 29-й день опыта

Группа	Масса	
	Исходная масса тела (г)	Масса тела на 29 день опыта (г)
"Контроль"	212,7 (204,7–208,7)	265,9 (253,5–278,3)
"Ванадий + винная кислота"	214,0 (203,8–224,2)	281,50 (266,51–296,5)
"Метванадат натрия"	177,8 (171,4–184,2)	262,8 (241,0–284,5)
"Ванадил сульфат"	184,0 (178,0–190,0)	263,5 (243,8–283,2)

Примечание. Здесь и далее: цифры в верхнем ряду – средние значения, а в скобках – разброс значений

Таблица 2

Влияние препаратов, содержащих ванадий, на биохимические показатели крови

Показатель	Группа			
	"Контроль"	"Ванадий + винная кислота"	"Метванадат натрия"	"Ванадил сульфат"
Альбумин, г/л	34,2 (32,8–35,6)	34,0 (31,1–37,0) н.д.	30,3 (28,2–32,3) $p = 0,002$	31,1 (29,5–32,7) $p = 0,03$
Общий белок, г/л	80,2 (76,8–83,5)	81,4 (75,4–87,4) н.д.	65,8 (62,9–68,6) $p = 4,11 \times 10^{-5}$	62,8 (57,8–67,9) $p = 0,001$
АЛТ, МЕ/л	173,0 (131,4–214,6)	183,8 (138,4–229,2) н.д.	156,2 (68,5–243,9) $p = 0,09$	119,70 (97,9–147,5) $p = 0,03$
АСТ, МЕ/л	414,4 (330,7–498,2)	430,30 (292,6–568,0) н.д.	255,6 (182,7–328,3) $p = 0,002$	269,20 (168,9–369,5) $p = 0,013$
Мочевина, ммоль/л	9,1 (8,1–10,1)	9,50 (8,5–10,5) н.д.	7,2 (6,5–8,0) $p = 0,001$	6,5 (5,9–7,2) $p = 0,003$
Глюкоза, ммоль/л	6,3 (3,2–9,3)	6,9 (3,8–9,9) н.д.	4,3 (2,6–5,9) $p = 0,01$	4,0 (2,0–6,1) $p = 0,018$
Щелочная фосфатаза, МЕ/л	250,1 (169,9–33,0)	278,7 (218,9–338,4) н.д.	259,2 (187,4–331,0) н.д.	307,3 (204,4–41,2) н.д.

Обсуждение результатов

Результаты данной работы и анализ литературы [2, 4, 6–9, 11, 12] позволяют сформулировать ряд дискуссионных вопросов применения соединений ванадия в качестве лекарственных средств и компонентов пищевых добавок. Прежде всего, это относится к вопросу о том, является ли гипогликемическое действие ванадия следствием его способности воспроизводить свойства инсулина [1, 2] или стимулировать его выделение β -клетками поджелудочной железы [2, 3]. Ранее сообщалось, что препарат на основе комплекса ванадия и винной кислоты, в отличие от ванадилсульфата и метванадата натрия, обладает гипогликемическим действием только в условиях моделирования сахарного диабета [1]. Как показано в данной работе, данный препарат не уменьшает концентрацию глюкозы в крови у недиабетических крыс. Полученные результаты, возможно, отражают конкурентные взаимоотношения инсулина и тартрата ванадия при поступлении последнего в организм.

Гипогликемический эффект, который наблюдался в опытах после перорального введения ванадилсульфата и метванадата натрия сопровождался значительным уменьшением концентрации белков плазмы крови и мочевины, а также угнетением активности плазменных ферментов. Эти результаты могут быть расценены как отражение суммарного токсического эффекта препаратов ванадия, способствующих ингибированию ферментов, участвующих в метаболизме не только белков, но и углеводов. Влияние соединений ванадия на синтез белков в печени были известны ранее [4, 6, 8]. Показано, что ванадий связывается с функциональными группами белков, ингибируя активность ферментов путем изменения конфигурации их активного центра и нарушает их внутриклеточный транспорт [2]. Таким образом, не исключено, что уменьшение

концентрации глюкозы в плазме крови как у недиабетических крыс, так и в условиях моделирования сахарного диабета после нагрузки препаратами ванадия, является следствием повреждения ферментных систем, участвующих в ее метаболизме. Подобный эффект может быть причиной крайне негативного воздействия препаратов ванадия на организм больного с диабетом, учитывая, что функция печени у таких пациентов всегда изменена [16].

Разработка, апробация и применение способов коррекции гипергликемии требует разработки четких фармакологических критериев их применения. В литературе нет однозначного представления о дозировке, продолжительности курса терапии, путях введения, а также предпочтительной химической природе действующего вещества препаратов на основе соединения ванадия [2, 4, 11–13, 17]. Наиболее эффективной при пероральном введении признана дозировка 50 мкг/мл в течение 28 дней [11, 12]. В то же время имеются данные о гипогликемическом эффекте препаратов ванадия при назначении более низких доз в течение более продолжительного курса терапии [4]. В настоящее время полностью не решен вопрос об эффективном пути введения препаратов на основе органических и неорганических соединений ванадия и о различиях в гипогликемической активности данных веществ [2, 4]. Неорганические соединения ванадия имеют низкую биологическую доступность и высокую токсичность [18]. Возрастание гипогликемической эффективности этих препаратов возможно при выборе интраперитонеального либо внутривенного пути введения [17], но в этом случае закономерно ожидать значительных повреждающих влияний этих препаратов на организм. У органических соединений ванадия биодоступность в 2–3 раза выше [19] и, согласно данным литературы, они не имеют выраженных токсических свойств [2, 19].

Таблица 3

Отличие от контроля средних значений биохимических показателей крови в группах «метванадат натрия» и «ванадил сульфат»

Показатель	Группы крыс		
	Контроль	«Метванадат натрия»	«Ванадил сульфат»
Альбумин, г/л	34,2 (32,8–35,6)	3,9 (1,7–6,2) $p = 0,002$ $d_c = 1,72$	2,50 (0,2–4,8) $p = 0,003$ $d_c = 1,03$
Общий белок, г/л	80,2 (76,8–83,5)	14,4 (10,3–118,5) $p = 1,2 \times 10^{-6}$ $d_c = 3,53$	15,7 (9,4–22,1) $p = 6,2 \times 10^{-5}$ $d_c = 2,32$
АЛТ, МЕ/л	173,0 (131,4–214,6)	–	46,8 (2,0–91,5) $p = 0,041$ $d_c = 0,98$
АСТ, МЕ/л	414,4 (330,7–498,2)	158,9 (56,8–260,9) $p = 0,004$ $d_c = 1,55$	131,0 (11,7–250,3) $p = 0,033$ $d_c = 1,03$
Мочевина, ммоль/л	9,1 (8,1–10,1)	1,9 (0,7–3,0) $p = 0,002$ $d_c = 1,66$	2,3 (1,0–3,5) $p = 0,001$ $d_c = 1,65$
Глюкоза, ммоль/л	6,3 (3,2–9,3)	3,4 (0,2–6,7) $p = 0,04$ $d_c = 1,17$	3,7 (0,5–6,90) $p = 0,024$ $d_c = 1,21$

Примечание. (d_c) – стандартизированные размеры эффекта по Коуэну влияния препаратов с ванадием на показатели крови.

Полученные результаты целесообразно принимать во внимание при разработке, внедрении, клиническом и доклиническом испытании гипогликемических препаратов на основе соединений металлов, и прежде всего, различных органических препаратов ванадия. При этом необходимо проводить мониторинг биохимических и клинических показателей крови, а также функции печени, почек с одновременным изучением морфологических изменений в этих органах и тканях.

Список литературы

1. Sakurai H., Kojima Y., Yoshikawa Y., Kawabe K., Yasui H. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coordination Chem. Rev.* 2002; 226(1-2): 187-98.
2. Федорова Е.В., Бурыкина А.В., Воробьева Н.М., Баранова Н.И. Ванадийсодержащие соединения: химия, синтез, инсулиномиметические свойства. *Биомедицинская химия.* 2014; 60(4): 416-29.
3. Brichard S.M., Ongemba L.N., Girard J., Henquin J.C. Tissue-specific correction of lipogenic enzyme gene expression in diabetic rats given vanadate. *Diabetologia.* 1994; 37(11): 1065-72.
4. Тарантин А.В., Землянова М.А. Эссенциальная роль и токсические эффекты ванадия. *Экология человека.* 2015; 12: 59-64.
5. Беляева Н.Ф., Городецкий В.К., Точилкин А.И., Голубев М.А., Семенова Н.В., Ковельман И.Р. Ванадийсодержащие соединения — новый класс терапевтических средств для лечения сахарного диабета. *Вопросы медицинской химии.* 2000; 46(4): 344-60.
6. Землянова М.А., Тарантин А.В. Нарушения белкового профиля человека в условиях воздействия тяжелых металлов. *Экология человека.* 2012; 7: 7-14.
7. Балабекова М.К., Тухватшин Р.Р. Влияние соединений ванадия и хрома на иммунологические показатели экспериментальных крыс. *Вестник кыргызско-российского славянского университета.* 2014; 14(10): 84-6.
8. Минигалиева И.А., Дегтярева Т.Д., Кашнельсон Б.А., Привалова Л.И., Береснева О.Ю., Слышкина Т.В. и др. Экспериментальное испытание эффективности биопрофилактического комплекса, тормозящего развитие вредных эффектов комбинации токсичных металлов и бензо(а)пирена. *Уральский медицинский журнал.* 2007; 11: 25-9.
9. Бармин Ю.Я., Чеботарькова С.А. Факторы риска влияющие на здоровье детского населения, проживающего в крупном промышленном центре. *Уральский медицинский журнал.* 2010; 2: 25-7.
10. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 218(5): 669-96.
11. Domingo J.L., Gomez M., Llobet J.M., Corbella J., Keen C.L. Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side-effects which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology.* 1991; 66(3): 279-87.
12. Xie M., Chen D., Zhang F., Willsky G.R., Crans D.C., Ding W. Effects of vanadium (III, IV, V) — chlorodipicolinate on glycolysis and antioxidant status in the liver of STZ-induced diabetic rats. *J Inorg Biochem.* 2014; 136: 47-56.
13. Boden G., Chen X., Ruiz J., van Rossum G.D., Turco S. Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1996; 45(9): 1130-5.
14. Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001; 4(1): 9. Available at: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
15. Hopkins W.G. Estimating Sample Size for Magnitude-Based Inferences. *Sportscience.* 2006; 10: 63-70. Available at: sports-ci.org/2006/wghss.htm.
16. Косова А.Н., Кравцова А.А., Тыртова Л.В. Оценка роста, уровня ИФР-1 и функции печени у детей с сахарным диабетом типа 1. *Педиатр.* 2012; 3(2): 26-30.
17. Nakai M., Watanabe H., Fujiwara C., Kakegawa H., Satoh T., Takada J., et al. Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18(5): 719-25.
18. Thompson K., Orvig K. Design of vanadium compounds as insulin enhancing agents. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2000; 2000: 2885-92.
19. Reul B.A., Amin S.S., Buchet J.P., Ongemba L.N., Crans D.C., Brichard S.M. Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1999; 126(2): 467-77.

References

1. Sakurai H., Kojima Y., Yoshikawa Y., Kawabe K., Yasui H. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coordination Chem. Rev.* 2002; 226(1-2): 187-198.
2. Fedorova E.V., Buryakina A.V., Vorobieva N.M., Baranova N.I. The vanadium compounds: chemistry, synthesis, insulinomimetic properties. *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2014; 60(4): 416-29 (in Russian).
3. Brichard S.M., Ongemba L.N., Girard J., Henquin J.C. Tissue-specific correction of lipogenic enzyme gene expression in diabetic rats given vanadate. *Diabetologia.* 1994; 37(11): 1065-72.
4. Tarantin A.V., Zemlyanova M.A. Vanadium essential role and toxic effects. *Jekologija cheloveka.* 2015; 12: 59-64 (in Russian).
5. Belayeva N.F., Gorodetskii V.K., Tochilkin A.I., Golubev M.A., Semenova N.V., Kovelman I.R. Vanadium compounds as a new class of therapeutical agents for treatment of diabetes mellitus. *Voprosy medicinskoj himii.* 2000; 46(4): 344-60 (in Russian).
6. Zemlyanova M.A., Tarantin A.V. Violations of human protein profile in heavy metals exposure. *Jekologija cheloveka.* 2012; 7: 7-14 (in Russian).
7. Balabekova M.K., Tuhvatshin R.R. Influence of vanadium and chromium compounds on immunological parameters of experimental rats. *Vestnik kyrgyzsko-rossijskogo slavjanskogo universiteta.* 2014; 14(10): 84-6 (in Russian).
8. Minigalieva I.A., Degtjareva T.D., Kacnel'son B.A., Privalova L.I., Beresneva O.Ju., Slyshkina T.V., et al. An experimental test of the efficacy of a bioprophylactic complex that inhibits the development of harmful effects of a combination of toxic metals and benzo (a) pyrene. *Ural'skij medicinskij zhurnal.* 2007; 11: 25-9.
9. Barmin Ju.Ja., Chebotar'kova S.A Risk factors affecting health of children residing in a big industrial center. *Ural'skij medicinskij zhurnal.* 2010; 2: 25-7.
10. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 218(5): 669-96.
11. Domingo J.L., Gomez M., Llobet J.M., Corbella J., Keen C.L. Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side-effects which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology.* 1991; 66(3): 279-87.
12. Xie M., Chen D., Zhang F., Willsky G.R., Crans D.C., Ding W. Effects of vanadium (III, IV, V) — chlorodipicolinate on glycolysis and antioxidant status in the liver of STZ-induced diabetic rats. *J Inorg Biochem.* 2014; 136: 47-56.
13. Boden G., Chen X., Ruiz J., van Rossum G.D., Turco S. Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1996; 45(9): 1130-5.
14. Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001; 4(1): 9. Available at: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
15. Hopkins W.G. Estimating Sample Size for Magnitude-Based Inferences. *Sportscience.* 2006; 10: 63-70. Available at: sports-ci.org/2006/wghss.htm.
16. Kosova A.N., Kravtsova A.A., Tyrtova L.V. Growth, IFR-1 level and liver function assessment in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr.* 2012; 3(2): C. 26-30.
17. Nakai M., Watanabe H., Fujiwara C., Kakegawa H., Satoh T., Takada J., et al. Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18(5): 719-25.
18. Thompson K., Orvig K. Design of vanadium compounds as insulin enhancing agents. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2000; 2000: 2885-92.
19. Reul B.A., Amin S.S., Buchet J.P., Ongemba L.N., Crans D.C., Brichard S.M. Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1999; 126(2): 467-77.

Сведения об авторах

Еркудов Валерий Олегович (Erkudov V.O.), канд. мед. наук, ст. преподаватель кафедры нормальной физиологии, Педиатрический медицинский университет Минздрава России, e-mail: verkudov@gmail.com

Пуговкин Андрей Петрович (Pugovkin A.P.) — доктор биол. наук, профессор кафедры нормальной физиологии, Педиатрический медицинский университет Минздрава России

Багина Яна Викторовна (Bagina Ja.V.) — студентка третьего курса, Педиатрический медицинский университет Минздрава России

Сергеев Иван Васильевич (Sergeev I.V.) — науч. сотр. лаборатории физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

УДК 616-092

Анализ переходов между линейными и нелинейными режимами кардиоритма у больных с ишемической болезнью сердца

Мезенцева Л.В.¹, Чомахидзе П.Ш.², Копылов Ф.Ю.², Перцов С.С.¹, Ластовецкий А.Г.¹ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, 125315, Москва, Россия² Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова Минздрава России», 119991, Москва, Россия

В предыдущих исследованиях, выполненных нами методом математического моделирования, было показано, что при увеличении частоты экстракардиальной импульсации, поступающей на сердце, возникают скачкообразные переходы между различными режимами кардиодинамики: линейные режимы сменяются хаотическими, отличающимися различными характеристиками устойчивости и упорядоченности сердечного ритма. Изучение переходов между линейными и нелинейными режимами кардиоритма имеет важное клиническое значение, так как уменьшение устойчивости сердечного ритма является одной из причин возникновения аритмий и увеличения частоты смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. К группе пациентов, требующих особого внимания для предупреждения развития у них фатальных аритмий, относятся пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС). Поэтому целью настоящей работы явилось применение ранее разработанных математических методов и теоретических подходов для изучения переходов между линейными и нелинейными режимами кардиоритма у больных с ИБС. **Методы.** Анализировали нелинейную динамику сердечного ритма у больных с ИБС по результатам суточного мониторирования ЭКГ. Мониторирование проводилось на аппарате «General Electric» (США). Устойчивость временных рядов кардиоинтервалов оценивали по величине $F_{кр}$ — критической точке перехода кардиодинамики из линейного в хаотический режим. Под линейным режимом кардиодинамики подразумевался режим с устойчивым синусовым ритмом, под нелинейным (хаотическим) режимом подразумевался режим, при котором регистрировались различные виды экстрасистол. **Результаты.** Показано, что у больных ИБС при постепенном возрастании частоты сердечных сокращений, начиная с некоторой критической точки, происходит скачкообразный переход из линейного режима кардиоритма в хаотический, характеризующийся уменьшением степени его упорядоченности и устойчивости. **Заключение.** Существование у больных ИБС критической точки $F_{кр}$, разделяющей линейные и нелинейные режимы кардиоритма, согласуется с теоретическими результатами, полученными нами ранее методом математического моделирования.

Ключевые слова: сердечный ритм, устойчивость; математическая модель, ишемическая болезнь сердца.

