НИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ И ТЕРАПИИ

МАТЕРИАЛЫ СУХУМСКОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ: 90 лет НИИЭПиТ АНА

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

20-22 СЕНТЯБРЯ 2017 г.,
Сухум, Абхазия

УДК 616
ББК 53 (5Абх)
М 341

Редакционная коллегия:
Шевцова З.В., Миквабия З.Я., Баркая В.С., Конджария И.Г.,
Фоменко В.Н., Джокуа А.А., Ахуба Л.О., Матуа А.З.

Ответственные за выпуск:
Конджария И.Г., Матуа А.З.

Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины/ Материалы Сухумской международной научно-практической конференции: 90 лет НИИЭПиТ АНА**,** 20-22 сентября 2017 г., Сухум, Абхазия. – Сухум: РУП «Дом печати», 2017. – 632 с.
Г/р 978-5-111-57-08017

В сборнике представлены научные работы, посвященные проблемам медицинской приматологии, инфекционной патологии, микроциркуляции, гематологии, реологии, геронтологии, иммунологии, онкологии, изучению клеточных культур приматов, поведению приматов, космической медицины, радиобиологии, эндокринологии, вопросам современной лабораторной диагностики и ряду других направлений.

© «НИИ Экспериментальной патологии и терапии», 2017

Аԥышәаратә паталогиеи атерапиеи рыҭҵаарадырратә институт 90-шықәсахыҵра. Ашьақәгылареи, аҽиара аетапи

Амҟәаб З. И.

90 шықәса раԥхьа, 1927 ш. нанҳәамза 27 рзы амшынеиқәа ацәаҳәа иатәу аҕба «Пестель» Аҟәа аҕбатәараҟны аԥырсал аушьҭныиаагылеит. Ефиопиахарантәиааанагеит раԥхьатәи маамынқәак, абрантә ишьаҭаркын ҳәа иԥхьаӡоуп аусбарҭа – Аҟәатәи амаамын ааӡарҭа – ашьҭахь еицырдыруа атҵарадырратә центр – СССР Агәабзиарахьчаратә ҵарадыррақәа ракадемиа Аԥышәаратә паталогиеи атерапиеи рыҭҵаарадырратә институтны ишьақәгылаз, Америка, Европа, Азиа атәылақәа рыҟны амаамынҭҵааратә усбарҭақәа рзы ҽырԥшыганы иҟалаз. Аԥышәаратә паталогиеи атерапиеи рыҭҵаарадырратә институт.

Амаамын ааӡарҭа аԥҵара иазкыз аӡбамҭа рыдыркылеит атҵарауаа изныкымкәа Урыстәылатәи Аиҳабырахь иҟартҵаз аапхьарақәа рышьҭахь.

Акыраамҭатәи аилацәажәарақәа рнаҩс амаамын ааӡарҭа аԥҵаразы еиҳа иманшәалоу ҭыԥуп ҳәа иӡбахеит, Аԥснытәиасубптропикатә ҳауа ҳасаб азуны, Аҟәа.

Ааӡарҭа аԥҵараҟны рлагала маҷым Аԥсны анапхгара: Н. А. Лакоба, аминиcтрцәа И. Г. Семерԥьиеви В. Г. Анчабаӡеи. Амаамын ааӡарҭа акыр аиҭакрақәа ахнагеит. Раԥхьа ендокринологиазы Зегьеидгылоутәи Аинститут иатҵанакуаз ҭҵаарадырратә ааӡарҭан, 1993 шықәсазы аԥышәаратә медициана Зегьеидгылоутәи Аинститут ахь иааган. 1944 ш. Амедициантә Ҭҵарадыррақәа Ракадемиа Амедицина-биологиатә станцианы иҟалеит, 1958 шықәсазы – Аԥышәаратә паталогиеи атерапиеи рыҭҵаарадырратә институтны.

Асоветтә Социалисттә Республикақәа Реидгылаҟны Амаамынқәа рныҟәгаразы аԥышәа ыҟаҳамызт аҟнытә амаамын ааӡарҭа аиҽкааҩцәа раԥхьатәи амшқәа инадыркны амаамынқәа рныҟәгара иадҳәалаз азҵаарақәа жәпакы рхала ирыӡбар акәын.

Амаамын ааҙарҭа аԥҵара анаѡс 3 шықәса рышьҭахь иҙбан ааҙарҭаҟны еиҳарак ҩ-маамын хкык нкылатәуп ҳәа, апавианқәа гамадрилақәеи макакақәа резусқәеи. Ауаѡытәѡсаԥшра змаз амаамынқәа рынкылара иахьхәит рныҟәгара ахарԥь дуи урҭ рныҟәгара иаҳа иахьыуадаѡызи ирыхҟьаны. Ашьҭахь «ҳҭынхацәа гәакьақәа» аԥсихологиатәқәа алаҳамҭозар, иарбанзаалак даҽа ԥышәарақәак рыҟны рхархәара уаѡрам ҳәа ԥхьаҙаны, ишдыру еиԥш, амаамын ааҙарҭа уснагҙатә хаданы аҽаԥхьа иқәгылан амаамынқәа рыҟны асоциалтә ҵакы змаз ауаѡытәыѡса ичымазарақәа рырҽыхареи рыҭҵааареи аус.

Еиуеиԥшым атәылақәа рыҟни Урыстәылеи уарла-шәарла амаамынқәа рыҟны аҭҵаарақәа имѡаԥыргоз рышьҭахь хара имгакәа, Аҟәатәи амаамын ааҙарҭа аԥҵан. Изныкымкәа амаамынқәа рколониақәа раԥҵаразы аҽышәарақәа ҟартцахьан, аха, шамахамзар, иаԥҵаз аусбарҭа аркрала зегьы аанкылахон.

Иеиуеиԥшым атәылақәа рыҟни Урыстәылеи амаамынқәа рхархәарала имѡаԥгаз аҭҵаарақәа ранализ иаҳәоит аҭҵаарақәа реиҳарак аҽктәы паталогиа, аҽкы чымазара зхылҿиаауаз агент ашьақәыргылара ишазкыз атәы, изныкымкәа уи рационалла ахәышәтәрагьы ацын.

Арҭ аҭҵаарақәа роуп еиҳарак амаамынқәа рхархәара ҵаҵгәыс ироуызгьы. Абарҭ аҭҵаарақәа ҳанрылацәажәо, аҵарауаа бзиаҙақәа, аентузиастцәа Михаил Пиотр-иԥа Чумакови уи иԥшәмаԥхәыс Марина Константин-иԥха Ворошиловааи имѡаԥыргоз шықәсырацәалатәи аҭҵаарақәа рыҙбахә ҳамхәар ҟалом. Арҭ аҭҵаарақәак аамҵак азы Москваҟа ииаган, ҷыдала иеиҽкааз полиомиелит аинститут ашҟа, уи агьхыркәшан полиовакцина аԥҵарала, уи аҵыжьреи массала Асовет еидгыла ауааԥсыра риммунитет арҭәҭәареи рыла. Иҟоуп агәаанагара, арҭ аҭҵаарақәа реиҳараҙак Аҟәа амедицина-биологиатә станциеи Аԥышәаратә патологиеи атерапиеи рыҭҵаарадырратә институти рыҟны имѡаԥысуан ҳәа.

Аҟәа аҽкы патологиа аганахьала амаамынқәа рыҟны имѡаԥысуаз аҭҵаарақәа ртәы анахҳәо, хымԥада, иазгәаҭатәуп акыр шықәа арҭ аҭҵаарақәа напхгара шриҵоз академик Виктор Леонти-иԥа Троицки, иара иаԥшьгаралеи инапхгаралеи ишаԥҵаз шьҭа аҽкы патологиазы «аштаттә» лабораториа. Абра акыршықәсқәа еиуеиԥшым аҭҵаарақәа шымѡаԥысуаз, иара иааиԥмырҟьаҙакәа ааҙарҭа асанитартә ҭагылазаашьа иахылаԥшуан. Аштат аҟны иҟаз алаборато-

риа рапхьатәи еиҳабыс дамн Етери Капитон-иԥха Цьиқизе, лара акандидаттә, нас адоктортә диссертациа лыхьчеит. Алабораториаҟны аус руан амикробиологцәа шьахәқәа – А. С. Аксионова, К. Н. Кавтораҙе, С. М. Пекерман, З. В. Шевцова.

З. В. Шевцова 1961ш. Аинститут аҟны ихацлыркит авирустҭцааратә усура, 1981ш. иаԥҭан амаамынқәа рыҽкы вирусқәа рлабораториа, уи лара дахагылеит. 1992 ш. –нҙа иаадырԥшит амаамынқәа рхала ирыхьуаз авирустә чымазарақәа жәпакы рҟазшьақәа ирызкыз акрызҭазкуаз арбагақәа: гепатита А, енцефаломиокардит, коронавирустә ҽкы. Ҷыдала зҽлымҳара аҭатәуп ууанҙа идырмыз ачымазара – амаамынқәа ргеморрагиатәшыҙи уи зыхҟьо –авируси раартра. Иара СССР Агәабзиарахьчара аминистрра авирусқәа рҳәынҭқарратә коллекциаҟны иарбан, иҽыцу акы аҳасабала, З. В. Шевцова иалылкааз «Сухум-64» ҳәа хьҙыс изылҭазгьы. Ариавирусала аинститут аҟны амакакақәа рҽы ирҽыхан аԥышәаратә геморрагиатә шыҙ, иагьцәырган 1974 ш. ауаҩы ихьуа агеморрагиатә шыҙ ақәырԥшы (амодель) аҳасабала. Ҳазҭагылоу аамҭазы америкатәи аҵарауаа рнапы адыркит агәабзиаразы ишәарҭам ауаҩы ихьуа агеморрагиатә шыҙ азы ишәарҭамкәа иҟоу,амаамынқәа ирыхьуа агеморрагиатә шыҙ ахәышәтәыгақәа рхархәаразы амаамынқәа рыҟны аԥышәа амҩаԥгара.

Аҵыхәтәантәи афышықәсқәа рзы имҩаԥгоуп Аԥышәаратә медициназы Гамалеи ихьҙ зху Аҭҵаарадырратә институт аҭҵааҩцәа алархәны акрызҭазкуа аҭҵаарақәа, арҭ рыҩнытҵа дыҟоуп абри аинститут алабораториа аиҳабы Каратаев Геннади Иван-иԥа.

Амаамынқәа рыла ишьақәыргылан аимҳәаршәаа аҽҟы (коклюшная инфекция) аԥышәаратә қәырԥшы, ара иарбан аҵарауаа иаԥыртҵаз зыпсы ҭоу иҽыцу аимҳәаршәаа иаҽагылоу авакцина амч. Ихацыркхеит ари авакцина аҭҵааратә ԥышәарақәа. Аиммунологиеи авирусологиеи рлабораториаҟны, ҷыдала, иазгәаҭазарц стахуп абаҩхатәра змоу аусзуҩцәа, аҭҵаарадырра акандидатцәа И. Г. Конҵьариеи (Аԥснытәи аҳәынҭқарратә университет абиологиа акафедра адоцент) А. З. Матуеи, адоктортә диссертациазы аматериал аизгара иалагаз.

Ааҙарҭахь иаауа иналукааша аҵарауаа рахьтә иазгәаҭатәуп амаамынқәа рыклиника «хылаԥшра азызуа»академик Зинаид Виссарион-иԥха Ермолиева. Лара лнапхгаралагьы антибиотик ҽыцқәа рԥышәара анапы алакын Иа Гәазааи Медеиа Григолиеи.

Апатологиатә анатомиа алабораториаҟны иҟан – Б. А. Лапин, Л. А. Иаковлева, ашьҭахь урҭ ирыцлеит О. Трешьан, И. Букаева, М. Иванов. Алабораториа аҧышәаратә усуразызкыз иҧсуаз амаамынқәа рҟьаны, рыҧсра мзызс иамаз аилкаара акәын.

Зқьыла арҭ агәаҭарақәа рыла ауаа рчымазарақәа акырҙа иеиҧшыз, амаамынқәа рчымазара анозологиатә хырхарҭа аилкаара алыршан. Арҭ аматериалқәа шьаҭас иаиуит Лапини Иаковлеви 1960 шықәсазы ирҽыз ашәҟәы «Амаамынқәа рыҟны аиҿырпшратә патологиа».

Ашәҟәы англыз бызшәахь еиҭаганы иҭыжьын Еиду Америка Аштатқәа рыҟны 1962ш., аус адуланы Германиа иҭыжьын 1964ш.

Ари ашәҟәы акыр шықәса амаамынҭцаақцәа, еиҳаракгьы, патологоанатомцәа харҳәара арҭон. Амаамынқәа аҧсабараҟны ианыҟоу рчымазаранозологиатә хырхарҭа аҭцааразы имҽаҧган Виетнам абнаршәырақәеи Нигериа асаванақәеи рыҟны аекспедициақәа. Ироуз аматериал аҧсабараҟны иҟази ааҙарҭақәа рыҟны иҟази амаамынқәа рчымазарақәа акырҙа ишиеиҧшым атәы аадырпшит. Рҭагылазаашьа, рыфатә, ироуаз астресс уҳәа, аҧсабараҟны ирҧымлоз ауадаҽрақәа ирыхҟьон рчымазарақәагьы. Арҭ аҭцаарақәа кьыҧхьын астатиақәеи «Витенам аҧсабараҟны иҟаз амаамынқәа рчымазарақәа» захьҙыз амонографиеи рыҟны.

Апатологиатә анатомиа алабораториеи (анаҽс аҧышәаратә онкологиа аҟәшеи) алархәны амаамынқәа ргемобластоз амодель аҧцара иазкыз аҭцаарақәа нарҭбааны имҽаҧган, апавианқәа– гамадрилақәа рыҟны ирҿыханавирустә нехоцкинтә лимфома, иалкаан уи агәыҧ иатцанакуаз авирусқәа, иарбаначымазара надаадатәи алатцәара амҽа. Ари аусура иалахәыз (Б. А. Лапин, Л. А. Иаковлева, Л. В. Инцьиа, В. З. Агрба, М. Г. Чикобава) иранашьан 2002 ш. аҭцаарадырразы Аҳәынтқарратә премиа. Иазгәаҭатәуп ари аусура еиҳарак Аҟәа ишымҽаҧгаз.

Аҧышәаратә онкологиа аҟәшааҧцан 1986ш.(анапхг. Л. Иаковлева). Ишьақәгылан х-лабораториак рыла, урҭ напхгара рырҭон абаҽхатәра змаз Аинститут аусзуҽцәа ҿарацәа, адоктортә диссертациа зыхьчаз: А. Воеводин, В. Агрба, А. Диаченко.

Иазгәаҭатәуп, амаамынқәа ронкогентә вирусқәа рлабораториа анапхгаҽы В. З. Агрба, 1992 ш. инаркны 1994 ш.-нҙа,еиҳабыс данықаз иҟалтцаз шырацәоу абри ашықәс хьанҭақәа раан Аинститут аиқәырхаразы. Иахьа лара напхгара алҭоит Адлер иҟоу ахац аиммуноло-

гиеи абиологиеи рлабораториа. 1994ш. инаркны Аҟәа амаамынқәа ронкогентә вирусҟәарлабораториа напхгара алҭоит аб.ҭц.рк. В. В. Тимановскаиа, 1984 ш. В. Д. Тимаков ихьӡ зху СССР Амедицинатә ҭцаарадыррақәа ракадемиа апремиа ланашьан.

Ииаркьаҷны даара зҷлымхара зыҭатәу алабораториа – аендокринологиа алабораториазы ажәақәак сҳәар сҭахуп. Уи аҧитҷеит 1961 ш. напхгарагьы аиҭеит ленинградтәи (академиатә) аспирантура аушьтымҭаҩ Н. П. Гончаров. Германиатәи Адемократиатә Республика аҟнытә абиохимик дадпхьаланы алабораториа аендокринологиа атеориатә проблемақәа акыр рыҭҵаара анапы алакын, убри инаваргыланы, астероидтә хаҵара-пҳәысратәи аҷаҷахыхьтәи гормонқәа рышьақәыргыларазыаиммунологиатә методқәа аҧҵо. Алабораториаҟны иазырхиан урҭ рышьақәыргыларазы аизакқәа (наборы) ртехнологиа. Арҭ аизакқәа атәылаҟны иҟаз иара зҭахыз алабораториақәа зегьы ирызшан. Ууанӡа урҭ аҳәааныркәынтә иаахәаны иааргон, рыхәгьы дуун.

Ашьтахьалабораториа еиҭакын х-лабораториак еидызкылоз ҟәшаны, руакы напхгара алҭон Г. Кациа, анаҩс аҭҵаарадыррақәа рдокторс иҟалаз.

Николаи Пиотр-иҧеи Гульнара Кациеи Москваҟа ииасит аихьӡарақәагьы рыманы аус руан СССР Амедицинатә ҭцаарадыррақәа ракадемиа аендокринологиатә центр аҟны. Иазгәаҭатәуп Николаи Пиотр-иҧа илабораториаҟны аус шылуаз Надежда Дмитри-иҧҳа Гончарова, ашьтахь уи аҭҵаарадыррақәа рдокторс дҟалеит, Амедикатә приматологиа ринститутаҟны аҧышәаратә ендокринологиа алабораториа дахагылеит.

Ииаркьаҷӡаны салацәажәарц сҭахуп радиобиологиатә ҭцаарақәа ишрылагази урҭ инарыкәыршәаны арадиобиологиа алабораториа аҧҵара шыҟалази ртәы. Арадиобиологиатә ҭцаарақәа ирылагеит ҳгәыҳҷеанӡамкәа. Амедицина-биологиатә станциаи аалырҟьаны иаиуит Арентгенотерапевттә шьақәыргыламҭа дуқәа ҩба. Уи инашьтархны агәабзиарахьчара аминистр ихаҭыпуаҩ А. И. Бурназиан иҟаитҵаз адҵала – амаамынқәа рыҟны арадиобиологиатә ҭцаарақәа хацыркын. Ари хырхарҭа ҷыцын. Амедицина-биологиатәстанциа аусзуҩцәа абри инамаданы ҧышәа ҳәа акгьы рымаӡамызт. Абиостанциа аиҳабы А. И. Уткин аҭҵаарадырратә усзуҩы еитҵбы Л. А. Иаковлева ҷыц иаиҷкаахоз арадиобиологиа алабораториа аҭҵаарадырратә усзуҩы

еиҳабы лматцурахьы диаигеит арадиобиологиатә тцаарақәа дрылагарц лыдцаны.