Для корреспонденции: Мезенцева Лариса Валентиновна, доктор биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории системных механизмов эмоционального стресса НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, E-mail: l.v.mezentseva@mail.ru

Для цитирования: Мезенцева Л.В., Чомахидзе П.Ш., Копылов Ф.Ю., Перцов С.С., Ластовецкий А.Г. Анализ переходов между линейными и нелинейными режимами кардиоритма у больных с ишемической болезнью сердца. Патогенез. 2017; 15(1): 54—58.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.01.2017

The analysis of transitions between linear and nonlinear regimes of cardiorythm at patiens with the ischemic heart disease

Mezentseva L.V.¹, Chomakhidze P.Sh.², Kopylov F.Yu.², Pertsov S.S.¹, Lastovetsky A.G.²¹ Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, 125315, Moscow, Russia² I.M. Sechenov First MG MU, 119991, Moscow, Russia

In our previous researches performed by a mathematical modeling method, it has been shown that at increased extracardial impulsation arriving on heart, saltatory transitions between various regimes of cardiodynamics take place: linear regimens are replaced by chaotic ones with different characteristics of heart rate irregularity and cardiac electrical stability. The study of transitions between linear and nonlinear regimens of cardiodynamics has the important clinical value as depression of cardiac electrical stability is one of the reasons occurrence of arrhythmias and rising of mortality from cardiovascular diseases. The patients with ischemic heart disease belong to the group of the patients that require special attention to prevent fatal arrhythmia development. That is why the purpose of the present work was the application of the results of mathematical modeling to studying transitions between linear and nonlinear regimes of cardiodynamics in patients with ischemic heart disease. Nonlinear heart rate dynamics in patients with ischemic heart disease was studied by daily ECG monitoring on the

«General Electric» apparatus (USA). Stability of time series of RR intervals was estimated on a critical cardiodynamics transition point from stable linear to chaotic mode. The linear regimes of cardiodynamics was meant as a mode with a stable sinus rhythm whereas the nonlinear (chaotic) regime was considered as a mode at which various kinds of extra systoles were registered. It is shown that, in patients with ischemic heart disease upon gradual growth of the heart rate at a critical Fcr point, there was a saltatory transition from linear to chaotic regimes of cardiodynamics characterized by depression of degree of ordering and stability of the heart rate. Existence of a critical Fcr point separating linear and nonlinear regimes of cardiodynamics in patients with ischemic heart disease is in accordance with the theoretical results received earlier by us using a mathematical modeling method.

Keywords: stability of heart rate; mathematical model; ischemic heart disease

For citation: Mezentseva L.V., Chomakhidze P.Sh., Kopylov F.Yu., Pertsov S.S., Lastovetsky A.G. The analysis of transitions between linear and nonlinear regimes of cardiodynamics in patients with the ischemic heart disease. *Patogenez.* 2017; 15(1): 54–58 (In Russian).

For correspondence: Larisa V. Mezentseva, Dr. Sci. Biol., lead researcher of the System Mechanisms of Emotional Stress Laboratory «Anokhin Institute of Normal Physiology», Moscow, Russia, e-mail: l.v.mezentseva@mail.ru <http://orcid.org/0000-0001-5750-5366>

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 25.01.2017

Введение

Известно, что у больных, страдающих различными сердечно-сосудистыми заболеваниями, частота сердечных сокращений (ЧСС) в покое является независимым фактором риска, провоцирующим уменьшение устойчивости сердечной деятельности и возникновение аритмий, что является одной из причин увеличения частоты общей и сердечно-сосудистой смертности [1–9]. Проблеме устойчивости сердечно-сосудистых функций посвящены многочисленные исследования [10–26]. Ведь именно уменьшение устойчивости сердечного ритма является основанием для идентификации пациентов с высоким риском возникновения жизненно опасных аритмий и внезапной сердечной смерти. На сегодняшний день смертность от заболеваний сердечно-сосудистой системы в России является одной из наиболее высоких в мире, составляя 1462 смерти на 100 000 населения в год, а от внезапной сердечной смерти ежегодно умирают 200–250 тыс. чел. [27]. К группе пациентов, требующих особого внимания для предупреждения развития у них фатальных аритмий, относятся пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС). Поэтому особую актуальность приобретают исследования устойчивости кардиоритма именно у этой категории больных. В наших предыдущих исследованиях [28], выполненных методом математического моделирования, было показано, что при увеличении частоты экстракардиальной импульсации, поступающей на сердце, возникают скачкообразные переходы между различными режимами кардиодинамики: линейные режимы сменяются хаотическими, отличающимися различными характеристиками устойчивости и упорядоченности сердечного ритма. *Целью настоящей работы* явилось применение ранее разработанных математических методов и теоретических подходов для изучения устойчивости различных режимов кардиоритма у больных ИБС.

Методика

В исследование были включены 8 пациентов (средний возраст $69,2 \pm 7,8$ года) с ИБС. Суточное мониторирование ЭКГ проводилось на аппарате «General Electric», (США). У больных в течение дня через каждый час

оценивали статистические показатели вариабельности сердечного ритма (ВСР) а также эктопическую активность. Устойчивость временных рядов кардиоинтервалов оценивали по величине F_{cr} — критической точке перехода кардиодинамики из устойчивого линейного в нелинейный (хаотический режим). Под нелинейным (хаотическим) режимом подразумевался такой режим кардиоритма, при котором регистрировались аритмии (экстрасистолия, трепетание и мерцание предсердий, желудочковые тахикардии). Мы исходили из терминологии, введенной в [28], согласно которой, режим «хаос 1-й степени» — больные, у которых эпизодически возникали предсердные экстрасистолы (наджелудочковые эктопии), а режим «хаос 2-й степени» — больные с более тяжелыми видами аритмий (мерцательная аритмия, желудочковые тахикардии и другие). Настоящее исследование посвящено изучению условий перехода от линейного режима кардиодинамики (отсутствие аритмий) к хаотическому режиму 1-й степени. Переходы между режимами «хаос 1-й степени» и «хаос 2-й степени» исключались. Для нахождения критической точки F_{cr} оценивали частоты появления наджелудочковых эктопий (НЖЭ) и графически осуществляли поиск точки разрыва функции, выражающей зависимость величины НЖЭ от ЧСС. Результаты исследований сравнивали с теоретическими результатами, полученными методом компьютерного моделирования [28].

Результаты

Результаты исследований показали, что у больных с ИБС при постепенном возрастании частоты сердечных сокращений, начиная с некоторой критической точки F_{cr} , происходит скачкообразный переход из линейного режима кардиодинамики в хаотический режим. На рис. 1 показаны зависимости НЖЭ от ЧСС у двух больных с ИБС. Можно видеть, что для больного К (рис. 1А) при ЧСС менее 82 уд./мин НЖЭ = 0, т.е. имеет место линейный режим кардиоритма. При дальнейшем увеличении ЧСС происходит скачкообразный переход из линейного режима в хаотический. Такой переход идентифицируется по появлению предсердных экстрасистол, число которых возрастает с увеличением ЧСС. Критическая точка пере-

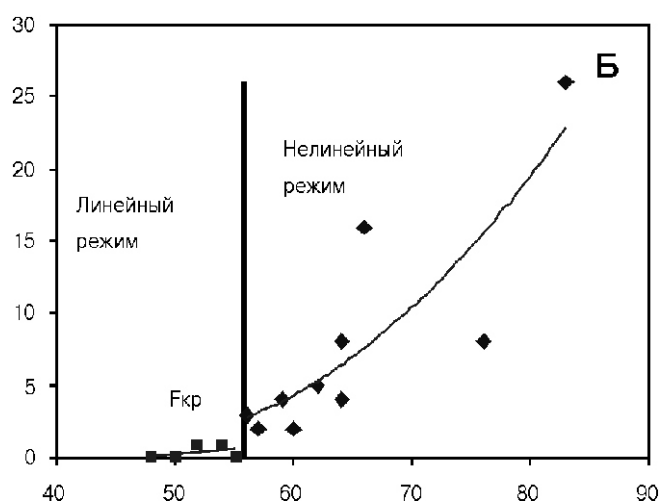
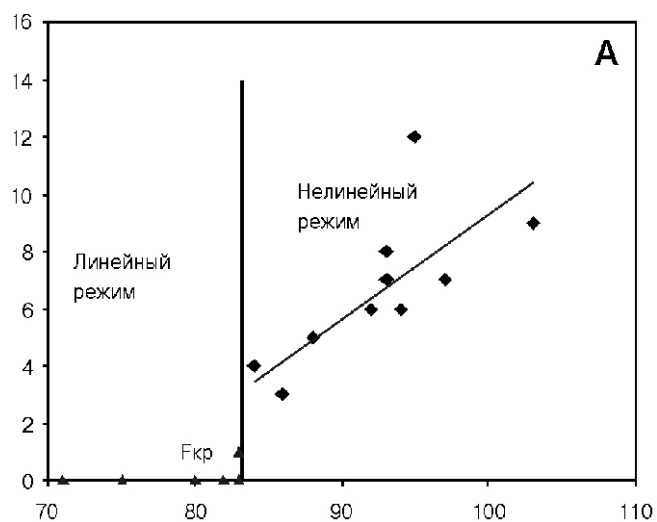


Рис. 1. Зависимость числа наджелудочковых эктопий от частоты сердечных сокращений у больных с ИБС с разными значениями $F_{кр}$. А — больной К с высоким значением $F_{кр}$ (83,1 уд./мин). Ось абсцисс — частота сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин). Ось ординат — число наджелудочковых эктопий (НЖЭ, ед.). Сплошная линия — аппроксимация экспериментальных значений линейной функцией. Б — больной М с низким значением $F_{кр}$ (55,8 уд./мин). Сплошная линия — полиномиальная аппроксимация экспериментальных значений.

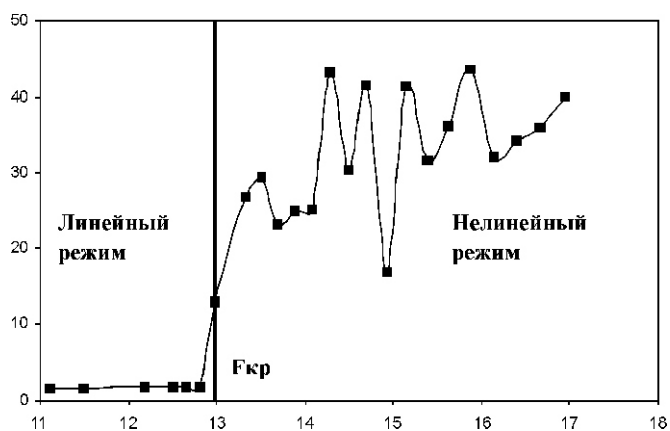


Рис. 2. Теоретическая зависимость стандартного отклонения RR интервалов от частоты входной экстракардиальной импульсации, поступающей на синоатриальный узел. Ось ординат: SDRR — стандартные отклонения RR интервалов, усл.ед. Ось абсцисс — частота импульсации F в усл.ед. $F_{кр}$ — критическая точка перехода кардиодинамики в нелинейный режим.

хода в нелинейный режим для этого больного равна $F_{кр} = 82,1$ уд./мин. Аналогичный переход в нелинейный режим для больного М (рис. 1Б) происходит при более низком значении критической точки $F_{кр} = 55,8$ уд./мин, что свидетельствует о меньшей функциональной лабильности больного М по сравнению с больным К. Существование критической точки перехода кардиодинамики из линейного в хаотический режим было характерно для всех обследованных больных. Ее значения находились в диапазоне $67,6 \pm 13,6$ уд./мин.

Полученные результаты сравнивали с результатами наших предыдущих исследований, выполненных методом компьютерного моделирования. Переходы между различными режимами кардиодинамики в условиях возрастания частоты экстракардиальной импульсации, поступающей на синоатриальный узел, изучали с помощью математической модели, основанной на закономерностях проведения электрических импульсов по проводящей системе сердца [28]. Методом компьютерного моделирования было теоретически предсказано существование критической точки перехода кардиоритма из линейного в хаотический режим. При проведении вычислительных экспериментов использовали 2 вида моделей: одноконтурная модель и двухконтурная. Одноконтурная модель основана на обобщенных характеристиках проводящей системы сердца, учитывающей величины периодов рефрактерности и задержек проведения только в атриовентрикулярном узле. Двухконтурная модель, учитывает характеристики периодов рефрактерности и задержек проведения не только в атриовентрикулярном, но и в синоатриальном узле. Результаты вычислительных экспериментов показали, что в условиях одноконтурной модели при постепенном возрастании частоты возбуждений предсердий, начиная с некоторого критического значения частоты $F_{кр}$, происходит скачкообразный переход из линейного в хаотический режим кардиодинамики, характеризующийся снижением устойчивости и упорядоченности сердечного ритма. Результаты аналитического исследования математической модели показали, что критическая частота $F_{кр}$ определяется формулой:

$$F_{кр} = 1 / (2\sqrt{K_{AB}}),$$

где K_{AB} — крутизна функции реституции атриовентрикулярного узла [28].

Более сложная, двухконтурная модель, выявила существование двух критических точек, разделяющих 3 различных режима кардиодинамики: линейный, «хаос 1-й степени» и «хаос 2-й степени». Режим «хаос 1-й степени» — больные, у которых эпизодически возникали предсердные экстрасистолы (наджелудочковые эктопии), и режим «хаос 2-й степени» — больные с более тяжелыми видами аритмий (мерцательная аритмия, желудочковые тахикардии и др). В настоящей работе мы исследовали точку перехода $F_{кр}$ от линейного режима кардиодинамики к хаотическому режиму 1-й степени. Переходы между режимами «хаос 1-й степени» и «хаос 2-й степени» мы не рассматривали. На рис. 2 показаны теоретические результаты, выполненные методом компьютерного моделирования, иллюстрирующие существование критической точки перехода кардиоритма из линейного в хаотический режим.

Здесь показана расчетная зависимость стандартного отклонения RR интервалов (SDRR) от частоты (F) вход-

ной экстракардиальной импульсации, поступающей на синоатриальный узел. Можно видеть, что если при $F < F_{кр}$ наблюдается устойчивая кардиодинамика с минимальной вариабельностью, то при $F > F_{кр}$ величина стандартного отклонения RR интервалов резко возрастает и зависимость SDRR(F) приобретает нерегулярный характер.

Аналогичный скачкообразный переход происходил и у больных ИБС. На рис. 3 и 4 показаны зависимости стандартного отклонения RR интервалов от ЧСС у тех же больных.

Здесь у больного К (рис. 3) в точке $F_{кр} = 82,1$ уд./мин имеет место разрыв функции SDRR (ЧСС), характеризующийся скачкообразным возрастанием SDRR и последующего возрастания этой величины с ростом ЧСС.

Аналогичный переход для больного М (рис. 4) происходит в точке $F_{кр} = 55,8$ уд./мин. Сравнение этих рисунков с рис. 2 показывает сходство теоретических и экспериментальных зависимостей статистических характеристик RR интервалов от ЧСС, проявляющееся в разрывном характере этих кривых и существовании у больных ИБС предсказанной нами ранее теоретически критической точки ($F_{кр}$) перехода кардиоритма из линейного в хаотический режим. Этот результат имеет важное практическое значение, так как пациенты с ИБС относятся к группе больных повышенного риска, требующих особого внимания для предупреждения развития у них фатальных аритмий. В наших предыдущих исследованиях также было теоретически доказано существование взаимосвязи между устойчивостью и упорядоченностью различных режимов кардиодинамики: чем ниже степень упорядоченности временного ряда RR интервалов, тем ниже его устойчивость [15–18]. Поэтому переход кардиодинамики в хаотический режим означает уменьшение устойчивости сердечной деятельности, т.е. величина ЧСС является фактором риска для развития аритмий. Этот вывод согласуется с результатами многочисленных исследований [1–9], свидетельствующих о том, что у больных, страдающих различными сердечно-сосудистыми заболеваниями, ЧСС в покое является независимым фактором риска, провоцирующим снижение устойчивости сердечного ритма и возникновение фатальных аритмий, что является одной из причин повышения общей и сердечно-сосудистой смертности. Поэтому в клинической практике ведения больных ИБС в дополнение к существующим методикам и диагностическим показателям состояния пациентов можно рекомендовать введение нового показателя — критической точки перехода линейного режима кардиоритма в хаотический режим $F_{кр}$. Эта критическая точка определяет функциональную лабильность сердца и адаптивные возможности организма. Чем ниже величина $F_{кр}$, тем при более низких значениях ЧСС происходит переход сердечного ритма в неустойчивый режим функционирования, тем больше вероятность возникновения у пациента жизненно опасных аритмий и обратно: чем больше величина $F_{кр}$, тем больше функциональная лабильность сердца, тем больше резервные возможности организма. Данная зависимость является предпосылкой для проведения медикаментозной коррекции, одним из способов которой является применение бета-адреноблокаторов с индивидуальным, тщательно подобранным на основании оценки величины $F_{кр}$ выбором типа препарата и его дозировки.

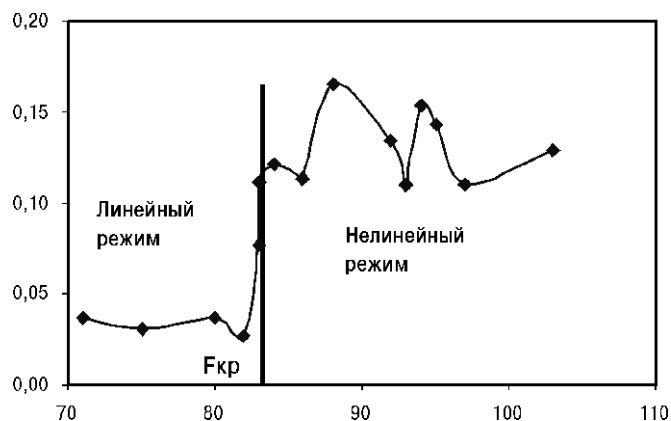


Рис. 3. Зависимость стандартного отклонения RR интервалов от частоты сердечных сокращений у больного К с высоким значением $F_{кр}$ (83,1 уд./мин.). Ось абсцисс — частота сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин). Ось ординат — стандартное отклонение RR интервалов (SDRR, с).

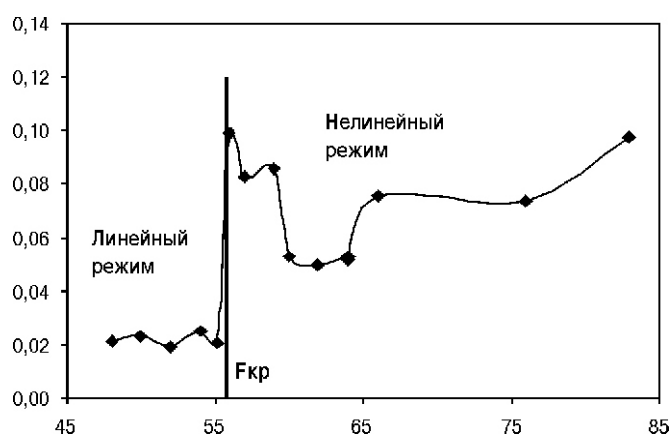


Рис. 4. Зависимость стандартного отклонения RR интервалов от частоты сердечных сокращений у больного М с низким значением $F_{кр}$ (55,8 уд./мин.). Ось абсцисс — частота сердечных сокращений (ЧСС, уд./мин). Ось ординат — стандартное отклонение RR интервалов (SDRR, с).