Арадиобиологиа алабораториа аусзуѡцәа иара убас, аҽктәы патологиеи аҽктәы патологиатә анатомиеи рлабораториақәа русзуѡцәа рзы Аҟәатәи афизика-техникатә институт афизикцәа рымчала имѡапган афизикеи адозиметриеи ирызкыз аҽазыҟатцарақәа, аҭцаарадыррақәа Ракадемиа абиофизика аинститутапроект ала иргылан ашәахәыркыгақәа (облучатели) ѡба (аион злоу арадиациа ала иҩәганы ашәахәарыкрази акрыаамҭатәи имачу ашәахәыркрази).

Атцыхәтәантәи аҟны Е. К. Цьиқиҙеии Л. А. Иаковлевеи имѡапыргеит зеипш ыҟам аҭцаарақәа. Абарҭ аҭцаарақәа раан амаамынқәа мызла, шықәсылаарадиациа мач, -1-5 рентген рныррақны иҟан, акосмос аҟны аҟазаараан иеипшны, мамзаргьы атомтә ааглыхраҟны акыраамҭа аусураҟны иҟазар аҟара.

Иҭыртцаауан инфекциақәак риммунологиатә еиҭатцрақәеи реиҭатцшьа ацыдарақәеи, иара убас гамма шәахәала имачу ашәахәаркра ахҟьа-цҟьақәак.

Арадиобиологиа алабораториа анапхгара инапы иантцан Ленинградынтә иаазазыҟатцара ҳаракы змаз арадиобиолог Л. Ф. Семионов, радиопротектор аҭцаара аҟәша аспециалист.

Хара имгакәа, алабораториаиацлеит арадиациа аус адуларақны апышәа змаз аусзуѡцәа рыла – Б.Фиодоров, агематологиеи ашьаиагара аинститут аҟны аспитрантура иалгаз В.Баркаиа, иахьа иара аҭцаарадырратә усура аҟәша аиҳабы ихаҭыпуаѡыс дыҟоуп. Апышәаратә патологиеи атерапиеи рыҭцаарадырратә институт аҟәша дахагылоуп.

Агематологиа алабораториа атәы анаххәо, иазгәаҭатәуп алабораториа аҭцаарадырратә пцамҭақәа рыҟны злагаламҭа дуу, азыҟатцара ҳаракы змоу аспециалистцәа аҭцаарадырратә усзуѡцәа еиҳабацәа, аб. ҭц. рк.-цәа В. Н. Фоменкои Ж. В. Елистратови. Хазы иазгуаҭатәуп аҭцаарадырратә усзуѡ еиҳабы, аб. ҭц. рк.-т Ҳашыг Н. Е. анаѡс, рыцҳарас икалаз аамҭа қьаҿ аѡныцка, напхгара алҭеит абиохимиатә лабораториа.

Ахыркәшамҭаз иазгәаҭазар сҭахуп Иреиҳаҙоу анервтә усура алабораториа (ашьҭахь х-лабортаориак рыла ишьақәгылаз) аусура атәы.Арҭалабораториақәа напхгара рырҭон абаѡхатәра змоу аҭц.

Рдокторцәа, докторами наук, аинститут аҟны адиссертациа зыхьчаз. Ҳарзаатгылап Д. И. Миминошвилии, Г. М. Черковичи, Г. И. Магакиани русумтақәақәа. Арҭ атцарауаа ирылшеит ҩ-маамын хкык рыҟны ауаҩытәҩса ичымазарақәа рырҷыхара: агипертониатә чымазареи, акоронартә зымхареи, миокардаинфаркти.

Арҭ аҭцаарақәа даара зҷелымҳара роуит, изныкымкәа аусеицуразы Аҟәаҟа иаауаз америкатәи афизиологцәа шықәсырацәалатәи рыҭцаарақәагьы шьаҭас ирзышьҭатцан.

Иҳәатәуп, «акосмостә программа» захьӡу аҳәаа инҭагӡаны егьырҭ аинститутқәа, алархәны раԥхьаӡа акәны ишазырхиаз амаамынқәа акыраамҭатәи рклиностатикатә гипокинезиа амодель. Адгьыл аҟны разыҟатцарақәа рнаҩс 12 (6 -6) макака резусқәа акосмос ахь ирԥырын, қәҷиаралагьы ихынҳәит 1983 ш.–1996 ш. рзы

Ари аусуразы Аҟәатәи атцарауаа рколлектив иранашьан ЖӘРАР араӡын медал (Г. С. Белканиа, Т. Г. Урманчеева уҳәа уб.егь.). Урҭ рхыԥхьаӡараҟны дыҟоуп иахьа алабораториа анапхгаҩы, аб.ҭҭ.рк. А. А. Цьокуа.

Цыԥхтәи ашықәс азы ихыркәшан Аендокринологиатә центр злахәыз (Н. П. Гончаров, Москва) еиуеиԥшым ақәра змаз амаамынқәа рыҟны имҩаԥгаз аԥышәаҷы астероидтә гормон дегидроепиандростеро инанагӡо ароль ганрацәалатәи аҭцаара. Аҭцаара ахәҭак «Дегидроепиандростерон анеиропротективтә ҟазшьақәа» Чикагои Венеи имҩаԥысуаз жәларбжьаратәи асимпозиумқәа рыҟны ицәыргоуп.

Аинститут аҟны аус ауеит абиологиеи амедицинеи рԥышәаратә кафедра. Акафедра аԥшьгаҩыс иҟан 1981 ш. академикцәа А. А. Гәарамиеи Б. А. Лапини, Б. А. Лапин 1981 ш. ин. 1992 шш.-нӡа акафедра напхгара аитон. Аибашьра анеилга анаҩс 1996 ш. акафедра аусура еиҭахыцыркын. 1998ш. ин. 2016 ш.-нӡа акафедра напхгара алҭон З. В. Шевцова. Уи лаан ирыдыркылеит арҭцаратә планқәа, урҭ рыла акафедра «амедицинатә биохимиа» азанаат азы аушьҭымҭақәа азыҟанатцоит. Акафедра аилазааракны иҟоуп еиҳарак Аинститута аусзуҩцәа, иазгәастарцгьы сҭахуп, аштаттә усзуҩцәа зегьы акафедра артцаҩцәа зегьы атцарауаҩ иҩаӡара шрымоу.

Акафедра анапҭцаха инаркны иазыҟатцоуп 300-ҩык аспециалистцәа, урҭ рахьтә 14 –ҩык акандидаттә диссертациақәа рыхьчеит, 2-ҩыцьа- А. З. Матуа, Л. О. Аҳәба адоктортә диссертациа аусадулара иаҷуп.

Ҳкафедра аушьҭымҭацәа 4-ҩык Аҧышәаратә паталогиеи атерапиеи рыҭҵаарадырратә институт алабораториақәа, аӡәы Адлер алабораториа напхгара арҭоит, иара убас аус руеит Аҭҵаарадырратә институти Аҧсни уи анҭыҵи агәабзиарахьчара асистемаҟны.

1992-93шш.Аҧсны Жәлар рҵьынҵьтәылатә еибашьра аинститут аҧхасҭа ҕәҕәа анаҭеит. Аҧсныиҟаз 3,5 нызқь маамын рахьтә аибашьра ашьҭахь иаанхеит 150, иҧхасҭартәит Аинститут аматериалтә база. Аҧышәаратә патологиеи атерапиеи рыҭҵаарадырратә институт аркын. Аха Аинститут аусзуҩцәа хатә хьаак еиҧш ирыдыркылеит имҩаҧысуаз зегьы. Ус акәымзар, ишҧеилкаатәуи, ишшәарҭазгьы, аибашьратә хымца иаҵагыланы хылаҧшрада инхаз абаҳчақәеи ақалақьқәеи рыҟны амаамынқәа рзы ашәыри ауҭраҭыхи ахьеизыргоз, аҩнынтә рҭаацәа ирыгырханы афатә ахьааргоз.

Иахьа Аинститутаҧсы ҭоуп, уи зыбзоуроу дара роуп.

Иазгәасымҭар ауам, Аҧышәаратә патлогиеи атерапиеи рыҭҵаарадырратә институти, Амедикатә приматологиа ринститути реиҭашьақәыргыларақны инарыгӡаз ароль ду атәы академик Б. А. Лапин, аинститут аиҳабы С. В. Орлови егьырҭ аусзуҩцәа зегьи. Урҭ ирылшо зегьы ҟарҵоит адунеи аҿы раҧхьатәи амаамынҭҵааратә центр – Аҧышәаратә патологиеи атерапиеи рыҭҵаарадырратә институт ҧасатәи ахьӡ-аҧша архынҳәразы.

Идуӡӡаны иҭабуп ҳәа расҳәоит Аҧсны Аҵарадырратә Академиа анапхгара, уи анапхгаҩы академик З. Ҵь. Ҵьапуа ихаҿала, Аҧсны Аҳәынҭқарра Ахадара, Аинститут алахьынҵазы иҳамоу агәыҵха ҳацеиҩызшо, имариам аамҭақәа ҳшырҭагылоугьы Аинститут аиҭашьақәыргылареи аҿиареи рус азы иҟарҵо рацәоуп.

90-летие НИИЭПиТа. Становление, этапы развития

Миквабия З. Я.

90 лет назад, 27 августа 1927г. пароход черноморских линий «Пестель» отдал якорь на рейде Сухума. Из далекой Эфиопии были доставлены первые несколько обезьян, что принято считать началом замечательного учреждения – Сухумского питомника обезьян, ставшего впоследствии знаменитым научным центром – Институтом экспериментальной патологии и терапии АМН СССР, ставшего образцом при создании большого количества приматологических учреждений в странах Америки, Европы, Азии.

Решение о создании питомника обезьян было принято после многочисленных обращений в Правительство Российских ученых.

В результате длительного обсуждения было решено, что наиболее благоприятным местом создания питомника является Абхазия (Сухум) с ее мягким субтропическим климатом.

Деятельное участие в создании питомника принимали руководители Абхазии Н. А. Лакоба, министры И. Г. Семерджиев и В. Г. Анчабадзе. Питомник претерпел много преобразований. С самого начала он был научным питомником Всесоюзного Института эндокринологии, в 1933 году был передан Всесоюзному Институту экспериментальной медицины, в 1944 – превратился в Медико-биологическую станцию АМН, а в 1958 году – в Институт экспериментальной патологии и терапии.

Опыта содержания обезьян в СССР не было и организаторам питомника с первых же дней пришлось решать множество практических вопросов содержания обезьян.

Через 3 года после создания питомника было принято решение, что в питомнике будут содержаться в основном обезьяны 2-х видов, павианы гамадрилы и макаки резусы. От содержания человекообразных обезьян пришлось отказаться в связи с их дороговизной и значительно более сложными условиями содержания. Впоследствии к этому присоединились соображения об аморальности использования наших «ближайших родственников», в каких либо экспериментах, кроме психологических, в то время как основной задачей питомника было воспроизведение и изучение на обезьянах социально значимых болезней человека.

Эпизодические исследования на обезьянах в разных странах и в России нередко задолго предшествовали созданию Сухумского питомника. Неоднократно делались попытки создания колоний обезьян, которые обычно заканчивались ликвидацией уже, казалось бы, созданного учреждения.

Анализ исследований с использованием обезьян в различных странах и в России, свидетельствуют, что наибольшее количество исследований относились к инфекционной патологии, к определению агента, вызывающего инфекционное заболевание, и нередко с попытками его рационального лечения. Эти исследования послужили обоснованием одного из наиболее целесообразного использования обезьян. И говоря об этих исследованиях, мы не можем не остановиться на многолетних исследованиях, которые проводились в Сухуме замечательными учеными, энтузиастами, Михаилом Петровичем Чумаковым и его супругой Мариной Константиновной Ворошиловой. Эти исследования на определенном этапе были перенесены в Москву в специально организованный институт полиомиелита и завершились созданием полиовакцины, ее производством и массовой иммунизацией населения Советского Союза. Представляется, что значительная часть этих исследований была проведена в Сухуме на медико-биологической станции и в Институте экспериментальной патологии и терапии АМН СССР.

Говоря об исследованиях на обезьянах в области инфекционной патологии в Сухуме, совершенно необходимо сказать о том, что в течение многих лет этими исследованиями руководил академик Виктор Леонтьевич Троицкий, что по его инициативе и под его руководством была создана уже « штатная» лаборатория инфекционной патологии, в которой в течение многих лет проводились различные научные исследования и которая осуществляла постоянный контроль за санитарным состоянием питомника. Первой «штатной» заведующей лаборатории была Этери Капитоновна Джикидзе, защитившая кандидатскую, а затем и докторскую диссертации. В лаборатории работали отличные микробиологи – А. С. Аксенова, К. Н. Кавторадзе, С. М. Пекерман, З. В. Шевцова.

З. В. Шевцовой в 1961г были начаты вирусологические исследования в Институте, а в 1981г была создана лаборатория инфекционных

вирусов приматов, которую она возглавила. За период до 1992г были получены приоритетные данные по характеристике ряда спонтанных вирусных заболеваний обезьян: гепатита А, энцефаломиокардита, коронавирусной инфекции. Особого внимания заслуживает изучение неизвестного ранее заболевания-геморрагической лихорадки обезьян и открытие ее возбудителя-вируса ГЛО. Он был зарегистрирован в государственной коллекции вирусов МЗ СССР, как новый, выделенный З.В.Шевцовой и названный «Сухум-64». С помощью этого вируса в институте была воспроизведена на макаках экспериментальная геморрагическая лихорадка и предложена в 1974 г., как модель геморрагических лихорадок человека. В настоящее время американские ученые приступили к использованию геморрагической лихорадки обезьян, как единственно безопасной модели геморрагической лихорадки людей, для проверки на ней терапевтических средств против ГЛ, смертельно опасных для человека.

В последние 6 лет приоритетное исследование проведено в сотрудничестве с исследователями из НИИЭМ им. Гамалеи, среди которых необходимо отметить зав. лабораторией данного института Каратаева Геннадия Ивановича.

На обезьянах получена экспериментальная модель коклюшной инфекции, на которой показана эффективность изготовленной этими учеными новой живой ослабленной противококлюшной вакцины. Начались клинические испытания этой вакцины. Среди сотрудников лаборатории иммунологии и вирусологии, особенно хочется отметить талантливых старших научных сотрудников, кандидатов наук И. Г. Конджария (доцент кафедры экспериментальной биологии и медицин Абхазского Университета) и А. З. Матуа, которая начала сбор материала для докторской диссертации.

Из приезжавших в питомник видных ученых необходимо отметить академика Зинаиду Виссарионовну Ермольеву, «опекавшую» клинику обезьян, в которой под ее руководством Ия Гвазава и Медея Григолия испытывали новые антибиотики.

Лаборатория патологической анатомии - Б.А.Лапин, Л.А.Яковлева, позднее к ним присоединились О.Трещан, И.Букаева, М.Иванов. Практическая работа лаборатории заключалась во вскрытии всех погибающих обезьян, анализе причины их гибели.

На основании материала тысяч вскрытий был определен нозологический профиль заболеваний обезьян, в значительной степени напоминающий таковой у людей. Эти материалы послужили основанием для написания книги «Сравнительная патология обезьян», написанной Лапиным и Яковлевой и опубликованной ими в 1960 г.

Книга была переведена на английский язык и издана в США в 1962г., и в переработанном виде в Германии в 1964 г.

Эта книга в течение многих лет была настольной книгой приматологов, особенно патологоанатомов. Для изучения нозологического профиля заболевания обезьян в природных условиях их естественного обитания были проведены две многомесячные экспедиции, работавшие в джунглях Вьетнама и в джунглях и саванах Нигерии. Полученный материал свидетельствовал о существенном отличии профиля заболеваний обезьян в природных условиях от таковых в условиях содержания в питомнике. Отличающиеся условия жизни, питания, стрессы и другие факторы были причиной появления заболеваний, не встречающихся в природных условиях в местах естественного обитания. Эти исследования были опубликованы в ряде статей и монографии «Болезни обезьян в природных условиях Вьетнама».

В лаборатории патологической анатомии совместно с лабораторией (а в последствии с отделом экспериментальной онкологии) были проведены широкие исследования по моделированию гемобластозов у обезьян, воспроизведена на павианах - гамадрилах вирусная неходжкинская лимфома, выделены ассоциированные с ней вирусы, показан горизонтальный путь распространения заболевания. Участники этой работы (Б. А. Лапин, Л. А. Яковлева, Л. В. Инджия, В. З. Агрба, М. Г. Чикобава) были удостоены Государственной премии по науке за 2002г. Надо отметить, что эта работа в основном была выполнена в Сухуме.

Отдел экспериментальной онкологии был создан в 1986г. (зав. Л. Яковлева) в составе 3-х лабораторий, которыми руководили молодые талантливые сотрудники Института, защитившие докторские диссертации: А. Воеводин, В. Агрба, А. Дьяченко.

Отдавая должное каждому из них необходимо отметить зав.лабораторией онкогенных вирусов приматов В. З. Агрба, которая за период с 1992г. по 1994г.,будучи директором, сделала очень многое для сохранения Института в это труднейшее время. Сегодня она руководит ла-

бораторией иммунологии и биологии клетки в ИМП в Адлере. С 1994г. заведующей лабораторией онкогенных вирусов приматов в Сухуме является к.б.н. В. В. Тимановская, ставшая в 1984 г. лауреатом премии АМН СССР им. В. Д. Тимакова.