Список литературы

- Holmqvist F, Kim S, Steinberg BA, Reiffel JA, Mahaffey KW, Gersh BJ. et al. Heart rate is associated with progression of atrial fibrillation, independent of rhythm. *Heart*. 2015; 101(11):894-9.
- Yip AM, Zhai AB, Haddad H: Heart rate and heart failure. *Curr Opin Cardiol*. 2016; 31(2):204-8.
- Huang Y, Wang Z, Liu X, Li W, Wang M, Chen S, Wu S. Effects of high resting heart rate on the stability of carotid artery plaque in a middle and advanced aged population. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2014; 94(29):2308-11.
- Steinberg BA, Kim S, Thomas L, Fonarow GC, Gersh BJ, Holmqvist F. et al. Increased Heart Rate Is Associated With Higher Mortality in Patients With Atrial Fibrillation (AF). *J Am Heart Assoc*. 2015; 4(9): e002031.
- Spartano NL, Lyass A, Larson MG, Lewis GD, Vasan RS. Submaximal Exercise Systolic Blood Pressure and Heart Rate at 20 Years of Follow-up. *Am Heart Assoc*. 2016; 5(6) pii: e002821. doi: 10.1161/JAHA.115.002821.
- Oliva F, Ammirati E, Campana C, Carubelli V, Ciro A, Di Tanno G, Mortara A, Senni M, Morandi F, Metra M. Heart rate and outcome in patients with acute and chronic heart failure. *G. Ital. Cardiol*. 2016; 17(3):3-16.
- Wolf J, Drozdowski J, Czechowicz K, Winklewski PJ, Jassem E, Kara T, Somers VK, Narkiewicz K. Effect of beta-blocker therapy on heart rate response in patients with hypertension and newly diagnosed

untreated obstructive sleep apnea syndrome. *Int J Cardiol.* 2016;1;202:67-72.

8. Chu CY, Lin TH, Hsu PC, Lee WH, Lee HH, Chiu CA, Su HM, Lee CS, Yen HW, Voon WC, Lai WT, Sheu SH. Heart rate significantly influences the relationship between atrial fibrillation and arterial stiffness. *Int J Med Sci.* 2013;10(10):1295-300. doi: 10.7150/ijms.6619.

9. Osadchii OE. Reduced intrinsic heart rate is associated with reduced arrhythmic susceptibility in guinea-pig heart. *Scand Cardiovasc J.* 2014; 48(6):357-67. doi: 10.3109/14017431.2014.976256.

10. Wu TY, Ham SW, Katz SG. Predictors and consequences of hemodynamic instability after carotid artery stenting. *Ann Vasc Surg.* 2015; 29(6):1281-5. doi: 10.1016/j.avsg.2015.03.035.

11. Israel CW, Manegold JC. Electrical storm: definition, prevalence, causes and prognostic implications. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol.* 2014;25(2):59-65. doi: 10.1007/s00399-014-0321-y.

12. Sarusi A, Rarosi F, Szucs M, Csik N, Farkas AS, Papp JG, Varro A, Forster T, Curtis MJ, Farkas A. Absolute beat-to-beat variability and instability parameters of ECG intervals: biomarkers for predicting ischaemia-induced ventricular fibrillation. *Br J Pharmacol.* 2014; 171(7):1772-82. doi: 10.1111/bph.12579.

13. Imam MH, Karmakar CK, Khandoker AH, Palaniswami M. Effect of premature activation in analyzing QT dynamics instability using QT-RR model for ventricular fibrillation and healthy subjects. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2013; 2559-62. doi: 10.1109/EMBC.2013.6610062.

14. Nayyar S, Roberts-Thomson KC, Hasan MA, Sullivan T, Harrington J, Sanders P, Baumert M. Autonomic modulation of repolarization instability in patients with heart failure prone to ventricular tachycardia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; 305(8):H1181-8. doi: 10.1152/ajpheart.00448.2013.

15. Mezentseva L.V. Computer Modeling of the Parametric Stability of Heart Rate Dynamics in Atrial Fibrillation. *Biophysics.* 2014; 59(6): 1180-5. (in Russian)

16. Mezentseva L. V. Analysis of Stability of Different Regimes of Heart Rate Dynamics by Computer Modeling. *Biophysics.* 2014; 59(1):119-23. (in Russian)

17. Mezentseva L. V. Parameters of Atrioventricular Conduction and Stability of Different Regimes of Heart Rate Dynamics. *Biophysics.* 2014; 59(1): 124-28. (in Russian)

18. Mezentseva L. V., Pertsov S. S.. Computer Modeling-Based Analysis of the Persistence of Different Modes of Heart Rate Dynamics. *Biophysics.* 2015;60(5): 823-26. (in Russian)

19. Goldenberg I, Barsheshet A. Instability of ventricular repolarization in long QT syndrome: is the corrected QT interval sufficient for risk assessment? *Heart Rhythm.* 2013; 10(8):1176-7. doi: 10.1016/j.hrthm.2013.05.022.

20. Abisse SS, Lampert R, Burg M, Soufer R, Shusterman V. Cardiac repolarization instability during psychological stress in patients with ventricular arrhythmias. *J Electrocardiol.* 2011; 44(6):678-83. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2011.07.019.

21. Shu J, Yan GX. Instability of type 1 Brugada wave: A more sensitive ECG predictor of cardiac events? *Heart Rhythm.* 2011; 8(7):1022-3. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.03.007.

22. Xie F, Qu Z, Garfinkel A, Weiss JN. Effects of simulated ischemia on spiral wave stability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280(4):H1667-73.

23. Huikuri HV. Heart rate dynamics and vulnerability to ventricular tachyarrhythmias. *Ann Med.* 1997 29(4):321-5.

24. Bayes-de-Luna A, Vinolas X, Guindo J, Bayes-Genis A. Risk stratification after myocardial infarction: role of electrical instability, ischemia, and left ventricular function. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1994; 8 Suppl 2:335-43.

25. Sadoul N1, Aliot E. Electric stability of the heart after myocardial infarction: role of anti-arrhythmia agents during postinfarction. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1992; 85(5 Suppl):773-80.

26. Kaplan DT, Cohen RJ. Application of non-linear dynamics to the characterization of cardiac electrical instability. *Comput Cardiol.* 1987;13:439-42.

27. Bockeria O.L., Biniashvili M.B. Sudden cardiac death and ischemic heart disease. *Annaly aritmologii.* 2013; 10 (2), 79-87. (in Russian).

28. Mezentseva L.V. Analysis of the Nonlinear Heart Rate Dynamics by Two-Contour Mathematical Model. *Biophysics.* 2011; 56 (3): 510-515. (in Russian)

Сведения об авторах

Мезенцева Лариса Валентиновна (Mezentseva Larisa V), доктор биол.наук, ст. науч. сотр. лаборатории системных механизмов эмоционального стресса НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина. Москва, Россия. e-mail: l.v.mezentseva@mail.ru. http://orcid.org/0000-0001-5750-5366

Чомахидзе Петр Шалвович (Chomakhidze Petr SH.), канд. мед. наук, доцент кафедры профилактической и неотложной кардиологии 1-го МГМУ им. И.М.Сеченова. Москва, Россия.

Копылов Филипп Юрьевич (Korylov Filipp Yu.), доктор мед. наук, профессор кафедры профилактической и неотложной кардиологии 1-го МГМУ им. И.М.Сеченова. Москва, Россия.

Перцов Сергей Сергеевич (Pertsov Sergei S.), доктор мед. наук, член-корр. РАН, зав. лабораторией системных механизмов эмоционального стресса НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина. Москва, Россия.

Ластовецкий Альберт Генрихович (Lastovetsky Albert G.), доктор мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «ЦНИИОИЗ» Минздрава РФ, Москва, Россия.

УДК: 616.89-008.434.3

Диагностика функционального баланса основных систем организма, обеспечивающих здоровье у детей с нарушениями слуха и речи

Носкин Л.А.¹, Воробьева Т.В.², Потапчук А.А.³, Рубинский А.В.³, Зайцев Г.К.⁴,
Петрова И.В.², Марченкова Ф.Ю.³, Карганов М.Ю.⁵

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1. dir@npri.nrcki.ru

² Государственное бюджетное дошкольное образовательное учреждение детский сад «Кудесница» компенсирующего вида Петроградского района Санкт-Петербурга, 197022, Санкт-Петербург. dskydesnica@mail.ru

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8. artekomo@mail.ru

⁴ АО Институт кардиологической техники «Инкарт», 194214, Санкт-Петербург, Выборгское шоссе, д. 22А. incart@incart.ru

⁵ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8. niopp@mail.ru

В статье представлена комплексная оценка состояния здоровья детей дошкольных коррекционных образовательных учреждений для выявления индивидуальных реакций на учебную нагрузку. Для этого разработан и широко применяется саногенетический мониторинг, который позволяет оценить функциональный резерв основных адаптационных систем организма ребенка (сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной и опорно-двигательной). Полученные результаты обработаны по центильной системе оценки. Среди обследованных детей-инвалидов со слухоречевыми нарушениями выявлен сниженный адаптационный резерв в системе дыхания.

Ключевые слова: саногенетический мониторинг, коррекционные образовательные учреждения, индивидуальный адаптационный потенциал, дети.

Для цитирования: Носкин Л.А., Воробьева Т.В., Потапчук А.А., Рубинский А.В., Зайцев Г.К., Петрова И.В., Марченкова Ф.Ю., Карганов М.Ю. Диагностика функционального баланса основных систем организма, обеспечивающих здоровье у детей с нарушениями слуха и речи. Патогенез. 2017; 15(1): 59—64.

Для корреспонденции: Рубинский Артемий Владимирович, доцент кафедры медицинской реабилитации и адаптивной физической культуры, ФБГОУ «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова». e-mail: artekomo@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.02.2017

Diagnosis of the functional balance of the main systems that provide the health in children with hearing and speech impairment

Noskin L.A.¹, Vorobyova T.V.², Potapchuk A.A.³, Rubinskii A.V.³, Zaitsev G.K.⁴,
Petrova I.V.², Marchenkova F.Yu.³, Karganov M.Yu.⁵

¹ Petersburg nuclear physics institute named by B.P.Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», 1, md. Orlova Grove, G. Gatchina, Leningrad region, 188300, Russia. noskin@list.ru

² Kindergarten «Kudesnitsa» compensating type with the implementation of the physical and mental development, Saint-Petersburg. wtw48@yandex.ru

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «I.P. Pavlov the First St. Petersburg State Medical University» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation. 6-8, ul. Leo Tolstoy, 197022, St. Petersburg, Russia. artekomo@mail.ru

⁴ Institute of cardiological technique «Inkart», 22, Vyborg highway, 194214, St. Petersburg, Russia. zaitsevgleb@gmail.com

⁵ Karganov M.Yu., mkarganov@mail.ru, Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russia. niopp@mail.ru

In the article a comprehensive assessment of the health of children is described in preschool correctional educational institutions. In result we identify the individual reactions on academic load. Sanogenetic monitoring was developed and is used for these to estimate the functional reserve of the main adaptive systems of the child (cardiovascular, respiratory, nervous, locomotor). The obtained results are processed by table centiles. Among the surveyed disabled children with auditory-speech violations revealed a reduced adaptation reserve of the breathing system.

Key words: sanogenetic monitoring, remedial education institutions, individual adaptive capacity children.

For citation: Noskin L.A., Vorobyova T.V., Potapchuk A.A., Rubinsky A.V., Zaitsev G.K., Petrova I.V., Marchenkova F.Yu., Karganov M.Yu. Diagnosis of the functional balance of the main systems that provide the health in children with hearing and speech impairment. Patogenez. 2017; 15(1): 59—64 (In Russian).

For correspondence: Rubinsky Artemy Vladimirovich, associate professor of the Department of Medical Rehabilitation and Adaptive Physical Education, FBGOU «The First St. Petersburg State Medical University named after academician I.P. Pavlova» St-Petersburg, Russia, e-mail: artekomo@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 17.02.2017

Введение

В проблематике образования и воспитания детей с ограниченными возможностями основное внимание уделяется разработке механизмов взаимодействия и взаимопроникновения структур массового и специального образования как основы прогрессивного развития всей системы государственной помощи детям с особыми нуждами. При этом «подлинная интеграция предполагает создание оригинальной модели образования, объединяющей, а не противопоставляющей две системы — массового и специального образования. Обязательное условие интеграции — ранее выявление и ранняя психолого-медико-педагогическая коррекция» [1, 2].

Проблемы, которые у детей с различными видами патологий возникают в процессе обучения, чрезвычайно разнообразны как в плане патологии, так и в плане степени их выраженности. «Успех интеграции возможен только в том случае, если будет учтен весь спектр индивидуальных потребностей детей и если будут задействованы все образовательные возможности, доступные школе» [3]. Главное, на чем настаивают специалисты в области коррекционной педагогики, это — прекратить ту позорную практику обучения детей с особыми образовательными потребностями без оказания психолого-медико-педагогической помощи. «Такую практику можно смело назвать волюнтаризмом» [1]. Из сказанного следует, что успешная социализация детей инвалидов не столько зависит от выбранной модели интегративного или инклюзивного обучения, сколько от объективной диагностики степени сохранности адаптивных функций.

Профилактическая диагностика индивидуального адаптогенеза может обеспечиваться только теми методическими подходами, которые удовлетворяют следующим условиям:

1. Эспрессивность;
2. Неинвазивность;
3. Функциональная полисистемность;
4. Возможность эксплуатации в условиях образовательных учреждений;
5. Автоматизированность процедур измерения и анализа регистрируемых критериев.

Всем перечисленным условиям соответствует программно-аппаратный комплекс, разработанный для саногенетического мониторинга, защищенный патентом Российской Федерации на полезную модель [4, 5]. В данном сообщении приводятся результаты индивидуального саногенетического мониторинга 53 детей в возрасте от 5 до 7 лет, отягощенных различными дефектами слухового и речевого аппарата.

Материалы и методы

На момент обследования дети были в возрасте от 4 до 7 лет (33 мальчика и 21 девочка) по основной инвалидирующей патологии идентифицировались следующими вариантами: общее недоразвитие речи (ОНР) различного

уровня (32 ребенка), двусторонняя сенсоневральная тугоухость 3—4 степени (14 детей), задержка речевого развития или стертая форма дизартрии (7 детей). Сенсомоторная функция тестировалась с помощью устройства, компьютеризированного для экспресс-оценки психомоторной активности человека по двигательным тестам — УПМД (регистрационное удостоверение № 29/03041202/5085-03, сертификат соответствия № 0328284). Функциональные напряжения в дыхательной, сердечной и артериальной системах тестировалась с помощью аппаратно-программного комплекса «Спироартериокардиоритмограф» (САКР) (регистрационное удостоверение № 29/03020703/5869-04, сертификат соответствия № 7569782), использовавшегося для синхронной записи ЭКГ, непрерывного измерения АД (по Пеназу) и потока выдыхаемого воздуха. Функциональная напряженность осанки определялась с помощью бесконтактного компьютерного оптического топографа позволявшего оценить деформацию позвоночника — ТОДП (регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10456, лицензия №99-03-001738). Обработка результатов исследований проводилась с помощью программных продуктов на основе экспертной системы [6, 7, 8].

Результаты исследований

Использование унифицированной шкалы ранжира степени напряженности каждого измеренного параметра позволяет идентифицировать три функциональных состояния, отличающиеся:

1. Сбалансированное — состояние, при котором измеренные параметры не отличаются от среднепопуляционных значений детей, не отягощенных верифицированной патологией соответствующего пола и возраста;
2. Умеренно-напряженное — состояние, при котором измеренные параметры соответствуют крайним вариантам среднепопуляционных значений детей, не отягощенных верифицированной патологией соответствующего пола и возраста;
3. Выраженно-напряженное или предпатологическое — состояние, при котором измеренные параметры значительно отличаются от среднепопуляционных значений детей, не отягощенных верифицированной патологией соответствующего пола и возраста.

Отсюда следует, что повышение ранжира параметра соответствует снижению адаптивности той или иной функциональной системы.

Функциональный статус психомоторной системы

На данном этапе проведенных исследований мы остановили свой выбор на 6 критериальных оценках:

1. Длительность цикла двигательного акта (ДЦД);
2. Соотношение реакций сгибательных и разгибательных мышц (ДЕФ);
3. Плавность движений (ПД);

4. Скорость переключения центральных установок (ПЦУ);
5. Ошибка коррекции двигательного акта (ОК);
6. Латентное время реакции на свет (ВРС).

В табл. 1 приведены частоты встречаемости выраженных функциональных напряжений по каждому из идентифицированных критериев.

Как следует из приведенных результатов, в соответствии с природой инвалидизирующей патологии частота встречаемости функциональных напряжений в системе психомоторной регуляции заметно варьирует. Так, функциональное напряжение разобщения сократимости сгибателей и разгибателей регистрируется только у каждого 16 ребенка, а функциональная дезадаптивность, оцененная по ошибке коррекции движений, отмечается в подавляющем числе наблюдений (75%). О чем свидетельствует столь выраженная мозаичность критериев? В первую очередь о том, что монопараметровое тестирование психомоторной функции не достаточно информативно для оценки дефектности данной системы у исследованной когорты детей-инвалидов (напомним, что в традиционной практике основной критерий оценивается по ранжиру зрительно-моторной координации).

Проведенный многофакторный анализ указывает на существование адаптивных перестроек в системе психомоторной регуляции в ответ на инвалидизирующие слухоречевые нарушения, при которых сложность коррекции движений выражено укорачивает длительность цикла движения и увеличивает латентный период времени реакции на свет. Согласно ранее проведенным апробациям УПМД [8, 9, 10], критерии ОК, ДЦД и ВРС лимитированы, соответственно, на центральном, подкорковом и периферическом уровнях психомоторной реакции. В регистрируемом варианте это означает, что в изучаемой когорте психомоторная регуляция отягощена на всех уровнях нейросенсорного управления.

Если кластер, включающий сниженные значения ОК в сочетании с низкими значениями ДЦД и увеличенным латентным периодом ВРС, принять за вариант адаптивной перестройки психомоторной регуляции сопутствующей при нарушении слухоречевой регуляции (сенсоречевые расстройства), то только в 9 наблюдениях (18%) мы устанавливали дополнительные напряжения в системе регуляции, оцениваемые по параметрам ПЦУ, ПД и ДЕФ. Надо отметить, что данная группа была наиболее отяго-

щена симптоматикой ОНР-III уровня и тугоухостью 3–4 степени (в 8 из 9 наблюдений).

Функциональный статус регуляции сердечной, сосудистой и легочной систем

С позиции общесистемной характеристики адаптационного резерва организма принципиально важно установить степень сцепленности функциональных дизрегуляций психомоторики с дизрегуляторными вариантами дыхательной, сосудистой и сердечной деятельности. Эта задача решалась нами с использованием одномоментной спиртоартериокардиоритмографии [11]. С помощью экспертной системы оценивали состояние пяти основных регуляторных функций:

1. Дыхание (показатели функции внешнего дыхания);
2. Сократимость сердечной мышцы (ЭКГ-показатели);
3. Сердечный ритм (вариабельность сердечного ритма);
4. Сосудистое давление (артериальное давление);
5. Сосудистый ритм (вариабельность систолического и диастолического артериального давления).

Соответствующие результаты представлены в табл. 2.

Сравнивая частоты встречаемости выраженных напряжений, устанавливаемых на всех уровнях регуляции психомоторики, с теми, которые регистрируются в регуляции легочной, сердечной и сосудистой системах, можно утверждать, что адаптационные резервы заметно снижены только относительно регуляции сердечной мышцы и дыхания.

Функциональный статус регуляции осанки

Регуляция осанки и частота напряженности осанки оценивались с помощью оптической топографии по трем многопараметровым критериям [12]:

1. Степень нетравматичности спинного мозга (наблюдавшаяся у 22% детей);
2. Амортизационные функции позвоночного столба (регистрировавшиеся в 13% случаев);
3. Вертикальная устойчивость позвоночника относительно таза (отмеченная у 16% детей).

Из приведенных результатов следует, что функциональные напряжения в опорно-двигательном аппарате у детей со слухоречевыми нарушениями регистрируются достаточно часто, при этом резко преобладают системные сдвиги в биомеханических показателях опорной функции

Таблица 1

Частоты встречаемости выраженно-напряженных функциональных состояний по критериальным оценкам психомоторной системы обследованных детей

Критерии	ДЦД	ДЕФ	ПД	ПЦУ	ОК	ВРС
Частота встречаемости напряженных состояний	40%	6%	26%	24%	74%	32%

Таблица 2

Частота встречаемости выражено-напряженных состояний в регуляции систем организма у обследованных детей

Дыхание	Сократимость сердечной мышцы	Сердечный ритм	Сосудистое давление	Сосудистый ритм
18%	28%	4%	11%	8%

позвоночного столба относительно обеспечения нетравматичности спинного мозга, что коррелирует с устанавливаемой частотой функциональных напряжений в системе психомоторной регуляции.

Обсуждение

Подчеркнем, что используемые в исследованиях программно-аппаратный комплекс позволяет классифицировать уровни функциональной напряженности по основным здоровым сберегающим системам организма. При этом индивидуальный санотип по каждой системе оценивается в унифицированной трехбалльной системе, что позволяет дифференцировать варианты адаптационных резервов индивидов, исходя из следующих положений. Поскольку оценка проводится по семи функциональным системам, то минимальная сумма баллов будет соответствовать 7, а максимальная — 21 баллу. В указанном интервале сумма баллов до 10 принимается за оптимально адаптированный саногенез, сумма баллов 11—13 — за умеренно адаптивный саногенез, а сумма от 14 и выше — за дезадаптивный саногенез. При описанной оценке изученная когорта детей включала три варианта адаптогенных санотипов в следующих пропорциях:

1. Оптимально адаптированные — 15—30%;
2. Умеренно адаптированные — 30—54%;
3. Дезадаптированные — 9—16%.

Исходя из приведенных результатов, только девять детей-инвалидов объективно нуждаются в корректировке их регуляторного санотипа.

В табл. 3 приведены соответствующие характеристики индивидуальных санотипов, сопутствующих дезадаптациям (сумма баллов по 7 функциональным системам — выше 14 баллов), дифференциация которых позволяет обосновать предпочтительные варианты коррекционных мероприятий. Подчеркнем, что варианты санотипов, характеризующие объективно выраженную дезадаптацию детей-инвалидов по состоянию регуляции организменного гомеостаза были установлены у 9 детей, что составило 17% от общего количества обследованных. Отсюда следует, что в подавляющем большинстве в данной популяции детей адаптационные резервы соответствуют или оптимальному (29%), или достаточному уровню (54%) общеорганизменного адаптогенеза. Подавляющее большинство детей из числа нуждающихся в дополнительных коррекционных занятиях, санотипы которых приведены в табл. 3, имели диагнозы общего нарушения речи 2—3 степени и один ребенок относился к группе детей с нарушением слуха (двусторонняя сенсоневральная тугоухость 3—4 степени). Хотя исходное соотношение численности обследованных воспитанников по группам с нарушением речи и нарушением слуха было на уровне 2:1 соответственно. Возможно, это объясняется следующими фактами. Для слабослышащих детей коррекция нарушений физическо-

Таблица 3

Варианты индивидуальных санотипов в группе детей с полифункциональной дезадаптацией

№	Пол	Возраст	Диагноз	Психомоторика	Дыхание	Сократимость сердечной мышцы	Сердечный ритм	Сосудистое давление	Сосудистый ритм	Осанка
1	Ж	5,3	Речевой: ОНР 3 уровня, дизартрия	3	1	2	1	2	3	3
2	М	4,4	ОНР 2 уровня, дизартрия	2	1	3	1	3	2	3
3	М	5,9	ОНР 2—3 уровня, сенсомоторная алалия	2	2	3	2	2	3	1
4	М	4	ОНР 3 уровня, дизартрия	2	3	3	1	2	2	3
5	Ж	5,9	ОНР 3 уровня, стертая форма дизартрии	3	3	2	2	3	1	3
6	М	6	Основной: двусторонняя сенсоневральная тугоухость 3—4 степени. Сопутствующий: плоскостопие, резидуальная энцефалопатия	3	3	2	1	2	2	2
7	Ж	5,8	Основной — Моторная алалия	2	3	1	2	3	1	2
8	М	5,7	Речевой: ОНР 2—3 уровня, дизартрия, логоневроз. Сопутствующий: плоскостопие	1	3	2	3	2	2	2
9	М	4,4	Речевой: ОНР 3 уровня. Сопутствующий: атопический дерматит, плоско-вальгусные стопы	3	2	3	2	1	1	2
			1	11%	22%	11%	44%	11%	33%	11%
			2	44%	22%	44%	44%	56%	44%	44%
			3	44%	56%	44%	11%	33%	22%	44%

Примечание. ОНР — общее недоразвитие речи. В последних трех строках таблицы приведен анализ частот встречаемости по каждой из аттестованных функциональных систем: 1 — оптимально адаптированных вариантов; 2 — умеренно адаптированных вариантов; 3 — дезадаптированных вариантов.

го развития (статического равновесия, пространственной ориентации и ритмических способностей) обеспечивается на занятиях с различными специалистами и занятиях по физическому воспитанию с помощью инновационных педагогических технологий. Организовано инклюзивное физическое воспитание с использованием методик слышащих детей в процессе физической подготовки детей с нарушением слуха, обеспечивающих не только необходимый уровень физической подготовленности, но и способствующих коррекции отклонений в различных сферах их деятельности с регулярной оценкой физической подготовленности по двум блокам тестов: развитие физических качеств и сформированность двигательных навыков. Активно проводится работа по интеграции деятельности специалиста по физическому воспитанию в целостный коррекционно-педагогический процесс с позиции оптимального выбора содержания занятий физическими упражнениями, повышающими эффективность коррекции вторичных нарушений слуха у детей старшего дошкольного возраста.

Кроме того, из приведенных в табл. 3 результатов обследования следует, что ведущую роль в проблематике дезадаптации преимущественно у детей с речевыми нарушениями приобретает функциональная дисрегуляция дыхательной системы (56%), которая отмечается в данной группе значительно чаще, чем в обобщенной популяции (29%). Значительное количество воспитанников, нуждающихся в коррекционных мероприятиях, имеют напряжение по психомоторике, сердечной деятельности и осанке (по 44% соответственно). Отсюда следует, что в адресной коррекции детей необходимо уделять основное внимание увеличению функциональной емкости дыхательной системы, а также на коррекции постуральных реакций, целенаправленных движений и экономизации работы сердца. Поэтому одним из основных направлений, которое поможет обеспечить здоровье сберегающую направленность коррекционно-логопедического процесса является внедрение интегрированных занятий для коррекции функциональной дисрегуляции дыхательной системы у детей, имеющих речевые нарушения или предпосылки их возникновения, где осуществляется обучение и воспитание детей с различными формами патологии.

Список литературы

1. Малофеев, Н.Н. Похвальное слово инклюзии, или речь в защиту самого себя. *Альманах института коррекционной педагогики*. 2011; 15: 13-22.
2. Малофеев, Н.Н. Актуальные проблемы специального образования. *Дефектология*. 1994; 6: 3-9.
3. Стангвик, Г. *Политика интегрированного обучения в Норвегии. Хрестоматия по курсу*. Сост.: Ш. Рамон, В. Шмидт. М; 2003. 220 с.
4. Пивоваров, В.В. Спироартериокардиоритмограф. *Медицинская техника*. 2006; 1: 38-42.
5. Носкин, Л.А., Рубинский А.В., Воробьева Т.В., Шандыбина Н.Д. Объективный мониторинг функционального состояния сердечно-сосудистой и легочной систем у детей младшей возрастной группы с дефектами речи и слуха. *Патогенез*. 2015; 13(3): 31-5.

6. Афанасьева Е.А. *Оценка влияния образовательных технологий и внутришкольной среды на здоровье детей и подростков*. Под ред. Матвеева С.В. СПб. Издательство СПбГМУ; 2011.

7. Алчинова И.Б., Архипова Е.Н., Афанасьева Е.В. *Практическое руководство по инструментальному саногенетическому мониторингу*. Под ред. Карганова М.Ю. М.: ГАОУ ВПО МИОО; 2012. 96 с.

8. Пивоваров, В.В. Компьютерный измеритель движений (КИД). *Медицинская техника*. 2006; 2: 21-4.

9. Безруких, М.М., Киселев М.Ф., Комаров Г.Д., Козлов А.П., Курнешова Л.Е., Ланда С.Б., Носкин Л.А., Носкин В.А., Пивоваров В.В. Возрастные особенности организации двигательной активности движений у детей 6 — 16 лет. *Физиология человека*. 2000; 26(3): 100-7.

10. Носкин, Л.А. Комашня А.В., Зайцев Г.К., Марченко-ва Ф.Ю., Ловицкий В.Д. Исследование психомоторных особенностей школьников начальных классов. *Клинико-лабораторный консилдум. Приложение 1*. 2013; 45(1): 41 — 59.

11. Пивоваров В.В., Лебедева М.А., Панкова Н.Б., Носкин Л.А., Румянцев А.Г. Диагностика функционального состояния сердечно-сосудистой системы детского организма методом спироартериокардиоритмографии. *Российский педиатрический журнал*. 2005; 1: 8 — 12.

12. Носкин Л.А., Кривошеев В.Ф., Кучма В.Р., Румянцев А.Г., Носкин В.А., Комаров Г.Д., Карганов М.Ю., Вирабова А.Р., Боголюбова Н.Г. *Принципы создания методов полисистемного саногенетического мониторинга. Педагогическая санология*. М.: МИОО; 2005. 96-122.

References

1. Malofeev N.N. A commendable word for inclusion, or speech in defense of oneself. *Al'manah instituta korrekcionnoj pedagogiki*. 2011; 15: 13-22.
2. Malofeev N.N. Actual problems of special education. *Defektologija*. 1994; 6: 3-9.
3. Stangvik G. *The policy of integrated education in Norway. Reader at the rate*. Compiled by: Sh. Ramon, W. Schmidt. Moscow; 2003. 220 p.
4. Pivovarov V.V. Spiroarteriokardioritmograf. *Meditsinskaya tekhnika*. 2006; 1: 38-42.
5. Noskin L.A., Rubinskij A.V., Vorob'eva T.V., Shandybina N.D. Objective monitoring of the functional state of the cardiovascular and pulmonary systems in children of younger age group with speech and hearing defects. *Patogenez*. 2015; 13(2): 31-5.
6. Afanas'eva E.A. et al. Assessment of the impact of educational technologies and the school environment on the health of children and adolescents. Ed. by S.V. Matveyev. Saint-Peterburg: Publishing house SPbGМУ; 2011. 100 p.
7. Alchinova I.B., Arhipova E.N., Afanas'eva E.V. et al. *A practical guide to instrumental sanogenetic monitoring*. Ed. by M.Yu. Karganov. Moscow: GAOU VPO MIOO; 2012. 96 p.
8. Pivovarov V.V. Computer motion meter (KID). *Meditsinskaya tekhnika*. 2006; 2: 21-4.
9. Bezrukih M.M., Kiselev M.F., Komarov G.D., Kozlov A.P., Kurneshova L.E. et al. Age features of the organization of motor activity of movements in children 6 — 16 years. *Fiziologiya cheloveka*. 2000; 26(3): 100-7.
10. Noskin, L.A., Komashnja A.V., Zajcev G.K., Marchenkova F.Ju., Lovickij V.D. Investigation of psychomotor features of schoolchildren in primary grades. *Kliniko-laboratornyy konsilium. Prilozhenie 1*. 2013; 45(1): 41-59.
11. Pivovarov V.V., Lebedeva M.A., Pankova N.B., Noskin L.A., Rumjancev A.G. Diagnostics of the functional state of the cardiovascular system of the child's organism by the method of spiroarteriocardiorhythmography. *Rossiyskii pediatricheskii zhurnal*. 2005; 1: 8-12.
12. Noskin L.A., Krivosheev V.F., Kuchma V.R., Rumyantsev A.G., Noskin V.A., Komarov G.D., Karganov A.Yu., Virabava A.R., Bogolyubov N.G. *Principles of creating methods of multisystem sanogenetic monitoring. Pedagogical Sanology*. Moscow: MIOO; 2005. 96-122.

Сведения об авторах

Носкин Леонид Алексеевич, докт. биол. наук, профессор, зав. лабораторией медицинской биофизики, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», e-mail: dir@rnpri.nrcskf.ru

Воробьева Татьяна Викторовна, заведующая государственного бюджетного дошкольного образовательного учреждения детский сад «Кудесница» компенсирующего вида Петроградского района Санкт-Петербурга

Потапчук Алла Аскольдовна, докт. мед. наук, профессор, проректор по воспитательной работе, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Рубинский Артемий Владимирович, канд. мед. наук, доцент кафедры медицинской реабилитации и адаптивной физической культуры, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: artekomo@mail.ru

Зайцев Глеб Конатантинович, инженер, АО Институт кардиологической техники «Инкарт», e-mail: incart@incart.ru

Петрова Ирина Викторовна, врач-невролог государственного бюджетного дошкольного образовательного учреждения детский сад «Кудесница» компенсирующего вида Петроградского района Санкт-Петербурга

Марченкова Фаина Юрьевна, ассистент кафедры физики, математики и информатики, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Карганов Михаил Юрьевич, докт. биол. наук, профессор, зав. лабораторией полисистемных исследований, ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, e-mail: niiorp@mail.ru

УДК 612.844

Субфракционный состав слёзной жидкости после выполнения фемтосекундной рефракционной операции с малым разрезом по методу ReLex Smile. Сравнительное исследование

Куклева О.Ю.¹, Яковенко Е.Н.², Степанова М.А.¹, Давтян К.К.¹, Карганов М.Ю.², Эскина Э.Н.¹¹ ООО Клиника лазерной медицины «Сфера» профессора Эскиной Э.Н., 117628, Москва, ул. Старокачаловская д.10² ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, 125315, ул. Балтийская, д.8.

Цель исследования состояла в изучении особенностей реакции глазной поверхности и ткани роговицы на операцию по методу ReLex Smile по сравнению с другими типами рефракционной хирургии. **Материалы и методы.** В исследование были включены 65 пациентов (129 глаз) с миопией (в среднем $4,85 \pm 1,77D$): 16 (32 глаза) после операции фоторефракционной кератэктомии (ФРК; photorefractive keratectomy, PRK), 16 (32 глаза) после операций трансэпителиальной фоторефракционной кератэктомии (Транс ФРК; transepithelial photorefractive keratectomy, Trans PRK), выполненных на эксимерном лазере Schwind Amaris (SCHWIND eye-tech-solutions) и 33 пациента (65 глаз) после операции по методу ReLex Smile (CZM VISUMAX). Смывы с глаз проводились во всех группах до операции, в первый день после операции, на 4-й день в группах PRK и Trans PRK, на 7-й день в группе ReLex Smile. Полученные смывы слезной жидкости (СЖ) были исследованы с помощью лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС). **Результаты.** В 1-й день после операции во всех группах наблюдался сдвиг спектра ЛКС в сторону увеличения содержания частиц среднего размера (100–600 нм). Были обнаружены различия в диапазоне средномолекулярных частиц (93–223 нм) между группой PRK и группой Trans PRK ($p < 0,05$), доля которых составила 17,2% и 5,2% соответственно. Процент высокомолекулярных частиц (600–2000 нм) в СЖ в группах PRK, Trans PRK и ReLex Smile составлял соответственно 3,1%, 6,0% и 1,8%. Через неделю после операции в группе ReLex Smile указанные параметры восстанавливались до уровня, близкого к исходному. В других группах в СЖ сохранялось повышенное содержание средномолекулярных частиц. **Выводы.** Можно полагать, что менее значительные и продолжительные изменения в составе СЖ в группе ReLex Smile связаны с меньшей травматизацией роговицы фемтосекундным лазером. Кроме того, малый размер вреза и быстрая его герметизация могут привести к ограничению выхода белковых фракций в СЖ и уменьшить выраженность изменений ее состава.

Ключевые слова: фемтосекундная ламеллярная экстракция, фоторефракционная кератэктомия, трансэпителиальная фоторефракционная кератэктомия, лазерная корреляционная спектроскопия, слёзная жидкость, интрастромальная лентикюла, роговица

Для цитирования: Куклева О.Ю., Яковенко Е.Н., Степанова М. А., Давтян К.К., Карганов М.Ю., Эскина Э.Н. Субфракционный состав слёзной жидкости после выполнения фемтосекундной рефракционной операции с малым разрезом по методу ReLex Smile. Сравнительное исследование. Патогенез. 2017; 15(1): 65–71.