Коротко об одной очень интересной лаборатории – лаборатории эндокринологии. Ее создал и возглавил в 1961 г. выпускник ленинградской (академической) аспирантуры Н. П. Гончаров. Лаборатория вместе с биохимиками из ГДР занималась изучением ряда теоретических проблем эндокринологии, одновременно разрабатывая иммунологические методы определения стероидных половых и надпочечниковых гормонов. В лаборатории была разработана технология получения наборов для их определения. Этими наборами снабжались практически все нуждающиеся лаборатории страны. Раньше эти наборы закупались за рубежом и стоили очень дорого.

Впоследствии лаборатория была реорганизована в отдел из 3-х лабораторий, одной из которых руководила Г.Кация, ставшая доктором наук.

Николай Петрович и Гульнара Кация переехали в Москву и успешно трудились в эндокринологическом центре АМН СССР. Необходимо отметить, что в лаборатории Николая Петровича работала Надежда Дмитриевна Гончарова, ставшая впоследствии доктором наук и возглавившая в ИМП лабораторию экспериментальной эндокринологии.

Очень коротко о начале радиобиологических исследований и соответственно о создании лаборатории радиобиологии. Радиобиологические исследования начались совершенно неожиданно. Медико-биологическая станция вдруг получила две мощные рентгенотерапевтические установки, вслед за которыми распоряжение зам. министра здравоохранения А. И. Бурназяна – было предложено начать на обезьянах радиобиологические исследования. Это было по существу новое направление, и у научных сотрудников медико-биологической станции не было никакого опыта. Директор биостанции А.И.Уткин перевел м.н.с. Л. А. Яковлеву на должность ст.н.с. вновь организуемой лаборатории радиобиологии, поручив ей начать радиобиологические исследования.

Для сотрудников лаборатории радиобиологии, а также для сотрудников лаборатории инфекционной патологии и лаборатории патоло-

гической анатомии, силами физиков СФТИ были проведены занятия по физике и дозиметрии ионизирующей радиации, сооружены по проекту института биофизики АН два облучателя (для облучения мощными дозами и для длительного облучения очень малыми дозами ионизирующей радиации).

На последнем были проведены буквально уникальные исследования Э. К. Джикидзе и Л. А. Яковлевой, в которых обезьяны в течение длительного времени исчислявшегося месяцами и годами, находились под воздействием очень малых доз радиации, 1-5 рентгенов, эквивалентных таковым при нахождении в космосе или же при длительной работе на атомных производствах.

Исследовались иммунологические сдвиги и особенности протекания некоторых инфекций на фоне облучения гамма лучами, а также отдаленные последствия перенесенного фракционного длительного облучения малыми дозами гамма лучей.

Руководство лабораторией радиобиологии было передано прибывшему из Ленинграда высококвалифицированному радиобиологу Л. Ф. Семенову, специалисту в области изучения радиопротекторов.

Лаборатория вскоре пополнилась сотрудниками имеющими опыт работы с радиацией – Б. Федоровым и закончившим аспирантуру в институте гематологии и переливания крови В.Баркая, который в настоящее время является заместителем по научной работе, возглавляет отдел ИЭПиТ АНА, состоящий из лабораторий биохимии и гематологии. И говоря о лаборатории гематологии необходимо отметить высококвалифицированных сотрудников ст.н.с. к.б.н. В. Н. Фоменко и Ж. В. Елистратову, которые внесли большой вклад в научные разработки лаборатории. Отдельно следует вспомнить ст.н.с., к.б.н. Хашиг Н.Э., которая в последующем возглавила, к сожалению, ненадолго, лабораторию биохимии.

И в завершение необходимо сказать о лаборатории ВНД (впоследствии отдела, состоящего из 3-х лабораторий. Эти лаборатории возглавлялись талантливыми докторами наук, защитившими диссертации в институте. Отдавая должное каждому из них, мы хотим остановиться на работах Д. И. Миминошвили, Г. М. Черкович, Г. И. Магакяна, которым удалось воспроизвести на обезьянах 2 видов, казалось бы

«чисто человеческие» заболевания: гипертоническую болезнь, коронарную недостаточность, инфаркт миокарда.

Эти исследования вызвало буквально ажиотажи, и послужили базой многолетних исследований с американскими физиологами, приезжавшими в Сухум для совместной работы, нередко на очень длительное время.

Нельзя не сказать о большой так называемой «космической программе», в рамках который совместно с другими институтами, в первую очередь с ГНЦ РФ ИМБП, впервые была разработана уникальная модель длительной клиностатической гипокинезии обезьян, позволяющая моделировать факторы невесомости. После наземной подготовки 12 (6 пар) макак резусов полетели в космос и благополучно вернулись с 1983 г. по 1996 г.

За эту работу коллектив Сухумских ученых был награжден серебряной медалью ВДНХ.(Г. С. Белкания, Т. Г. Урманчеева и др). В том числе и нынешний руководитель лаборатории к.б.н. А. А. Джокуа.

В прошлом году совместно с Эндокринологическим центром (Н.П. Гончаров, Москва) завершено многоплановое исследование биологической роли стероидного гормона ДГЭА в опытах на обезьянах разных возрастных групп. Фрагмент исследования «О нейропротективных свойствах ДГЭА» представлен на международных симпозиумах в Чикаго и Вене.

На базе Института функционирует кафедра экспериментальной биологии и медицины. Инициаторами создания кафедры в 1981 г. были академики А. А. Гварамия и Б. А. Лапин, который руководил кафедрой с 1981 г. по 1992 гг. После прекращения боевых действий работа кафедры возобновилась в 1996 г. С 1998 г. по 2016 г. руководителем кафедры была З. В. Шевцова. При ней были приняты учебные планы, по которым кафедра готовит выпускников по специальности «медицинская биохимия». Состав кафедры представлен в основном сотрудниками Института и хотелось бы особенно отметить, что все штатные преподаватели кафедры имеют ученые степени.

Со дня основания кафедрой подготовлены более 300 дипломированных специалистов, 14 из которых защитили кандидатские диссертации, а 2 приступили к работе над докторской диссертацией - А. З.

Матуа, Л. О. Ахуба, прекрасно справляющаяся с новыми для себя обязанностями заведующего кафедрой.

Из выпускников нашей кафедры 4 руководят лабораториями в НИИЭПиТ АНА и 1 в ИМП в Адлере, а также работают в других НИИ и системе здравоохранения в Абхазии и за ее пределами.

Отечественная война народов Абхазии 1992-93 гг. нанесла огромный урон институту. Из более чем 3,5 тысяч обезьян на территории Абхазии, на день окончания войны осталось 150, была совершенно разрушена материальная база Института. Казалось бы, НИИЭПиТ перестал существовать. Но сотрудники Института восприняли все происходящее как личную трагедию. Иначе, чем можно объяснить, что они, с риском для жизни, под артобстрелом собирали для обезьян фрукты и овощи в заброшенных садах и огородах, приносили из дому продукты, отрывая их от своих родных.

И то, что сегодня Институт оживает, это полностью их заслуга.

Не могу не отметить большую роль в восстановлении ИЭПиТа, ИМП, в лице академика Б. А. Лапина, директора С. В. Орлова и всех их сотрудников, которые делают ,все от них зависящее, чтобы вернуть былую славу первому в мире приматологическому центру –НИИЭПиТу.

Огромная благодарность АНА в лице ее президента академика З. Д. Джапуа и высшему руководству РА, которые разделяют нашу обеспокоенность судьбой Института и в наше непростое время, делают очень многое в деле восстановления и развития Института.

90th anniversary of the Scientific-Research Institute of Experimental Pathology and Therapy. The main stages of its formation and development

Mikvabiya Z. YA.

90 years ago, August 27, 1927 the steamer of the Black Sea shipping lines "Pestel" dropped the anchor in the Sukhum roadstead.The first few monkeys were delivered from a far country Ethiopia. This fact is considered to mark the establishment of a prominent Institution, that of the Sukhum Monkey Nursery, subsequently transformed into a famous scientific center – the Institute of Experimental Pathology and Therapy of the USSR AMS, which set an example for a creation of a large number of primatology institutions in the countries of the Americas, Europe, and Asia.

The decision to establish Monkey Nursery was taken after numerous appeals to the Government of Russian Scientists.

After extensive discussions, it was decided that the most favorable location for the future Monkey Nursery would be Abkhazia (Sukhum) with its gentle subtropical climate.

The leader of Abkhazia N.A. Lakoba, Ministers I.G. Semerdzhiev and V.G. Anchabadzeactively engaged in the process of the establishment of the Nursery, that later underwent many transformations. Initially it was scientific Nursery of the All-Union Institute of Endocrinology, transferred in 1933 to the All-UnionInstitute for Experimental Medicine;in1944, it became the Biomedical Station of the AMSand in 1958, – the Institute of Experimental Pathology and Therapy.

Due to the lack of experience with monkeys` containingin the USSR,the Administration of the Monkey Nursery had to solve many practical issues.

Three years later after the establishment of the Nursery, it was decidedto house two species of monkeys: hamadryas baboons and rhesus macaques. The Administration had to abandon to house anthropoid apes in connection with their sufficient dearness and significantly more difficult conditions of containing.Subsequently, to the above-mentioned reasons were added the reasons of immorality to use our "next of kin"for any experiments other

than psychological ones, while the Nursery`s primary goal was to induce the most socially significant human illnesses in monkeys and study them.