Для корреспонденции: Куклева Ольга Юрьевна, врач-ординатор клиники лазерной медицины «Сфера», Москва, e-mail: olga.kukleva@sfe.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.02.2017

Subfractional composition of tear fluid after RLEX Smile femtosecond refractive surgery. Comparative study

Kukleva O.Yu.¹, Yakovenko E.N.², Stepanova M.A.¹, Davtyan K.K.¹, Karganov M.Yu.², Eskinina E.N.¹¹ Laser surgery clinic «SPHERE», 10, Starokachalovskaja str., Moscow, Russia, 117628² The Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russia, 125315

Purpose. Investigating the characteristics of the ocular surface and corneal tissue reaction after ReLEX Smile surgery by analyzing the subfractional composition of tear fluid using laser correlation spectroscopy and compared with other types of refractive corneal surgery. **Materials and methods.** The prospective research included 65 patients (129 eyes) with myopia (mean $4,85 \pm 1,77D$): 16 patients (32 eyes) after PRK surgery, 16 patients (32 eyes) after Trans PRK surgery, these operations were performed on the excimer laser Schwind Amaris (SCHWIND eye-tech-solutions), and 33 patients (65 eyes) after ReLEX Smile surgery, performed on the femto laser VISUMAX (CZM). The eye washout containing tear film was taken before, one day and within a week after surgery: on day of epithelization (day 4th) in PRK and Trans PRK groups and on 7th day for patients of the ReLex Smile group. Afterwards, the laser correlation spectroscopy (LCS) analysis of washout was performed and data

were compared, taking into account that degenerative processes are increasing low weight molecules proportions and cellular metabolism changes are increasing the proportion of moderate weight molecules. **Results.** On the 1st day after surgery, LCS in all groups shown a spectrum shift in middle-size fractions (100–600 nm), with a statistically significant difference ($p < 0.05$). We discovered the differences between PRK and Trans PRK in middle range particles (91–223 nm) — 17,2%, 5,2% accordingly, and in high weight range (600–2000 nm) for PRK, Trans PRK group and ReLex Smile — 3.1%, 6.0% and 1.8% accordingly. After 1 week, only in the ReLex Smile group, the overall picture of the spectrum is became almost the same as it was before surgery. In the other groups, we observed an increase of middle size particles. **Conclusions.** We consider a less tissue damage in ReLex SMILE group according to a shorter and less significant changes in tear film in this group. It associated with less traumatization of the cornea by a femtosecond laser. Also, a smaller size and faster sealing of the corneal incision could explain it. We assume that ReLex Smile has a less traumatic effect on the cornea than other investigated types of corneal laser refractive surgery.

Keywords: femtosecond lamellar extraction, intrastromal cornea lenticule, photorefractive keratectomy, transepithelial photorefractive keratectomy, laser correlation spectroscopy, tear fluid, cornea.

For citation: Kukleva O.Yu., Yakovenko E.N., Stepanova M.A., Davtyan K.K., Karganov M.Yu., Eskina E.N. Subfractional composition of tear fluid after RLEX Smile femtosecond refractive surgery. Comparative study. *Patogenez.* 2017; 15(1): 65–71 (In Russian).

For correspondence: Kukleva Olga Yurievna, resident physician at the «Sfera» Laser Medicine Clinic, Moscow, Russia, e-mail: olga.kukleva@sfe.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 08.02.2017

Введение

Несмотря на то, что существуют различные консервативные методы коррекции аномалий рефракции (очки, контактные линзы и др.) все больше пациентов отдают предпочтение хирургическому лечению. Опрос пользующихся контактными линзами пациентов, проведенный Л.И. Балашевичем в 2009 г. показал, что 77% из них готовы прибегнуть к альтернативным методам коррекции, которые избавили бы их от необходимости носить линзы [1]. Высокие зрительные функции без очков и контактных линз, полученные с помощью рефракционной хирургии, улучшают качество жизни пациентов, а низкий процент осложнений у современных кераторефракционных операций, высокая предсказуемость результатов соответствуют требованиям современной медицины.

Роговичная рефракционная хирургия — быстро и успешно развивающаяся отрасль офтальмологии. В настоящее время лазерная коррекция является общепризнанным методом коррекции зрения. Применение фемтосекундных лазеров в рефракционной хирургии — революционное нововведение. Развитие фемтосекундных технологий привело к возможности создания интрастромальной лентикулы, которую можно удалить и в один этап исправить близорукость. Таким образом, устраняется необходимость добавочной абляции с помощью эксимерного лазера. Эта процедура получила название ReLex Smile (Refractive Lenticule Extraction; Small Incision Lenticule Extraction) — способ, при котором лентикула удаляется через небольшой надрез без необходимости создания лоскута. Первые опубликованные результаты проспективных исследований показали, что данный метод обладает рефракционной предсказуемостью и безопасностью [2–4]. Отмечена высокая удовлетворённость полученным эффектом у пациентов через 3 месяца после вмешательства. Преимущество данного метода заключается в том, что боуменова мембрана остаётся неизменной, сохраняя, таким образом, механическую прочность роговицы, что делает операцию менее травматичной [5]. Кроме того, этот метод практически не повреждает поверхностное нервное сплетение роговицы, что позволяет сохранить её чувствительность и минимизировать вероятность развития синдрома сухого глаза [6].

Цель исследования состояла в сопоставлении особенностей реакции глазной поверхности и ткани роговицы на операцию по методу ReLex Smile с другими методами рефракционной хирургии роговицы — фоторефракционной кератэктомией (ФРК; photorefractive keratectomy, PRK) и транsepителиальной фоторефракционной кератэктомией (Транс ФРК; transepithelial photorefractive keratectomy, Trans PRK). Поскольку дегенеративные процессы увеличивают процентное содержание низкомолекулярных частиц, а клеточные изменения метаболизма повышают содержание частиц среднего диаметра в слезной жидкости (СЖ), то степень травматичности сравнимых оперативных вмешательств оценивали по изменению спектра частиц в СЖ с помощью лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) [7].

Материалы и методы

В исследовании участвовали 65 пациентов (129 глаз) с миопией (в среднем $4,85 \pm 1,77$ Д), из которых: 16 больных (32 глаза) после операции PRK, 16 пациентов (32 глаза) после операции Trans PRK выполненных на эксимерном лазере Schwind Amaris (SCHWIND eye-tech-solutions) и 33 пациента (65 глаз) после операции по методу ReLex Smile (CZM VISUMAX). Как видно из таблицы, исследованные группы мало различались по возрасту, степени миопии и срокам ношения или снятия мягких контактных линз (МКЛ). Пациенты находились на амбулаторном лечении в клинике «Сфера». У всех пациентов ранний послеоперационный период протекал без осложнений. Биологический материал получен с согласия испытуемых.

Критериями включения в группы являлись:

1. Миопия любой степени;
2. Отсутствие сопутствующей соматической патологии;
3. Отсутствие сопутствующей офтальмопатологии;
4. Снятие МКЛ не менее, чем за 14 дней до проведения операции;
5. Отсутствие постоянного режима инстилляций, лекарственных средств не менее чем в течение 14 дней до операции.

Для оценки травматичности и эффективности оперативных вмешательств изучали субфракционный состав СЖ. Смывы с глаз проводились до, в первый день и в течение недели после операции: а именно, в группах PRK и Trans PRK в день эпителизации (4-й день) и на 7-й день для пациентов группы ReLex Smile. Затем данные смывы были исследованы с помощью лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС). В послеоперационном периоде в каждой группе проводилась противовоспалительная терапия по схеме (антибиотики, кортикостероиды) и репаративная, слезозаместительная терапия. Для группы ФРК и Транс ФРК: в первые 4 дня Офтавикс и Таурин, затем Максидекс по нисходящей схеме и Хилогар-комод в течение 11 недель. Для группы ReLex Smile: 1–7 день Тобрадекс и Корнерегель, 8–14 день — Максидекс и Корнерегель; 15–21 день Корнерегель; с 22 дня и далее 1 месяц — Теалоз.

Операцию ReLex Smile проводили на фемтосекундном лазере VisuMax, Carl Zeiss Meditec. Длина излучаемой прибором волны 1043 нм, при длительностях импульса 220–580 фс. Размер пятна минимален и составляет 1 мкм, а время создания лоскута составляет 30 секунд. Возможная толщина лоскута варьируется от 80 микрон до 220 микрон. Ультракороткие импульсы дают возможность создавать высокую плотность мощности, порядка 1010 Вт/см² в фокусе оптической системы. Таким образом, они способны проводить высокоточное рассеечение биологических тканей без ее коллатерального повреждения. В облучаемой зоне возникает оптический пробой, лежащий в основе плазмо-индуцированной абляции и фотодеструкции. При этом вероятность термического повреждения ткани практически исключена за счёт ультракороткого импульса.

Операции PRK и Trans PRK проводились на эксимер-лазерной установке Schwind Amaris® 500E с длиной волны 193 нм и частотой импульсов 500 Гц и со специальным алгоритмом «летающего пятна». Воздействие эксимерного лазера на роговицу вызывает процесс фотоабляции. Суть явления заключается в разложении органических твердых тел фотонами и выбросе фрагментов этих тел при сверхзвуковых скоростях. В результате получается «вытравленный» фрагмент ткани со строго заданной геометрией, определенной световым пучком. Изменяется кривизна передней поверхности роговицы с целью ослабления или усиления преломляющей силы. Морфологическими механизмами, определяющими рефракционный эффект и зрительные функции после поверхностной абляции являются: нарушение регенерации эпителия и дифференцировки эпителиального пласта, разрушение межэпителиальных и эпителиально-стромальных связей, отек собственного вещества роговицы, изменение состава экстрацеллюлярного матрикса роговицы, дезориентация

коллагеновых волокон, нарушение функции заднего эпителия роговицы. Отличия методик Trans PRK и PRK заключаются в следующем: при проведении Trans PRK эпителий удаляется одновременно, при этом нет необходимости в хирургическом инструментарии (как при PRK, где эпителий удаляется скарификатором); зона абляции соответствует зоне эрозии и имеет гладкий край [8]; уменьшение травматизации роговицы [9]; меньший дискомфорт во время и после процедуры [10]; ускорение заживления [11] и полного послеоперационного восстановления до 2–3 недель [12].

У обследуемых проводились смывы с глаз 0,9% раствором хлорида натрия объемом 0,4–0,5 мл. Полученный материал помещали в пробирки типа «Эппендорф». Образцы были заморожены при температуре –20°C на срок не более 5 суток. Непосредственно перед регистрацией спектра СЖ размораживали и центрифугировали 15 минут при 3000 об./мин для получения прозрачного супернатанта. Для изучения субфракционного состава СЖ сравнимых групп использован лазерный корреляционный спектрометр ЛКС-03-«ИНТОКС» [7]. С помощью этого метода оценивали в СЖ распределение частиц по размерам, средние значения вклада частиц в светорассеяние в низко- и среднемoleкулярном диапазоне. Низкомoleкулярные биосубстраты белковой природы (около 120 нм) содержат преимущественно альбумины и глобулины, а среднемoleкулярные (120–600 нм) — гликопротеиновые комплексы, высокомoleкулярные (600–2000 нм) — иммунные комплексы [7]. Затем было проведено сопоставление с полученными нами ранее данными об изменении субфракционного состава СЖ после проведения операций Trans PRK и PRK [9].

Результаты

Как уже отмечалось, дегенеративные процессы увеличивают процентное содержание низкомолекулярных частиц, а клеточные изменения метаболизма повышают содержание частиц среднего диаметра [7]. На рис. 1 видно, что в 1-й день после операции во всех группах наблюдался сдвиг спектра ЛКС в сторону увеличения частиц среднего размера — в диапазоне 100–600 нм, что свидетельствует об дегенеративных процессах в ранний послеоперационный период.

При этом содержание частиц в среднемoleкулярном диапазоне (122–300 нм) в группе PRK было выше, чем в группе Trans PRK — соответственно 17,2%, и 5,2% (p<0,05) (рис. 2). Данные размеры частиц соответствуют глико-липопротеиновой фракции. Их появление вызвано разрушением коллагеновых волокон и клеток стромы роговицы. Фрагменты этих частиц преобладают в данных спектрах СЖ.

Таблица

Характеристика групп пациентов, включённых в исследование

Метод коррекции	Средний возраст (лет)	Средняя степень миопии (Дптр)	Средний срок ношения/снятия МКЛ
PRK	24,7 ± 4,7	4,1 ± 1,2	6 ± 1,1 года / 14 дней
Trans PRK	27,6 ± 5,2	4,3 ± 0,9	6 ± 1,3 года / 14 дней
ReLex Smile	29,4 ± 7,2	4,4 ± 1,8	6 ± 1,5 года / 14 дней

Примечание. МКЛ — мягкие контактные линзы

Далее сопоставляли субфракционный состав СЖ в день эпителизации в группах PRK и Trans PRK (4-е сутки после операции) и через 7 дней после операции в группе ReLex Smile, то есть в разные сроки после операций. Для такого подхода необходимо пояснить, что эпителизация — это заживление раны на поверхности роговицы, то есть полное восстановление целостности эпителия роговицы после поверхностных вмешательств. По методике PRK и Trans PRK эпителизация происходит на 4-е сутки после операции. Этот срок является стандартным для наблюдения этих пациентов, так как необходимо оценить эффективность регенерации в послеоперационном периоде. Важно подчеркнуть, что у пациентов после операции по методу ReLex Smile эпителий остается неповрежденным, интактным, и в течение операции и, соответствен-

но, после нее (кроме зоны вреза — 3 мм). Поэтому пациенты приходят на осмотр на 7-й день после операции (что является стандартом наблюдения). Учитывая это обстоятельство, важно было сравнить состав СЖ в сроки, когда состояние роговицы в сравниваемых группах было сходным, то есть для операций PRK и Trans PRK это 4 суток, а для ReLex Smile — это 7 суток.

На рис. 3 видно, что в диапазоне средне- и высокомолекулярных частиц (400—1000 нм) для PRK, Trans PRK и ReLex Smile групп средние значения содержания частиц составили 3,1%, 6,0% и 1,8% соответственно. Однако достоверно значимых различий обнаружено не было. В диапазон частиц данного размера, как отмечалось выше, входят большие глико-липопротеиновые и иммунные комплексы.

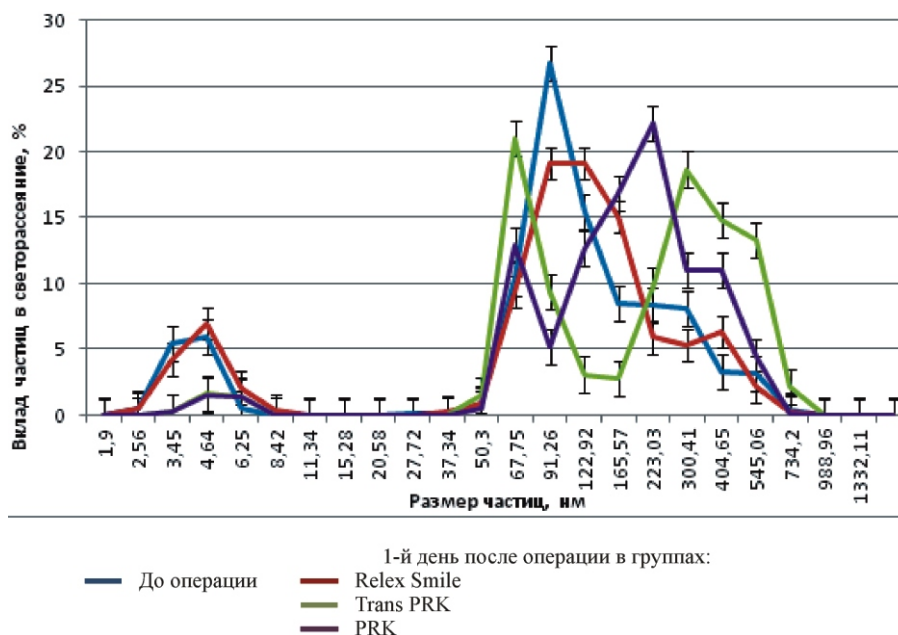


Рис. 1. Распределение частиц СЖ по размерам до операций и в первый день после вмешательства. Примечание: кривая голубого цвета — до операции Relex Smile, красная, зеленая и сиреневая — первый день после операции соответственно методами Relex Smile, Trans PRK и PRK. Здесь и далее: по оси ординат — вклад частиц соответствующего радиуса в светорассеяние частиц (%), по оси абсцисс — радиус частиц (нм).

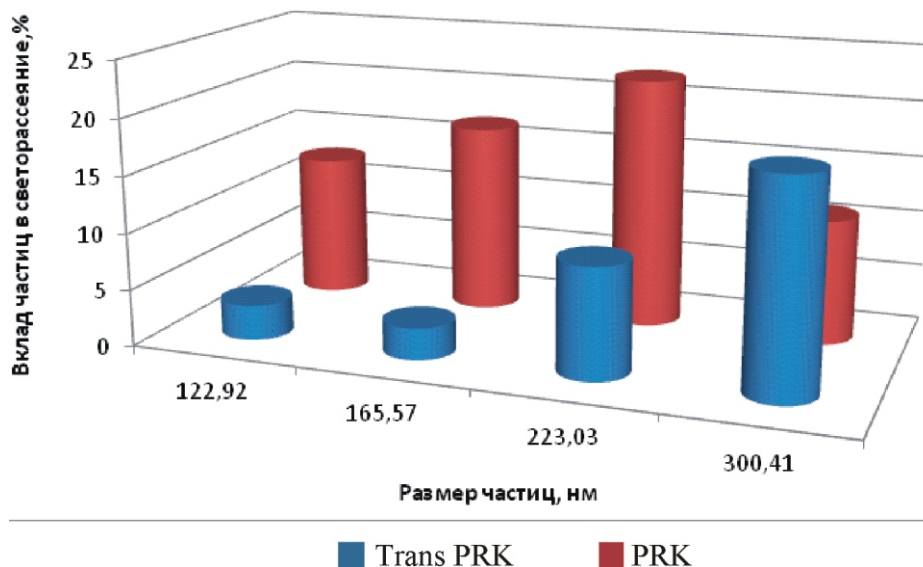


Рис. 2. Средние значения вклада частиц в светорассеяние в 1-й день после операции в группах соответственно Trans PRK (синий цвет) и PRK (красный цвет).

Через одну неделю после операции в группе, оперированной по методу ReLex Smile, в отличие от групп PRK и Trans PRK на 4-й день после операции (то есть, день эпителизации), общая картина спектра стала почти такой же, как перед операцией (рис. 4 и 5).

В диапазоне низкомолекулярных частиц наблюдались существенные различия между группами PRK, Trans PRK и ReLex Smile: средние значения составили 0,83%, 0,61% и 4,6% соответственно ($p < 0,05$). До операции доля низкомолекулярных частиц составляла в среднем 4,4%. Этот диапазон соответствует белковым ингредиентам, таким, как альбумины, глобулины, факторы роста и цитокины белковой природы. Этот факт свидетельствует о более вы-

раженной активности репаративных процессов в группе оперированных по методу ReLex Smile (рис. 6).