Episodic monkey studies in different countries and in Russia often preceded the establishment of the Sukhum Monkey Nursery. Repeated attempts had been made to organize monkey colonies, which usually ended inabolition of an already seemingly established Institution.

The analysis of monkey studies in various countries and in Russia shows that the highest number of studies included infectious pathology, definition of the agentsthat cause infectious diseases, and often attempts oftheir rational treatment. These studies served as a rationale for one of the most expedient use of monkeys.Referring to these studies, it`s impossible not to mention such outstanding scientists and enthusiasts as Mikhail PetrovichChumakov and his wife Marina KonstantinovnaVoroshilova, who carried out longitudinal studies in Sukhum.At a certain stage, these studies were transferred to Moscow intospecially organized Institute of Poliomyelitis and resulted in the discovery of polio vaccine, with its further production and mass immunization of the population of the Soviet Union. It appears that a substantial body of these studies was carried out in Sukhum at Biomedical Station and at the Institute of Experimental Pathology and Therapy of the USSR AMS.

Speaking of monkey studies in the field of infectious pathology in Sukhum, it is essential to note that for many years academician Viktor LeontyevichTroitsky supervised these studies. At his initiative and under his guidance was established a “regular” Laboratory of Infectious Pathology, in which for many years were carried out various scientific studies and constant monitoring of the sanitary conditions of the Monkey Nursery.The first “regular” Head of the Laboratory was EteriKapitonovnaDzhikidze, who defended her Ph.D. and doctoral thesis. Such excellent microbiologists as A.S. Aksenova, K.N. Kavtoradze, S.M. Pekerman, and Z.V. Shevtsovaalso worked in the Laboratory.

In 1961, Z.V. Shevtsova began virological studies at the Institute, and in 1981,she headed the newly established Laboratory of Infectious Viruses of Primates.For the period up to 1992, high-priority data were obtainedon the characteristics of a number of spontaneous viral diseases of monkeys:

hepatitis A, encephalomyocarditis, and coronavirus infection.The study of a previously unknown disease-hemorrhagic feversof monkeys (HFMs) and the discovery of its pathogen-virus HFMs merits special attention. The new virus identified by Z.V. Shevtsovawas registered under the name "Sukhum-64" in the State collection of viruses of the Ministry of Health of the USSR. Using the virus, the Institute replicated experimental hemorrhagic fever on macaquesand in 1947 proposed it as a model of human hemorrhagic fevers.Today American scientists have started using hemorrhagic fever of monkeys as the only safe model of human hemorrhagic fever, for testing therapeutic drugsto defeatHFs, which arelethal to human.

During the past 6 years,priority study was conducted in collaboration with researchers fromN.F. Gamaleya Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (RAMS), among whom should be noted in particularthe head of the Laboratory of the Institute Karataev Gennady Ivanovich.

Using experimental model of pertussis infection on monkeys the scientists made new effective live attenuated pertussis vaccine.Clinical trials of this vaccine have begun. Among the staff members of the Laboratory of Immunology and Virology special mention should be made of the talented Candidates of Science I.G. Kondzharia (Assistant Professor of the Department of Experimental Biology and Medicine of the Abkhaz University) and A.Z. Matua, who has started gathering information for her Doctoral Thesis.

Among the eminent scientists who visited the Nursery, it is necessary to mention Academician ErmolievaZinaidaVissarionovna, who "patronized" the monkey clinic, in which under her guidance Iya Gvazava and Medea Grigolia were testing new antibiotics.

Members of the Laboratory of Pathological Anatomy are B.A. Lapin, L.A.Yakovleva; O. Treshchan, I. Bukayeva, M. Ivanov subsequently have joined them. The practical work of the Laboratory consisted inautopsies of monkeys, analysis of the causes of their death.

Based on the materials of thousands of autopsies the nosological disease profile of monkeys was determined, closely resembling that of humans. These materials served as the basis for the book "Comparative pathology

in monkeys", written by B.A. Lapin and L.A. Yakovleva and later published in 1960.

In 1962, the book was translated into English and published in the USA; in 1964, it was published in revised version in Germany.

For many years, this book has been a reference book of primatologists, especially pathologists. To study the nosological disease profile of monkeys under environmental conditions of their natural habitat, two months-long expeditions were conducted, operating in Vietnamese jungles and Nigerian jungles and savannahs. The obtained material showedsignificant difference between the disease profile of monkeys under environmental conditionsand conditions of the Nursery. Different living conditions, food, stress and other factors causedintroduction of diseases that could not be found under environmental conditions of their natural habitat.These studies were published in a series of articles and in the monograph: "Diseases of monkeys under environmental conditions of Vietnam".

Laboratory of Pathological Anatomy together with the Laboratory and later the Department of Experimental Oncology carried out extensive studies on modeling hemoblastosisin monkeys, replicated viral non-Hodgkin's lymphoma on hamadryas baboons, isolated its associated viruses, anddefined thehorizontal disease transmission.In 2002, participants of the studies (B.A. Lapin, L.A.Yakovleva, L.V. Indzhiya, V.Z. Agrba, M.G. Chikobava) wonNational Awards for Science.It is worth emphasizing, that this work was performed mainly in Sukhum.

In 1986, was established the Department of Experimental Oncology (headed by L. Yakovleva), which consisted of three Laboratories, each headed by young and talented post-doctoral fellowsof the Institute A. Voevodin, V. Agrbaand A. Dyachenko.

Paying tribute to each of them, it is necessary to note the Head of the Laboratory of Oncogenic Viruses of Primates V.Z. Agrba; in 1992-1994,as the Head of the Laboratory, she did a lot to preserve the Institute at that most challenging time.Today she is the Head of the Laboratory of Immunology and Cell-Biology in the Research Institute of Medical Primatology in Adler. Since 1994, the Head of the Laboratory of Oncogenic Viruses of Primates in Sukhum is V.V. Timanovskaya, Candidate of Biological Sciences

and in 1984, Laureate of the USSR Academy of Medical Sciences named after V.D. Timakov.

Some brief information on the Laboratory of Endocrinology established in 1961 and headed by graduate of the Leningrad Graduate School N.P. Goncharov.The Laboratory, together with biochemists from the GDR, were studying a number of theoretical problems of endocrinology, while simultaneously developing immunological methods for determining sex and adrenal steroid hormones.The Laboratory developed a technology for obtaining kits to determine them.The kits covered the needs of almost all the Laboratories of the country, because before, such kits were procured externally and were very expensive.

Subsequently, the Laboratory was reorganized into the Department of three Laboratories, one of which was headed by Doctor of Science G. Katsia.

NikolayPetrovich and Gulnara Katsiya moved to Moscow and toiled successfully in the Endocrinology Center of the USSR Academy of Medical Sciences. It is necessary to mention, that NadezhdaDmitrievnaGoncharova,wh o later became Doctor of Science and headed the Laboratory of Experimental Endocrinology in the Research Institute of Medical Primatology, was working in the Laboratory of Nikolay Petrovich.

One word about the start of radiobiological studiesand consequently the development of the Radiobiology Laboratory.Radiobiological studies started quite unexpectedly. The Biomedical Station suddenly received two powerful X-ray therapy units, followed by the order from the Deputy Minister of Health A.I. Burnazyan to start radiobiological studies on monkeys. It was, in fact, new direction, in which the scientific staff of the Biomedical Station had no experience.The Head of the Station A.I. Utkinreassigned the Research Assistant L.A.Yakovlevato the post of Senior Researcherof the newly established Radiobiology Laboratory, entrusting her to start radiobiological research.

Physicists of the Sukhum Institute of Physics and Technology (SIPT) conducted classes in the physics and dosimetry of ionizing radiation for the LaboratoryofRadiobiology, the Laboratory of Infectious Pathology and the Laboratory of Pathological Anatomy staff members, and under the design of theInstitute of Biophysics of Academy of Sciencesconstructedtwo irra-

diators (for high-dose irradiation and for prolonged low-dose irradiation-withionizing radiation).

With the help of the second irradiator were conducted literally unique researches of E.K. Dzhikidze and L.A.Yakovleva, during which monkeys wereexposed to low doses of radiationfor months and years, 1-5 x-rays, equivalent to those that can be received during stays in outer space or continuous work on nuclear stations.

Immunological changes and peculiarities of the progress of some infections irradiated by gamma rays, as well as remote consequences of the fractional long-term low-dose gamma-ray irradiation were studied.

Highly qualified radiobiologist L.F. Semenov, anexpert from Leningrad in the field of study related to radioprotectorsbecamethe Head of the Laboratory of Radiobiology.

The Laboratory soon recruited new staff members experienced in working with radiation: B. Fedorov and graduate of the Institute of Hematology and Blood Transfusion V. Barkaya, who is currently the Deputy Director of Research, and the Head ofthe Department (that consists of the Biochemistry and Hematology Laboratories) of the Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia. Speaking of the Laboratory of Hematology, it is necessary to mention such highly qualified staff members as the Senior Researcher and Candidate of Biological SciencesV.N.Fomenko and Zh.V. Elistratov, who made great contributions to the scientific developments of the Laboratory. Separately, we should recoll Senior Researcher and Candidate of Biological Sciences Khashig N.E., who later headed unfortunately for a short time laboratory of biochemistry.

Finally, mention must be made of the Laboratory of Higher Nervous Activity (later the Department consisting of three Laboratories). Talented Doctors of Science, who defended thesis at the Institute, headed the Laboratories. Paying tribute to each of them, we want briefly turn to the work of D.I.Miminoshvili, G.M.Cherkovich, and G.I.Magakyan, who managed to induce in monkeys of 2 species “purely human” illnesses: hypertension, coronary insufficiency, myocardial infarction.

These studies caused a stir and provided a basis for many years of research with American physiologists who came to Sukhum often for a very long time to work together.

A statement has to be made in regard to the large so-called "space program", within the framework of which, together with other Institutes, primarily with the State Scientific Center of the Russian Federation –the Institute for Biomedical Problems, firsttime a unique model of prolonged clinostatichypokinesia of monkeys was developed, which allows simulating the zero gravity environment factors. 1983-1996, after ground trainings,12 (in 6 pairs) rhesus macaques went into space and returned safely.

For this work, the team-members of Sukhum scientists (G.S.Belkaniya, T.G.Urmancheeva, etc.),including the current Head of the Laboratory, Candidate of Biological Sciences, A.A.Dzhokua, were awarded with the silver medal of the All-Union Exhibition of Economic Achievements.

Last year, together with the Endocrinology Center (N.P.Goncharov, Moscow), a multifaceted study of the biological role of the steroid hormone DHEA in experiments on monkeys of different age groups was completed. Fragment of the study "On the neuroprotective properties of DHEA" is presented at international symposiums in Chicago and Vienna.

In the premises of the Institute functions the Department of Experimental Biology and Medicine. The academicians who initiated the establishment of the Department in 1981 were A.A.Gvaramia and B.A. Lapin, who headed the Department from 1981to 1992. After the cessation of hostilities, the work of the Department resumed in 1996. From 1998 to 2016, the Head of the Department was Z.V. Shevtsova, who adopted the curriculum of the Department for the professional diploma in "medical biochemistry". Mainly the staff of the Institute represent the staff of the Department;all full Professors of the Department have academic degrees.

Since its foundation the Department prepared more than 300 graduates, 14 of them have defended their doctoral theses, and two have started their doctoral thesis – A.Z. Matua, and L.O. Akhuba, who copes well with the responsibilities of the Head of the Department.

Four of our Department graduates head the Laboratories ofthe Scientific-Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy

of Sciences of Abkhazia(SRIEPT ASA) and one graduate heads the laboratory in the Research Institute of Medical Primatology in Adler; others work in Research Institutes and the healthcare system in Abkhazia and beyond.

The Patriotic War of the Peoples of Abkhazia 1992-93 did tremendous damage to the Institute. Of more than 3.5 thousand monkeys on the territory of Abkhazia, 150 remained by the end of the war; the facilities of the Institute werecompletelydestroyed. It would seem that theSRIEPT had ceased to exist. However, the staff of the Institute took the whole thing as a personal tragedy. Otherwise, how might be explained the fact that they, risking their lives under shelling, were gathering fruits and vegetables for monkeys in abandoned gardens, bringing food from their homes. Full credit for the fact that today the Institute comes to life must be given to them.

I cannot fail to mention the important role of theInstitute of Experimental Pathology and Therapy, the Research Institute of Medical Primatology, of the Academician B. A. Lapin, the Director S.V. Orlov and all their staff who are doing everything in their power to restore the World's first Primatology Center the Scientific-Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhaziato its former glory.

A huge gratitude to the Academy of Sciences of Abkhazia and its President, Academician Z.D. Dzhapua, and to the top leadership of the Republic of Abkhazia, who share our concern about the fate of the Institute, and atthis challenging time, are doing a lot to restore and develop the Institute.

I.
ПРИМАТОЛОГИЯ:
ИНФЕКЦИОННАЯ ПАТОЛОГИЯ, ИММУНИТЕТ, КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ПРИМАТОВ, ГЕМОСТАЗ, ПОВЕДЕНИЕ, РАЗНОЕ

I.
PRIMATOLOGY:
INFECTIOUS PATHOLOGY, IMMUNITY, PRIMATE CELL CULTURES, HEMOSTASIS, BEHAVIOR, MISCELLANEOUS

РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЛЕТНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВИРУСНОЙ ПАТОЛОГИИ ОБЕЗЬЯН СУХУМСКОГО ПИТОМНИКА И МОДЕЛИРОВАНИЯ НА НИХ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА

Шевцова З. В.
Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии АНА

Резюме

В обзоре представлены данные по характеристике шести спонтанных вирусных инфекций низших обезьян Старого Света, вспышки которых наблюдались в Сухумском питомнике: корь, полиомиелит, гепатит А, энцефаломиокардит, коронавирусная инфекция и геморрагическая лихорадка обезьян. Выделены и идентифицированы возбудители, с помощью которых на обезьянах воспроизведены экспериментальные инфекции. На полученных моделях изучены вопросы патогенеза и эпидемиологии этих заболеваний. Кроме того, показана эффективность вакцин против полиомиелита, кори и гепатита А. Подчёркивается важность приоритетных данных по изучению неизвестного ранее заболевания – геморрагической лихорадки обезьян (ГЛО) и открытию её возбудителя – нового вируса «Сухуми», включенного как самостоятельный вид в семейство артеривирусов. На полученной с его помощью экспериментальной ГЛ макак изучен ряд важных патогенетических механизмов, общих для различных ГЛ. Эта модель является единственной безопасной и адекватной для оценки средств терапии таких смертельно опасных для человека геморрагических лихорадок как Эбола и др.

Ключевые слова: низшие обезьяны Старого Света, спонтанные и экспериментальные вирусные инфекции.

THE RESULT OF LONG-TERM STADIES OF VIRAL PATHOLOGY IN MONKEYS OF SUKHUM NURSERY AND MODELING OF HUMAN INFECTIONS ON THEM

Shevtsova Z. V.
Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Abkhazian Academy of Sciences

Abstract

The data on characteristic of six spontaneous viral infections of nonhuman Old World monkeys which outbreaks were observed in Sukhum nursery: measles, poliomyelitis, hepatitis A, encephalomyocarditis, coronavius infection and simian hemorrhagic fever are presented in the review. Their pathogens were isolated and identified, and experimental infections were reproduced by means of them. Pathogenesis and epidemiology of these diseases were studied on obtained models. Besides, the efficiency of poliomyelitis, measles and hepatitis A vaccines was shown. It is emphasized the importance of priority data on the study of unknown before disease – simian hemorrhagic fever (SHF) and discovery of its pathogen – the new virus *Sukhum,* inserted as an original species in the family of arteriviruses. Several important pathogenic mechanisms common for various HF were studied using experimental HF of macaques obtained with the help of this virus. This model is unique safe and adequate for evaluation of the means of therapy of such dangerous for human health HF as Ebola fever and others.

Key words: Old World nonhuman primates, spontaneous and experimental infections.

Сведения о вирусной патологии обезьян представляют интерес в двух аспектах. Прежде всего, это данные о естественной инфицированности обезьян разными вирусами и о вспышках спонтанных инфекций. Они необходимы приматологическим учреждениям как для сохранения здоровья стада, так и для принятия мер по предотвращению возникновения эпизоотий среди обезьян и передачи опасных возбудителей обслуживающему персоналу. В условиях питомников происходит обмен вирусами как между обезьянами разных видов, так и

между обезьянами и человеком. В большинстве случаев в результате такого обмена развивается легкая, скрытая инфекция с образованием соответствующих антител. Однако некоторые вирусы, мало патогенные для своих естественных хозяев, вызывают тяжелое заболевание у новых. Наиболее ярким примером является смертельный энцефаломиелит у человека при инфицировании вирусом герпеса В обезьян. Трагическим эпизодом является и Марбургское заболевание людей, получивших вирус от зеленых мартышек. Следствием обмена между разными видами обезьян является целая серия эпизоотий смертельной геморрагической лихорадки азиатских макак при передаче им вируса от внешне здоровых африканских обезьян. Следует также иметь в виду активацию латентных вирусов и развитие спонтанных инфекций обезьян в результате снижения защитных свойств организма. Другой аспект представляет интерес в плане использования обезьян для моделирования вирусных инфекций человека, что имеет большое значение для практического здравоохранения.

Исследования по инфекционной вирусной патологии обезьян были начаты в экспедиционном порядке в 50-е годы XX века на базе Сухумской медико-биологической станции АМН СССР. Они проводились в течение нескольких лет группой ученых под руководством академика М.П. Чумакова и профессора М. К. Ворошиловой. Была описана спонтанно возникшая в 1957 г. среди макак резусов вспышка полиомиелита [4]. Заболевание протекало с характерными клинико-патоморфологическими признаками. От больных обезьян был выделен вирус полиомиелита II типа. Серия экспериментов была посвящена воспроизведению полиомиелита в опытах по заражению 206 обезьян 4 видов. Из них заболели 98, причем у 96 из них наблюдались парезы и параличи нижних конечностей и характерные изменения в передних рогах спинного мозга. На экспериментальной модели были изучены вопросы патогенеза и иммуногенеза инфекции и показана иммуногенность живого ослабленного полиовируса [3, 5]. Полученные данные сыграли важную роль в изучении патогенеза, иммунологии и эпидемиологии полиомиелита и легли в основу его профилактики.