Обсуждение

Результаты анализа лазерно-корреляционных спектров, полученных в ходе исследования, показали, что у пациентов в первый день после операции во всех группах наблюдается тенденция к появлению глико-липпротеиновых фракций в составе СЖ. Предположительно, это явление связано с разрушением коллагеновых волокон и клеток стромы роговицы. Их фрагменты дают преобладание среднемолекулярных спектров (200–600 нм) в соста-

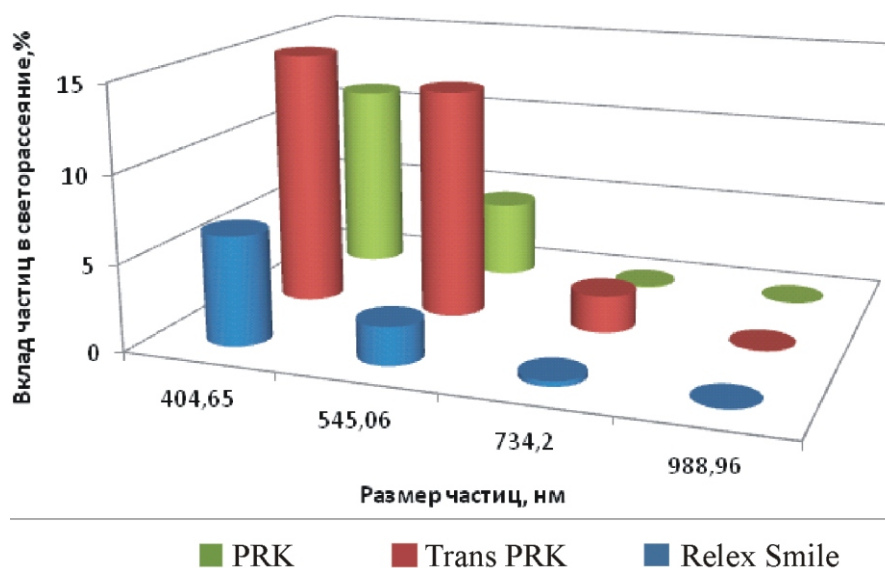


Рис. 3. Средние значения вклада частиц в светорассеяние в среднемoleкулярном и высокомолекулярном диапазонах на 4-й день после операции в группах PRK (зеленый цвет), Trans PRK (красный цвет) и через 1 неделю после операции ReLex Smile (синий цвет).

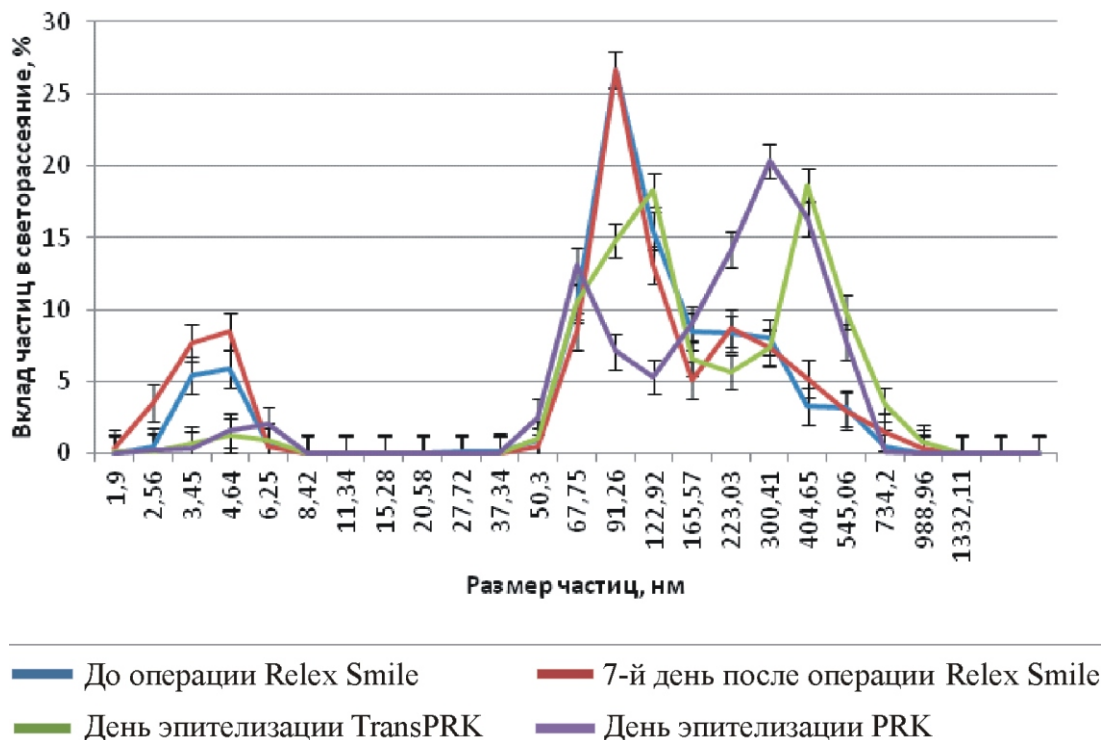


Рис. 4. Распределение частиц в СЖ по размерам до операций (синий цвет), на 4-й день для поверхностных операций в группе Trans PRK (зеленый цвет), PRK (фиолетовый) и через 7 дней после операции ReLex Smile (красный цвет).

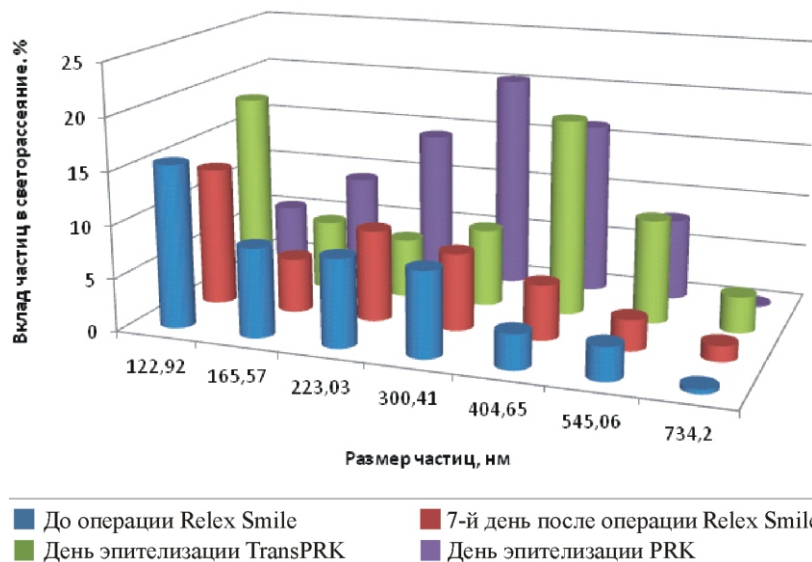


Рис. 5. Средние значения вклада частиц в светорассеяние в среднемoleкулярном диапазоне до операции (синий цвет), на 4-й день в группе Trans PRK (зеленый цвет), PRK (фиолетовый) и через 7 дней после операции ReLex Smile (красный цвет).

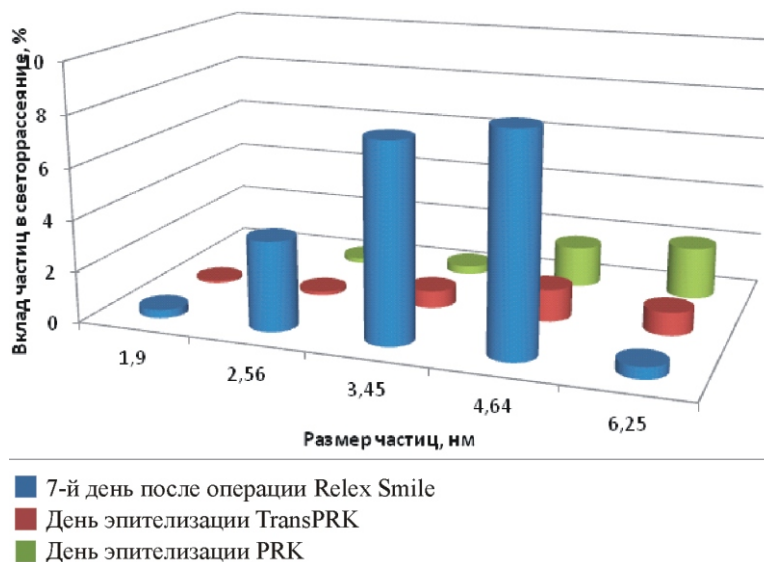


Рис. 6. Средние значения вклада низкомолекулярных частиц в светорассеяние на 4-й день в группах PRK (зеленый цвет) и Trans PRK (бордовый) и через 7 дней после операции ReLex Smile (синий цвет).

ве СЖ. Со статистически значимым различием ($p < 0,05$) было обнаружено увеличение процентного содержания частиц данной фракции в группе PRK по сравнению с Trans PRK. Для группы оперированных по методу ReLex Smile процентный вклад данных частиц в светорассеяние оказался самым низким. Через 1 неделю только в группе оперированных по методу ReLex Smile полученный спектр стал практически таким же, как перед операцией, что, вероятно, указывает, на быстрое восстановление роговицы после хирургического вмешательства. Также этот факт может быть обусловлен малым размером и быстрой герметизацией операционного разреза. В диапазоне низкомолекулярных белковых ингредиентов — альбуминов, глобулинов, цитокинов и факторов роста — в группе ReLex Smile процентное содержание частиц оказалось значительно выше, чем в группах PRK и Trans PRK, что может свидетельствовать о более быстром начале репаративных процессов.

Заключение

Исходя из результатов исследований, проведённых нами методом лазерной корреляционной спектроскопии, можно предположить, что операция по методу ReLex Smile с формированием интрастромальной линтикулы менее травматична по сравнению с другими исследованными методами лазерной коррекции зрения и является методом выбора для пациентов с любой степенью миопии при отсутствии противопоказаний.

Список литературы

1. Балашевич Л.И. *Рефракционная хирургия*. СПб; 2009. 296 с.
2. Shah R, Shah S, Sengupta S. Results of small incision lenticule extraction: All-in-one femtosecond laser refractive surgery. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37: 127-37.
3. Hjortdal JO, Vestergaard AH, Ivarsen A, et al. Predictors for the outcome of small-incision lenticule extraction for Myopia. *J Refract Surg*. 2012; 28: 865-71
4. Sekundo W, Kunert KS, Blum M. Small incision corneal refractive surgery using the small lenticule extraction (smile) procedure for the correction of myopia and myopic astigmatism: result of a 6 month prospective study. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95: 335-9
5. Neuhann T.F. First Experiences With SMILE. *Cataract and Refractive Surgery today Europe*. 2014; 5.
6. Mastorpassqua L., Nubile M. Preserving Corneal Neural Architecture. *Cataract and Refractive surgery today Europe*. 2014; 15.
7. Бажора Ю.И., Носкин Л.А. *Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине*. Одесса. Друк; 2002.
8. Arba M.S., Awwad S.T. Theoretical analyses of the refractive implications of transepithelial PRK ablations. *Br J Ophthalmol*. 2013; 97(7): 905-11.
9. Степанова М.А., Архипова Е.Н., Медведева Ю.С., Карганов М.Ю., Эскина Э.Н. Роль изменений субфракционного состава слезной жидкости в оценке повреждающего действия мягких контактных линз и эксимерлазерной абляции роговицы при коррекции аметропий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 1: 32-6.
10. Fadlallah A., Fahed D., Khalil K., Dunia I., Menassa J., El Rami H., Chlela E., Fahed S. Transepithelial photorefractive keratectomy: clinical results. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37(10): 1852-7.
11. Celik U., Bozkurt E., Celik B., Demirok A., Yilmaz O.F. Pain, wound healing and refractive comparison of mechanical and transepithelial debridement in photorefractive keratectomy for myopia: results of 1 year follow-up. *Cont Lens Anterior Eye*. 2014; 37(6): 420-6.
12. Eskina E.N., Riabenco O.I., Parshina V.A. Six-month outcomes in high myopia patients who underwent Trans-PRK treatments: Processing of the American Academy of Ophthalmology. Chicago; 2012. 225 p.

References

1. Balashevich L.I. *Refractive surgery*. SPb; 2009. 296 p. (in Russian)
2. Shah R., Shah S., Sengupta S. Results of small incision lenticule extraction: All-in-one femtosecond laser refractive surgery. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37: 127-37.
3. Hjortdal J.O., Vestergaard A.H., Ivarsen A. et al. Predictors for the outcome of small-incision lenticule extraction for Myopia. *J Refract Surg*. 2012; 28: 865-71
4. Sekundo W., Kunert K.S., Blum M. Small incision corneal refractive surgery using the small lenticule extraction (smile) procedure for the correction of myopia and myopic astigmatism: result of a 6 month prospective study. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95: 335-9
5. Neuhann T.F. First Experiences With SMILE. *Cataract & Refractive Surgery Today Europe*. 2014: 5.
6. Mastorpassqua L., Nubile M. Preserving Corneal Neural Architecture. *Cataract and Refractive surgery today Europe*. 2014: 15.
7. Bazhora Yu.I., Noskin L.A. *Laser correlation spectroscopy in medicine*. Odessa:Druk; 2002. (in Russian)
8. Arba M.S., Awwad S.T. Theoretical analyses of the refractive implications of transepithelial PRK ablations. *Br J Ophthalmol*. 2013; 97(7): 905-11.
9. Stepanova M.A., Arkhipova E.N., Medvedeva Y.S., Karganov M.Y., Eskina E.N. The role of changes in the subfractional compound of tear fluid in the assessment of damaging effect from soft contact lenses and the excimer laser ablation of the cornea. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2014; (1): 32-6 (in Russian)
10. Fadlallah A., Fahed D., Khalil K., Dunia I., Menassa J., El Rami H., Chlela E., Fahed S. Transepithelial photorefractive keratectomy: clinical results. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37(10): 1852-7.
11. Celik U., Bozkurt E., Celik B., Demirok A., Yilmaz O.F. Pain, wound healing and refractive comparison of mechanical and transepithelial debridement in photorefractive keratectomy for myopia: results of 1 year follow-up. *Cont Lens Anterior Eye*. 2014; 37(6): 420-6.
12. Eskina E.N., Riabenco O.I., Parshina V.A. *Six-month outcomes in high myopia patients who underwent Trans-PRK treatments; Processing of the American Academy of Ophthalmology*. Chicago; 2012. 225 p.

Сведения об авторах

Куклева Ольга Юрьевна (Kukleva O.Yu.), врач-ординатор клиники «Сфера», e-mail: olga.kukleva@sfe.ru

Яковенко Елена Николаевна (Yakovenko E.N.), канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: hippova@gmail.com

Степанова Мария Анатольевна (Stepanova M.A.), врач-офтальмолог клиники «Сфера», e-mail: m.stepanova@sfe.ru

Давтян Карина Кареновна (Davtyan K.K.), врач-офтальмолог клиники «Сфера», e-mail: karina.davtyan@sfe.ru

Карганов Михаил Юрьевич (Karganov M.Yu.) — доктор биол. наук, профессор, зав. лабораторией физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: mkarganov@mail.ru

Эскина Эрика Наумовна (Eskina E.N.) — доктор мед. наук, профессор кафедры офтальмологии ФГБОУ ДПО ИПК ФМБА России, главный врач клиники «Сфера», e-mail: erika.eskina@sfe.ru

©2017 г.
УДК 616.853:612.275

Экспериментальная модель ультразвуковой эпилепсии на крысах линии Крушинского-Молодкиной

Копаладзе Р.А.

Федеральное государственное научное учреждение «Институт общей патологии и патофизиологии».
Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская 8, e-mail: revazkop@mail.ru

Ранее было показано, что ультразвук частотой 24,3 кГц, силой 116 дБ вызывает у нелинейных белых крыс эпилептиформную реакцию. Однако у крыс случайной популяции эпилептические припадки в ответ на ультразвук возникают лишь в 6–13% случаев, что затрудняет использование метода на практике. **Цель исследования:** разработка экспериментальной модели ультразвуковой эпилептиформной реакции (УЭР) на крысах линии Крушинского–Молодкиной (КМ) и системы оценки антиконвульсантов на данной модели. **Метод.** Крыс линии КМ подвергали действию ультразвука и оценивали показатели УЭР по продолжительности латентных периодов двигательного возбуждения и судорожного припадка в секундах, а также по тяжести судорожного припадка в баллах. Для блокирования судорожной активности применяли антиконвульсант вальпроат натрия (100 мг/кг и 200 мг/кг, в/бр). **Результаты.** В ответ на действие ультразвука у крыс линии КМ возникает УЭР в 99% случаев. Предварительное введение вальпроата натрия в большинстве случаев предупреждало развитие судорожной активности на модели УЭР. **Заключение.** Экспериментальная модель ультразвуковой эпилепсии на крысах линии КМ может быть использована для исследования механизмов патогенного действия ультразвука на центральную нервную систему и испытания эффективности антиконвульсантов.

Ключевые слова: ультразвук, моделирование эпилепсии, крысы КМ, вальпроат натрия

Для корреспонденции: Копаладзе Реваз Александрович, канд. биол. наук, Федеральное государственное научное учреждение «Институт общей патологии и патофизиологии». Россия 125315 Москва. e-mail: revazkop@mail.ru

Для цитирования: Копаладзе Р.А. Экспериментальная модель ультразвуковой эпилепсии на крысах линии Крушинского–Молодкиной. Патогенез. 2017. 15 (1): 72–77.

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 22.12.2016

Ultrasonic experimental model of epilepsy in Krushinsky-Molodkina rats strain

Kopaladze R.A.

Federal State budgetary scientific institute «Scientific institute of General Pathology and Pathophysiology»;
Baltiyskaya str, 8, Moscow, 125315, Russian Federation

Previously it was shown that the ultrasound frequency is 24.3 kHz, the power 116 dB. causes of nonlinear white rats epileptiform reaction. However, the rats random population of epileptic seizures in response to the ultrasound occur only in 6–13% of cases, which complicates the use of the method in practice. **The purpose of the study:** development of experimental model of the ultrasonic epileptiform reaction (UER) in Krushinsky–Molodkina (KM) rats strain and system of evaluation of anticonvulsants on them. **Methods.** Rats of KM strain was subjected to the action of ultrasound and the anticonvulsant sodium valproate was injected to rats intraperitoneally. The parameters of the UER was assessed by the duration of the latent period of motor excitation and convulsive seizure in seconds and severity of convulsive seizure in points. **Results.** In response to the action of ultrasound in rats of KM strain occurs UER in 99% of cases. On the model of UER confirmed the protective effect of sodium valproate. **Conclusion.** Ultrasonic experimental model of epilepsy in rats of KM strain can be used to study the mechanisms of pathogenic action of ultrasound on the Central nervous system and the trials of anticonvulsants.

Keywords: ultrasound, modeling of epilepsy, rats of KM strain, valproate sodium.

For correspondence: Revaz A. Kopaladze FSBSI «Institute of general pathology and pathophysiology», Moscow, Russia, e-mail: revazkop@mail.ru

For citation: Kopaladze R.A. Ultrasonic experimental model of epilepsy in Krushinsky–Molodkina rats strain. Patologogenesis. 2017. 15(1): 72–77 (in Russian)

Conflict of interest – the authors declare that there is not potential conflict of interest

Funding. The study had no sponsorship.

Received 22.12.2016

Ультразвуковая техника начала развиваться во время Первой мировой войны. Именно тогда, в 1914 году, испытывая в большом лабораторном аквариуме новый ультразвуковой излучатель, французский физик Поль Ланжевен (Paul Langevin. 1872—1946) обнаружил, что рыбы под действием ультразвука возбуждались. В конце 20-х годов прошлого века сделаны первые попытки использовать ультразвук в медицине. Создание быстродействующих электронных импульсных систем в период Второй мировой войны стимулировало развитие ультразвуковой диагностики [1, 2]. В настоящее время ультразвук находит широкое применение в медицине, главным образом, для диагностики и лечения заболеваний человека. Однако в экспериментах для моделирования патологических состояний этот метод используется сравнительно редко.

Известно, что ультразвук частотой 22—25 кГц издаётся животными разных видов для общения между собой в условиях опасности, в схватках и при болевых воздействиях. Сигналы ультразвука высокой частоты издают крысята, изолированные от матери [3]. Установлено, что нахождение самцов крыс линии Wistar в течение 21 суток под воздействием ультразвуковых сигналов небольшой силы вызывает стресс с формированием у них состояний, схожих с симптомами депрессии [4]. Регистрация ультразвуковых сигналов у грызунов позволяет изучать социально-эмоциональные коммуникации, что актуально для моделирования неврологических расстройств, а также таких психических заболеваний, как аутизм и шизофрения [5].

Ранее нами было показано, что действие ультразвука частотой 24 кГц и силой 116 дБ вызывает эпилептиформную реакцию у нелинейных крыс. Этот тип реакции именуется нами ультразвуковой эпилептиформной реакцией (УЭР) [6]. Однако у крыс случайной популяции УЭР возникает лишь в 6—13% случаев, что затрудняет использование метода на практике.

В настоящее время в научных исследованиях широкое применение находят крысы линии Крушинского—Молодкиной (КМ), генетически предрасположенные к эпилептиформным припадкам. Эпилептиформную реакцию у крыс КМ, как правило, вызывают электрическим звонком частотой ниже 20 кГц, силой 120 дБ, т.е. в слышимом для человеческого уха диапазоне. При этом используется специальная прозрачная звуконепроницаемая камера (размером 42 x 26 x 50 см) из плексигласа с двойными стенками и смонтированным в потолок электрическим звонком. Рядом с камерой размещается трансформатор для регулирования силы звонка. Все это усложняет использование отечественной линии крыс КМ в научных институтах, создает трудности при выездных работах.

По мнению некоторых авторов, у крыс линии КМ и их аналогов спонтанные судороги наблюдается крайне редко, но по нашим наблюдениям эпилептические судороги часто имеют место во время драки животных между собой в клетках. Можно полагать, что причиной возникновения припадка в указанных ситуациях является ультразвук, издаваемый животными при эмоциональных состояниях.

Цель работы — разработать на крысах КМ экспериментальную модель УЭР с помощью ультразвукового воздействия (24 кГц), охарактеризовать параметры поведения всех фаз УЭР, разработать систему оценки тяжести припадка и эффективности антиконвульсантов на примере вальпроата натрия.

Опыты проводились на крысах линии Крушинского—Молодкиной (КМ), генетически предрасположенных к эпилепсии. Крыс содержали в стандартных условиях. Брикетированный корм и питье животные получали *ad libitum*. В опытах были использованы крысы обоих полов весом 200—230 г. Метод состоял в следующем: крысу КМ помещали в пластмассовый бачок высотой 46 см и диаметром нижней и верхней частей 32 и 36 см соответственно. Бачок закрывали сверху металлической сеткой и направляли «луч» сигнала на крысу вертикально с расстояния одного метра. Сигнал отключали в момент наступления судорожного припадка, но если припадок не наступал, то действие ультразвука продолжали до 100 секунд. Для генерации ультразвуковых волн использовали карманный ультразвуковой излучатель Dazer II (США, частота излучения раздражителя 24,3 кГц, сила звука 116 дБ). Использовали батарейки типа крона 9V. Напряжение батарейки контролировали с помощью мультитестера Defort DMM-600N.

Вальпроат натрия (Конвулекс в ампулах, Convulex, «Gerot Pharmazeutika GmbH») вводили крысам внутривенно в дозе 100 мг/кг и 200 мг/кг за 1 час до воздействия. Инъекцию производили в брюшную полость слева от средней линии, в нижний левый квадрат. Определяли параметры УЭР: латентный период двигательного возбуждения (ЛПДВ) и латентный период наступления судорог (ЛПСР) в секундах. Тяжесть судорожного припадка (ТСР) в баллах определяли по методике Крушинского [7], модифицированной в работах [6, 8]. Параметры УЭР регистрировали за 48 часов до постановки опыта (фон) и через 1 час, 24, 48, 72, 96 ч после введения вальпроата.

Все процедуры и эксперименты на животных проводились в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными Приказом Минздрава СССР № 755 от 12.03.1977 г., а также с Приказом Минздрава РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Результаты и обсуждение

Было установлено, что в результате воздействия ультразвука с указанными параметрами у крыс КМ в 99% случаев возникали судороги, что открывает возможность использования ультразвука у таких крыс для моделирования УЭР. Картина УЭР имеет сходство с таковой при звуковой эпилепсии, вызываемой слышимым для человека звуком частотой 20 кГц и силой 90—120 дБ (обычный сильный электрический звонок). Следует отметить, что низкие частоты звука (3—4 кГц) вызывают реакцию возбуждения у очень незначительного числа крыс [7]. Эффективность воздействия звука повышается с увеличением его частоты до 24 кГц и более, т.е. частоты, лежащие за пределами слышимости человеческом, но в слышимом животными диапазоне. В данной работе описаны и проанализированы различные фазы эпилептиформной реакции у крыс КМ в ответ на действие ультразвука. Можно полагать, что ультразвук через слуховой проход, так же как и обычный звук, воздействует на слуховой аппарат и продолговатый мозг животных. Это приводит к расстройству электрической активности мозга и возникновению

УЭР у крыс КМ. В связи с этим представляют интерес работы по установлению механизмов преобразования колебаний звуковых волн в электрические импульсы, передающиеся в центральную нервную систему [9].

Латентный период двигательного возбуждения (ЛПДВ). В ответ на действие ультразвука у крыс возникает резкое двигательное возбуждение (ДВ), но не сразу, а через некоторое время, при котором крыса остается еще спокойной. Этот период от включения ультразвука до возникновения ДВ именуется латентным периодом двигательного возбуждения — ЛПДВ. Минимальная продолжительность ЛПДВ равна 1 с, а максимальная — не более 100 с. Если ДВ возникала в период до 100 с, но без припадка, то значение ЛПДВ оценивается в секундах, а тяжесть судорожного припадка — в 1 балл. В случаях, когда в течение 100 с признаков возбуждения не наблюдалось, отсутствие активности оценивали в «0» баллов, а в таблице отсутствие ДВ обозначали словами «нет реакции». ЛПДВ отражает уровень возбудимости мозга — чем короче время наступления ДВ от момента включения ультразвука, тем выше возбудимость нейронов мозга, вовлекаемых в патологическую реакцию, и наоборот.

Двигательное возбуждение (ДВ). Следует отметить, что ДВ, предшествующее судорожному припадку, обычно называется «клоническим бегом» (wild running clonus). Считают, что феномен ДВ отражает распространение возбуждения на отделы мозга, ответственные за локомоторные реакции [10]. Двигательное возбуждение, предшествующее судорожному припадку, протекает по типу одно- или двухфазного возбуждения. В случае однофазной реакции, обычно через 1—6-секундный латентный период, начинается интенсивное ДВ, которое протекает непрерывно и завершается судорожным припадком. В случае двухфазной реакции через несколько секунд (2—5 с) двигательное возбуждение внезапно прекращается, наступает фаза торможения, в течение которой животное неподвижно застывает на месте. После 1—20-секундной фазы торможения, в условиях непрерывного действия ультразвука, возникает вторая фаза ДВ, которая заканчивается судорожным приступом.

Тормозная пауза. Наличие тормозной паузы между двумя фазами возбуждения при УЭР указывает на эффективную работу тормозного механизма мозга против патогенного действия ультразвука. Продолжающееся действие звукового раздражителя приводит к значительному напряжению тормозного процесса и затем к его истощению. По продолжительности тормозной паузы между двумя фазами ДВ можно судить об уровне возбудимости — чем длиннее тормозная пауза в секундах, тем ниже возбудимость нейронов мозга.

Инерция возбуждения. У крыс с 1-фазным двигательным возбуждением (ДВ), имеет место явно выраженная инерция нервных процессов, проявляющаяся в том, что если ультразвук отключить в момент начала ДВ, то всё равно в большинстве случаев реакция доходит до конца и завершается судорожным припадком. Такая инерция для крыс с двухфазным ДВ носит иной характер. Если звук отключить после первой фазы ДВ, в начале тормозной паузы, то УЭР в большинстве случаев прекращается, но если звук отключить в начале второй фазы возбуждения на фоне истощившегося тормозного процесса, то реакция УЭР продолжается и завершается судорожным припадком.

Латентный период судорожного припадка ЛПСП. Латентный период судорожного припадка определяется как время в секундах с момента включения звукового раздражителя до наступления судорожного припадка. Латентный период судорожного припадка характеризует возбудимость нервной системы животного: чем короче время начала судорожного припадка в секундах, тем выше возбудимость нейронов мозга, вовлекаемых в патологическую реакцию, и наоборот.

Инерция фаз судорожного припадка. Максимальная тяжесть припадка, оценивавшаяся 9 баллами, нередко наступает не сразу, а только после проявления всех фаз судорожного припадка.

Тяжесть судорожного припадка в баллах (ТСП). Фаза судорожных припадков проявляется в виде 4 форм — I, II, III, IV. В случае 1-фазного ДВ каждой форме судорожного припадка присваивали одно из нечетных чисел баллов — 3, 5, 7 или 9. В случае 2-фазного ДВ тяжесть припадка

Таблица 1

Система оценки тяжести судорожного припадка в баллах

Формы припадков и их описание	Рисунки, показывающие состояние крыс во время припадка	1 или 2 фазы ДВ	ТСП (баллы)
I ДВ с последующим падением животного на брюшко с генерализованным клоническим подергиванием всех конечностей.		2 1	2 3
II ДВ с последующим падением животного на бок, с тоническим сгибанием шеи, туловища и передних конечностей, клоническим подергиванием задних конечностей.		2 1	4 5
III Эта форма похожа на форму II, но отличается неполным тоническим напряжением задних конечностей.		2 1	6 7
IV Эта форма похожа на формы II и III, но отличается полным тоническим напряжением всех конечностей; остановка дыхания на несколько секунд.		2 1	8 9

Примечание. ДВ — двигательное возбуждение, ТСП — тяжесть судорожных припадков в баллах

оценивали на один балл меньше, то есть каждой форме соответствовали четные числа — 2, 4, 6 или 8 баллов.

При определении тяжести припадка в баллах сначала визуально определяли форму припадка (I, II, III, IV), а затем — соответствующее этим формам число баллов. При

этом помимо формы припадка, учитывали и количество фаз ДВ (2 или 1), предшествующих припадку. Как уже отмечали, тяжесть судорожного припадка при двухфазном ДВ определяется на один балл меньше по сравнению с тяжестью припадка с однофазным ДВ. Отсутствие ДВ и

Таблица 2

Влияние вальпроата натрия (200 мг/кг) на параметры УЭР

Крыса	УЭР за 48 ч до введения вальпроата			УЭР через 1 ч после введения вальпроата			УЭР через 24 ч после введения вальпроата		
	№	ЛПДВ	ЛПСР	ТСП	ЛПДВ	ЛПСР	ТСП	ЛПДВ	ЛПСР
	Секунды		Баллы	Секунды		Баллы	Секунды		Баллы
1	2	6	9	2	9	9	—	—	—
2	2	5	9	6	12	9	—	—	—
3	0.9	3	9	5-11	100	1	2	8	9
4	1	2	9	10-17	100	1	5	8	9
5	1	5	9	Нет реакции			3	4	9
6	1	12	7	Нет реакции			12	15	7
7	6	9	9	Нет реакции			12	15	7
8	5	10	9	Нет реакции			13	20	9
9	5	7	9	Нет реакции			9	13	9
10	14	17	9	Нет реакции			12	18	7
11	15	17	9	Нет реакции			26	31	7
12	11	14	9	Нет реакции			Нет реакции		
13	9	11	9	Нет реакции			Нет реакции		
14	2	5	9	Нет реакции			Нет реакции		
15	19	23	9	Нет реакции			Нет реакции		
16	15	19	9	Нет реакции			Нет реакции		
17	0.9	3	9	Нет реакции			Нет реакции		
18	2	5	9	Нет реакции			Нет реакции		
19	26	33	9	Нет реакции			Нет реакции		
20	2	5	9	Нет реакции			Нет реакции		
21	6	9	9	Нет реакции			Нет реакции		
Реакция на ультразвук через 48–96 ч после введения вальпроата									
	УЭР через 48 ч			УЭР через 72 ч			УЭР через 96 ч		
12	28	29	9	—	—	—	—	-	-
13	8	10	9	—	—	—	—	-	-
14	1	4	9	—	—	—	—	-	-
15	Нет реакции			20	23	5	—	—	—
16	Нет реакции			10	15	9	—	—	—
17	Нет реакции			23	35	7	—	—	—
18	Нет реакции			Нет реакции			9	12	7
19	Нет реакции			Нет реакции			Нет реакции		
20	Нет реакции			Нет реакции			Нет реакции		
21	Нет реакции			Нет реакции			Нет реакции		

Примечание. ЛПДВ — латентный период двигательного возбуждения (ДВ), ЛПСР — латентный период наступления судорог в секундах, ТСП — тяжесть судорожного припадка в баллах. «Нет реакции» — отсутствие ДВ и судорог.

припадков в течение 100 с оценивается как «0» баллов (в табл. 1 обозначено «нет реакции»), а ДВ без судорожного припадка в течение 100 с действия ультразвука оценивается в 1 балл.

Постиктальный период. После судорожного припадка наступает постиктальный период. В этот период наблюдаются состояния агрессии или кататонического ступора. У крыс с припадком низкой тяжести нередко наблюдается состояние агрессии, которое сохранялось и после выключения ультразвука. Издавая характерный писк, животное мечется по камере. Если крысу в таком состоянии взять в руки, она кусается. Состояние агрессии никогда не наблюдается, если у крысы было только одно двигательное возбуждение без судорожного припадка. У крыс с высокой тяжестью судорожного припадка состояние агрессии не наблюдается. Кататонический ступор — это другое постиктальное состояние, при котором часто наблюдается задержка дыхания. Такое состояние представляет смертельную опасность для животного, так как вдох очень затруднен и его осуществление сопровождается сильным хрипом.

Использование УЭР для оценки противосудорожного эффекта вальпроата натрия. В настоящее время в лечении эпилепсии важное место занимают вальпроаты, которые при монотерапии эффективны в 75—85% случаев. Вальпроевая кислота и ее соли (вальпроаты), попадая в организм, активируют ГАМКергическое торможение в нейронах, тормозят возбудительные синапсы и мембранные кальциевые токи, стабилизируя мембрану нейронов. Вальпроаты эффективны при всех типах припадков [11, 12]. Эта универсальность привела к тому, что с момента обнаружения противосудорожного действия вальпроатов (30 лет тому назад), они постепенно превратились в основной противосудорожный препарат, используемый для лечения эпилепсии у 75—95% пациентов [13, 14].

Цель данного эксперимента заключалась в том, чтобы проверить пригодность экспериментальной модели УЭР для испытания антиконвульсантов на примере вальпроата натрия и изучить продолжительность его противосудорожного действия. Вальпроат был использован в двух дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг.

Влияние вальпроата натрия в дозе 100 мг/кг на УЭР. В опытах на 9 крысах показали, что вальпроат в дозе 100 мг/кг оказывает на животных неоднозначное влияние. Так, у 4 крыс наблюдался мощный противосудорожный эффект, тогда как у других крыс (5 крыс) параметры УЭР существенно не различались до и после введения препарата. Было принято решение использовать вальпроат в более высоких дозах — 200 мг на кг веса.

Влияние вальпроата натрия в дозе 200 мг/кг на УЭР. Оценивали УЭР у крыс по тем же параметрам: ЛПДВ, ЛПСР и ТСП (тяжесть судорожного припадка в баллах). Оценивали показатели УЭР за 48 часов до введения и через 1, 24, 48, 72, 96 ч после введения вальпроата. В табл. 1, где представлены результаты экспериментов до и после введения вальпроата натрия, характеристики двигательной активности крыс представлены в порядке нарастания протекторного эффекта препарата.

В опытах использовали 21 крысу с 1-фазной реакцией возбуждения и стабильными судорожными припадками около 9 баллов. Из представленных в табл. 2 данных видно, что у крыс за 48 часов до введения вальпроата ЛПДВ и ЛПСР варьировали в довольно широком диапазоне, тог-

да как тяжесть судорожных припадков носила стандартный характер — 9 баллов. После введения вальпроата лишь у 2 крыс через 1 час после введения вальпроата протекторный эффект обнаружен не был, тогда как у остальных 19 крыс наблюдался явно выраженный протекторный эффект.

Из приведенных в табл. 1 данных следует, что вальпроат в дозе 200 мг/кг в 90% случаев полностью предупреждает развитие судорожной активности у крыс КМ. Так, у 17 крыс через 1 ч после введения вальпроата ультразвук в течение 100 секунд вообще не вызывал ДВ, что обозначено словами «нет реакции», а у 2 крыс через 1 час после введения вальпроата в ответ на ультразвук наблюдалось лишь кратковременное ДВ без припадка (1 балл). Далее тестирование крыс ультразвуком производили через каждые 24 часа. Через 24 часа после введения вальпроата у 9 крыс реакция УЭР восстанавливалась до уровня контроля, а у остальных 10 крыс полностью сохранялось защитное действие препарата. В более поздние сроки после введения вальпроата, как видно из табл. 2, противосудорожное действие вальпроата ослабевало или полностью отсутствовало.

Таким образом, на модели УЭР вальпроат натрия в дозе 200 мг/кг оказывал мощное противосудорожное действие, которое сохранялось в течение 4 суток.

Заключение

Модель эпилептиформной реакции, вызванной у крыс КМ с помощью ультразвукового воздействия, воспроизводится в эксперименте в 99% случаев и поэтому перспективна для изучения патогенетических механизмов эпилепсии и ее лекарственной коррекции. Разумеется, для моделирования УЭР могут быть использованы и другие линии крыс, генетически предрасположенные к эпилепсии. Важно отметить, что в настоящее время следование биоэтическим принципам экспериментирования на животных приобретает особую актуальность. Важнейшим принципом этики биомедицинского эксперимента является уменьшение продолжительности боли, стресса и дискомфорта у подопытных животных [15]. В настоящее время большое применение в научных исследованиях и фармакологии находит экспериментальная модель эпилепсии, вызванная введением в организм животного пентилентетразола [16, 17, 18]. В таких случаях судорожное состояние животных после введения эпилептогенного агента длится 30 минут и более. Предлагаемая модель УЭР отличается тем, что судорожная реакция на действие ультразвука длится лишь 2—10 с. В случаях, если же крыса не реагирует, то действие ультразвука продолжали не дольше 100 с. В этот период животные обычно спокойны и не обнаруживают очевидных признаков страдания, тем не менее, нередко наблюдаются симптомы возбуждения: экзофтальм, вибрация вибрисс, отдельные круговые повороты или полуобороты; активное «умывание» или облизывание шерсти. Последний симптом, как считал Л.В. Крушинский, является своеобразной сублимацией патологического возбуждения. Появление его является довольно надежным критерием того, что двигательное возбуждение в ответ на применяемое раздражение не разовьется [7]. Достоинство экспериментальной модели УЭР на генетически однородных животных заключается и в том, что, можно вызвать судорожный, эпилептиформный припадок, весьма сходный по внешним

проявлениям с эпилепсией у человека, причем без введения животным фармакологических препаратов, без применения чрезмерно сильных раздражений, например, электрического тока, и без нарушения целостности нервной системы. При этом надежные результаты могут быть получены на минимальном количестве животных. Экспериментальные модели УЭР на крысах линии КМ могут использоваться не только в эпилептологии, но и в других направлениях экспериментальной патологии, экологической медицины, фармакологии.

References

1. Акопян В.Б., Ершов Ю.А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами. Изд. МГТУ имени Н.Э. Баумана. 2005. 224 с.
Akopyan V.B., Ershov Yu.A. Basics of ultrasound interaction with biological objects. Izd. MGTU imeni N.E. Bauman. 2005. 224 c.
2. Шукин С.И. Ультразвук в медицине, ветеринарии и биологии. Серия Университеты России. 2016. 223с.
Schukin S.I. Ultrasound in medicine, veterinary and biology Seria University Rossii. 2016. 223c.
3. Takahashi N., Kashino M., Hironaka N. Structure of Rat Ultrasonic Vocalizations and Its Relevance to Behavior. *PLoS ONE*. 2010. 5 (Issue 11):1-6
4. Морозова А.Ю., Зубков Е.А., Сторожева З.И., Кекелидзе З.И., Чехонин В.П. Влияние излучения ультразвукового диапазона на формирование симптомов депрессии и тревожности у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2012, (12), 705-708.
Morozova A.Yu., Zubkov E.A., Storozheva Z.I., Kekelidze Z., Chekhonin V.P. Effect radiation of the ultrasonic range to the formation of symptoms of depression and anxiety in rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012, (12):156-160.
5. Wöhr M, Schwarting RK. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res*. 2013 Oct;354(1):81-97.
6. Копаладзе Р.А. Система оценки тяжести припадка индуцируемое ультразвуком у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013 (3):87-92.
Kopaladze R.A. The system of assessment of the severity of ultrasound epilepsy in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Experimental Terapiya*. 2013 (3):87-92.
7. Крушинский Л.В. *Формирование поведения животных в норме и патологии*. Москва. Издательство МГУ. 1960. 264с.
Krushinsky L.V. *The formation of animal behavior in norm and pathology [Formirovanie povedeniya zhivotnykh v norme i patologii]*. Moskva.: Izdatel'stvo Moskovskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 1960. 264 p. (in Russian).
8. Tacke U. *Audiogenic seizures in rats — an experimental study of a genetic model of Epilepsy*. Diss. Department of Pharmacology and Toxicology University of Kuopio; 1984. 134p.
9. Xiong W, Grillet N., Elledge H.M., Wagner Th.F.J., Zhao B., Johnson K.R., Kazmierczak P, Muller U. TMHS Is an Integral Component of the Mechanotransduction Machinery of Cochlear Hair Cells. *Cell*. 2012; 151 (6): 1283
10. Fehr C., Shirley R.L., Metten P., Kosobur A.E.K., Belknap J.K. Crabbe J.C., Buck K.J. Potential pleiotropic effects of Mpdz on vulnerability to seizures. *Genes, Brain, Behavior*, 2004, 3. (1): 8-19
11. Franceschetti S., Hamon B., Heineman U. The action of valproate on spontaneous epileptiform activity in the absence of synaptic transmission and on evoked changes in [Ca⁺⁺] and [K⁺] in the hippocampal slice. *Brain res*. 1986, 386:1-11.
12. Fariello R., Smith M.C. Valproate: mechanisms of action. In: Levy R, Mattson R., Meldrum B., Penry J.K., Dreifuss F.E., eds. *Antiepileptic drugs*. 3-rd ed. New York, NY: Raven Press; 1989:567-75.
13. Bergmann A., Schmidt D., Hutt H.J., Elger C.E. Epilepsy treatment with a sustained-release formulation of valproate — experience with 1172 patients. *Actuelle Neurologie*, 1999, 26: 1-5.
14. Зенков Л.Р., Яхно Н.Н., Усачева Е.Л. Депакин хроно в лечении эпилепсии, резистентной к другим препаратам. *Неврологический журнал*. 2000. 5 (4):39-42.
Zenkov L.R., Yachno N.N., Usacheva E.L. Depakine Chrono in the treatment of epilepsy resistant to other drugs. *Nevrologicheski zhurnal*. 2000. 5 (4):39-42. (in Russian).
15. *Russel W.M.S. & Burch R.L. The Principles of Human Experimental Technique*, 1959. 238 pp.
16. Ким К.Х., Зайцев А.В., Лаврентьева В.В., Жабко Е.П., Ватаев С.И., Лукомская Н.Я., Магазаник Л.Г. Влияние блокаторов ионотропных и глутаматных рецепторов на вызванные пентилентетразолом судорог у крыс Крушинского-Молодкиной. *Российский физиологический журнал*. 2012. 98 (12):1520-1529
Kim K.Kh, Zaitsev A.V., Lavrentieva V.V., Zhabko E.P., Vataev S.I., Lukomskaya N.Ya., Magazanik L.G. The effect of ionotropic glutamate receptor antagonist on pentilentetrazole-induced seizures in Krushinsky-Molodkina rats. *Russian journal of physiology*. 2012. 98 (12):1520-1529
17. Losher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drug. *Seizure*. 2011. 20 (5):359-368.
18. Corda M.G., Orlandi M., Lacca D., Giorgi O. Decrease in GABAergic function induced by pentilentetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. *J. Pharmac. Exp. Ther*. 1992. 262 (2):792-800.

Сведения об авторе

Копаладзе Реваз Александрович, канд. биол. наук, Федеральное государственное научное учреждение «Институт общей патологии и патофизиологии». Россия 125315 Москва. e-mail: revazkor@mail.ru

Правила для авторов

К публикации принимаются ранее не опубликованные работы по профилю журнала: теоретические и обзорные статьи, результаты завершённых оригинальных исследований, краткие сообщения, описания клинических случаев, рецензии на книги, комментарии читателей к ранее опубликованным статьям и письма к редактору, информация о научных мероприятиях. Не принимаются к печати статьи, представляющие собой отдельные этапы незавершённых исследований, а также статьи, посвящённые исследованиям, выполненным с нарушением этических норм и правил и норм гуманного обращения с биообъектами. Решение о публикации принимается редколлегией журнала после рецензирования рукописи с учётом научной значимости и актуальности представленных материалов. При рассмотрении полученных авторских материалов редакционная коллегия руководствуется «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» (www.ICMJE.org). Статьи, отклонённые редакционной коллегией, повторно не принимаются и не рассматриваются.

Статья должна быть написана на русском или английском языке, представлена в одном печатном экземпляре в формате любой версии текстового редактора Microsoft Word for Windows и прислана в электронном виде на e-mail редакции. Статья должна сопровождаться направлением (сопроводительным письмом) от учреждения, где была выполнена научная работа.

1. Рукопись. Направляется в редакцию в электронном варианте на адрес biopharm@list.ru. Загружаемый в систему файл со статьёй должен быть представлен в формате Microsoft Word (иметь расширение *.doc, *.docx, *.rtf).

1. Рекомендуемый объём полного текста рукописи (оригинальные исследования, лекции, обзоры), в том числе таблицы и список литературы, не должен превышать 6000 слов. Объём статей, посвящённых описанию клинических случаев, не более 4000 слов; краткие сообщения и письма в редакцию — в пределах 1500 слов. Количество слов в тексте можно узнать через меню Word («Файл» — «Просмотреть свойства документа» — «Статистика»). Если превышение рекомендованного объёма статьи, по мнению автора, оправдано, и текст не может быть уменьшен, решение о публикации принимается на заседании редколлегии по рекомендации рецензента.

2. Формат текста рукописи. Текст должен быть напечатан шрифтом Times New Roman, иметь размер 12 pt и межстрочный интервал 1,0 pt. Отступы с каждой стороны страницы 2 см. Выделения в тексте можно проводить ТОЛЬКО курсивом или полужирным начертанием букв, но НЕ подчеркиванием. Из текста необходимо удалить все повторяющиеся пробелы и лишние разрывы строк (в автоматическом режиме через сервис Microsoft Word «найти и заменить»).

3. Файл с текстом статьи, загружаемый в форму для подачи рукописей, должен содержать всю информацию для публикации (в том числе рисунки и таблицы). Структура рукописи должна соответствовать шаблону:

Русскоязычная аннотация

Название статьи.

Авторы статьи. При написании авторов статьи фамилию следует указывать до инициалов имени и отчества (Иванов П.С., Петров С.И., Сидоров И.П.)

Название учреждения. Необходимо привести официальное ПОЛНОЕ название учреждения (без сокращений) и адрес электронной почты для контактов с авторами. Если в написании рукописи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо соотнести названия учреждений и ФИО авторов путем добавления цифровых индексов в верхнем регистре перед названиями учреждений и фамилиями соответствующих авторов.

Резюме статьи должно быть (если работа оригинальная) структурированным: актуальность, цель, материалы и методы, результаты, выводы. Резюме должно полностью соответствовать содержанию работы. Объём текста резюме должен быть в пределах 100–300 слов.

Ключевые слова. Необходимо указать ключевые слова — от 3 до 10, способствующих индексированию статьи в поисковых системах. Ключевые слова должны попарно соответствовать на русском и английском языках.

Англоязычная аннотация

Article title. Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию;

Author names. ФИО необходимо писать в соответствии с заграничным паспортом, или так же, как в ранее опубликованных в зарубежных журналах статьях. Авторам, публикующимся впервые и не имеющим заграничного паспорта, следует воспользоваться стандартом транслитерации BGN/PCGN (см. ниже);

Affiliation. Необходимо указывать ОФИЦИАЛЬНОЕ АНГЛОЯЗЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ и адрес электронной почты для контактов с авторами. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ eLibrary.ru;

Abstract. Англоязычная версия резюме статьи должна по смыслу и структуре полностью соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка;

Key words. Для выбора ключевых слов на английском следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США — Medical Subject Headings (MeSH).

Полный текст (на русском, английском или обоих языках) должен быть структурированным по разделам. Структура полного текста рукописи, посвящённой описанию результатов оригинальных исследований, должна соответствовать общепринятому шаблону и содержать разделы: введение (актуальность), цель и задачи, материалы и методы (пациенты и методы), результаты, выводы, обсуждение (дискуссия).

Дополнительная информация (на русском, английском или обоих языках)

Информация о конфликте интересов. Авторы должны раскрыть потенциальные и явные конфликты интересов,

связанные с рукописью. Конфликтом интересов может считаться любая ситуация (финансовые отношения, служба или работа в учреждениях, имеющих финансовый или политический интерес к публикуемым материалам, должностные обязанности и др.), способная повлиять на автора рукописи и привести к сокрытию, искажению данных, или изменить их трактовку. Наличие конфликта интересов у одного или нескольких авторов не является поводом для отказа в публикации статьи. Выявленное редакцией сокрытие потенциальных и явных конфликтов интересов со стороны авторов может стать причиной отказа в рассмотрении и публикации рукописи.

Информация о спонсорстве. Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется.

Благодарности. Авторы могут выразить благодарности людям и организациям, способствовавшим публикации статьи в журнале, но не являющимся её авторами.

Список литературы. В библиографии (пристатейном списке литературы) каждый источник следует помещать с **новой** строки под порядковым номером.

В списке все работы перечисляются в порядке цитирования, а НЕ в алфавитном порядке.

Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях и лекциях допускается до 20, в обзорах — до 60 источников;

В тексте статьи ссылки на источники приводятся в квадратных скобках арабскими цифрами.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены ВСЕ АВТОРЫ. В случае, если у публикации более 4 авторов, то после 3-го автора необходимо поставить сокращение «и др.» или «et al.». Недопустимо сокращать название статьи. Название англоязычных журналов следует приводить в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя.

Формат пристатейных списков литературы должен соответствовать требованиям и стандартам MedLine (U.S. National Information Standards Organization NISO Z39.29-2005 [R2010]), что обеспечит в дальнейшем индексирование статьи в международных базах данных (см. раздел «Оформление библиографии»). При ссылке на журнальные статьи (наиболее частый источник информации для цитирования) следует придерживаться шаблона:

Автор АА, Соавтор ББ. Название статьи. Название журнала. Год;Том(Номер):стр.-стр.

Следует обратить внимание на то, что после инициал авторов не следует ставить точки. Название статьи и журнала не следует разделять знаком «//». Для описания даты выхода, тома, номера журнала и страниц, на которых опубликована статья, следует использовать сокращенный формат записи. Пример:

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. NEJM. 2002 Jul 25;347(4):284-287.

Дедов ИИ, Шестакова МВ. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений. Сахарный диабет. 2010;(3):17-22.

II. Английский язык и транслитерация. При публикации статьи часть или вся информация должна быть дублирована на английский язык или транслитерирована (написана латинскими буквами). При транслитерации рекомендуется использовать стандарт BGN/PCGN (United States Board on Geographic Names / Permanent Committee on Geographical Names for British Official Use), рекомендованный международным издательством Oxford University Press, как «British Standard». Для транслитерации текста в соответствии со стандартом BGN можно воспользоваться ссылкой <http://ru.translit.ru/?account=bgn>.

III. Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нём информацию. Ссылки на таблицы в тексте обязательны.

IV. Рисунки (графики, диаграммы, схемы, чертежи и другие иллюстрации, рисованные средствами MS Office) должны быть контрастными и четкими. Объем графического материала минимальный (за исключением работ, где это оправдано характером исследования). Каждый рисунок должен быть помещен в текст и сопровождаться нумерованной подрисуночной подписью. Ссылки на рисунки в тексте обязательны.

V. Фотографии, отпечатки экранов мониторов (скриншоты) и другие нерисованные иллюстрации необходимо загружать отдельно в специальном разделе формы для подачи статьи в виде файлов формата *.jpeg, *.bmp, *.gif (*.doc и *.docx — в случае, если на изображение нанесены дополнительные пометки). Разрешение изображения должно быть >300 dpi. Файлам изображений необходимо присвоить название, соответствующее номеру рисунка в тексте. В описании файла следует отдельно привести подрисуночную подпись, которая должна соответствовать названию фотографии, помещаемой в текст (пример: Рис. 1. Сеченов Иван Михайлович).

VI. Соответствие нормам этики. Для публикации результатов оригинальной работы необходимо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие. В случае проведения исследований с участием животных — соответствовал ли протокол исследования этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных. В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, её расположения, номера протокола и даты заседания комитета).

VII. Сопроводительные документы. При подаче рукописи в редакцию журнала необходимо дополнительно загрузить файлы, содержащие сканированные изображения заполненных и заверенных сопроводительных документов (в формате *.pdf). К сопроводительным документам относится сопроводительное письмо с места работы автора с печатью и подписью руководителя организации, а также подписями всех соавторов.

VIII. Заполнение on-line формы. Для успешной индексации статей в отечественных и международных базах данных при подаче рукописи в редакцию через online форму необходимо отдельно подробно ввести все её метаданные. Некоторые метаданные должны быть введены отдельно на русском и английском языках: название учреждения, в котором работают авторы рукописи, подроб-

ная информация о месте работы и занимаемой должности, название статьи, аннотация статьи, ключевые слова, название спонсирующей организации.

Авторы. ВНИМАНИЕ! ФИО АВТОРОВ заполняется только на английском языке. Необходимо полностью заполнить анкетные данные всех авторов. Адрес электронной почты автора, указанного как контактное лицо для переписки, будет опубликован для связи с коллективом авторов в тексте статьи, и будет в свободном виде доступен пользователям сети Интернет и подписчикам печатной версии журнала.

Название статьи. Должно быть полностью продублировано на английском языке.

Аннотация статьи. Должна полностью совпадать с текстом в файле рукописи как на английском, так и на русском языках.

Индексация статьи.

Ключевые слова. Необходимо указать ключевые слова — от 3 до 10, способствующих индексированию статьи в поисковых системах. Ключевые слова должны быть попарно переведены на английский язык. Для выбора ключевых слов на английском следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США — Medical Subject Headings (MeSH).

Язык. Необходимо указать язык, на котором написан полный текст рукописи. В случае, когда автор публикует статью на двух языках, необходимо указать двойную индексацию по языку (например, [ru; en])

Список литературы. Пристатейный список литературы должен быть оформлен в соответствии с «Правилами оформления пристатейных списков литературы», разработанными в соответствии с рекомендациями MedLine и Scopus (стандарт U.S. National Information Standards Organization NISO Z39.29-2005 [R2010]).

Дополнительные данные в виде отдельных файлов нужно отправить в редакцию вместе со статьёй сразу после загрузки основного файла рукописи. К дополнительным файлам относятся сопроводительные документы, файлы изображений, исходные данные (если авторы желают представить их редакции для ознакомления или по просьбе рецензентов), видео- и аудиоматериалы, которые целесообразно опубликовать вместе со статьёй в электронном журнале. Перед отправкой следует внести описание каждого отправляемого файла. Если информация из дополнительного файла должна быть опубликована в тексте статьи, необходимо дать файлу соответствующее название (так, описание файла изображения должно содержать нумерованную подрисуночную подпись, например: Рис. 3. Макропрепарат удалённой кисты.).