В эти же годы в экспедиционном порядке под руководством акад. П.Г. Сергиева были начаты эксперименты по изучению кори. При зара-

жении материалами от больных макак резусов и павианов гамадрилов было воспроизведено доброкачественно протекающее заболевание с характерными для кори признаками. В результате перенесенной инфекции формировался стойкий иммунитет к повторному заражению [24]. В 1954 г. была описана вспышка кори, возникшая спонтанно. Из 92 сидевших в одном помещении обезьян заболела 31. В ходе эпидемии выявилась различная восприимчивость к вирусу кори обезьян разных видов. У макак резусов и павианов гамадрилов заболевание протекало в клинически выраженной форме, у яванских макак и зеленых мартышек – в виде инаппарнтной инфекции [22].

В 1961 г. в НИИЭПиТ АМН СССР было начато создание постоянной базы для вирусологических исследований по инфекционной патологии обезьян. Они проводились штатными сотрудниками вирусологической группы под руководством к.м.н. З.В. Шевцовой в составе лаборатории инфекционной патологии (зав. д.м.н. Э.К. Джикидзе). В течение 20 лет группа выполняла исследования по самостоятельной научной тематике, основным направлением которой было сравнительное изучение вирусных инфекций обезьян и человека. В 1981 г. на базе группы была организована лаборатория инфекционных вирусов обезьян (зав. – д.м.н. З.В. Шевцова), переименованная в 2005 г. в лабораторию иммунологии и вирусологии функционирующую по настоящее время.

В первые же годы (1962 – 1964) сотрудники группы приняли участие в исследованиях, проводимых под руководством академика П.Г. Сергиева по экспериментальной кори обезьян, изучению патогенеза и вакцинального процесса, развивающегося при введении живых ослабленных штаммов вируса кори [24, 25]. Эти работы внесли ценный вклад в разработку профилактики кори.

Был создан банк сывороток обезьян питомника. Проведенное серологическое исследование сывороток семи видов обезьян Старого Света выявило антитела к широкому спектру вирусов обезьян и человека. Инфицированность ими, как правило, не сопровождалось выраженными клиническими признаками. Однако в ряде случаев наблюдалась активация этих агентов и развитие инфекций. Чаще это было следствием ослабления защитных свойств организма после облучения обезьян, либо после их отлова и акклиматизированного стресса.

В таблице 1 представлены в хронологическом порядке сведения о наблюдавшихся в питомнике спонтанных заболеваниях и выделенных вирусах. О вспышке кори и полиомиелита было упомянуто выше. Вторая вспышка кори наблюдалась нами в 1962 г. среди ассамских макак. Из 17 обезьян, размещенных в двух смежных клетках и получавших длительное время (14 мес.) малые дозы γ-лучей, заболели 14. Инфекция протекала тяжело, с характерными для кори осложнениями, от которых погибли 10 обезьян [8].

Таблица 1

Спонтанные вирусные инфекции обезьян Сухумского питомника

Нозологические формы	Годы	Виды обезьян	Выделенные вирусы	Семейства
Корь	1954 1962	макаки резус, павианы гамадрилы, макаки ассамские	Вирус кори человека	Paramixoviridae
Полиомиелит	1957	макаки резус	Вирус полиомиелита человека	Picornaviridae
Геморрагическая лихорадка обезьян – ГЛО	1964, 1967 1974	макаки резус макаки лапундеры, красные обезьяны	Вирус ГЛО штамм «Сухуми-64»	Arteriviridae
Энцефаломиокардит	1970 1978	макаки резус павианы гамадрилы	Вирус энцефаломиокардита штамм ЭМК-70	Picornaviridae
Конъюнктивит Пневмония	1972 1973	макаки резус павианы гамадрилы	Аденовирус обезьян SA-14	Adenoviridae
Язвенный стоматит	1974	макаки резус	Вирус герпеса В обезьян	Herpesviridae

Полиомиелитоподобное заболевание	1981 – 1982	макаки резус	Энтеровирус обезьян SV-49	Picornaviridae
Пневмония и (или) энтероколит	1982 – 1986	макаки резус павианы гамадрилы	Коронавирус обезьян штамм КВМР Штамм КВПГ	Coronaviridae
Гепатит А	1985 – 1992	макаки яванские, макаки бурые, макаки резус, зеленые мартышки, павианы гамадрилы	Вирус гепатита А штаммы: ВГА-МР, ВГА-ЗМ, ВГА-ПГ	Picornaviridae

Геморрагическая лихорадка обезьян. Эта инфекция занимает особое место в наших исследованиях. В 1964 г. в партии макак резусов, привезенных из Индии, тяжело заболели и погибли 55 обезьян, а также 9 макак стада питомника. Основными клинико-патоморфологическими проявлениями были геморрагический диатез и признаки нарушения неврологического статуса. Это новое, неизвестное ранее заболевание было названо нами геморрагической лихорадкой обезьян (ГЛО), и установлена его вирусная этиология [16, 26]. Изучение свойств выделенного от больных обезьян вируса позволило сделать вывод о том, что он является новым [26]. Штамм вируса, обозначенный «Сухуми-64», был принят в Государственную коллекцию вирусов МЗ СССР (при Институте вирусологии АМН СССР) как самостоятельный вид, выделенный З. В. Шевцовой в 1964 году[1]. Спустя два года после наших первых сообщений (1966, 1967 гг.) [16, 17], появились публикации американских исследователей о том, что в колонии макак Национального института здоровья (NIH) в Бетезде в конце 1964 г. наблюдалась эпизоотия сходного заболевания привезенных из Индии обезьян [55]. Выделен-

[1] Свидетельство подписано академиком В.М. Ждановым, являвшимся членом Международного комитета по таксономии и классификации вирусов.

ный штамм вируса ГЛО они обозначили NIH (позже Bethesda-64) [57]. После обмена штаммами американскими учеными было обнаружено сходство их культуральных и антигенных свойств [54]. Результаты наших исследований свидетельствовали о том, что штаммы «Сухуми-64» и «Бетесда-64» антигенно родственны, но не идентичны [50]. Вторая небольшая вспышка ГЛО среди макак Сухумского питомника наблюдалась в 1967 г. и также была связана с привозом обезьян из Индии. В течение полутора месяцев погибло 40 обезьян. Источник инфекции оставался неизвестным. Инфекцию азиатским макакам могли передать африканские обезьяны, у которых, как нами ранее было показано, после экспериментального заражения развивается инаппарантная инфекция с вирусемией [27]. Это подтвердилось при третьей вспышке ГЛО, возникшей в Сухумском питомнике в 1974 г., когда погибли 9 макак лапундеров, размещенных в одном помещении с красными обезьянами [35]. Позже появились дополнительные доказательства, что красные обезьяны переносят хроническую персистентную инфекцию и являются вирусоносителями [44]. О том, что ГЛО является серьезной проблемой приматологических учреждений, свидетельствуют продолжавшиеся эпизоотии этой инфекции: к 1996 г. их насчитывалось 17 [51]. Количество погибших макак в некоторых колониях колебалось в пределах 200 – 500 [18]. Природный резервуар вируса, по-видимому, находится в дикой природе. В пользу этого свидетельствует получение изолятов вируса от внешне здоровых обезьян разных видов: как от диких, так и от обитающих в Национальных парках Уганды, Танзании, Конго [52, 59]. Это позволяет предположить, что в Африке существует комплекс родственных вариантов вируса, в циркуляции которых участвуют обезьяны. К настоящему времени группой американских и российских вирусологов (с нашим участием) подробно изучены 12 изолятов вируса ГЛ обезьян, отличающихся друг от друга по степени гомологии геномов. Международный комитет по классификации и таксономии вирусов выделил их в отдельный род семейства артеривирусов обезьян. В этот род «Сухуми-64» включен как самостоятельный вид Sukhumi simarterivirus под названием Simian hemorrhagic encephalitis virus (SHEV) и принят в Genbank USA с собственным кодовым номером [48]. То, что он был открыт первым, подтверждает наш приоритет.

Энцефаломиокардит. В 1970 г. погибли 2 макаки резус стада питомника с явлениями энцефалита и миокардита [39]. От этих обезьян был выделен вирус, обозначенный нами ЭМК-70, идентичный прототипному штамму ЭМК-Париж [28]. В 1978 г. случаи этого заболевания наблюдались среди павианов гамадрилов в условиях полувольного содержания в Гумистинском заказнике. С 1982 по 1988 г. в питомнике погибло еще 6 макак резусов и 15 павианов гамадрилов. Энцефаломиокардит продолжает оставаться серьёзной проблемой для колоний и зоопарков, о чем свидетельствуют сообщения о вспышках фатальной инфекции в период с 1980 по 2007 г. В зоопарках во Флориде болели и погибли гиббоны, шимпанзе, павианы [42], в Сан-Антонио – павианы [45]. Фатальные вспышки прекратились после использования радикальных средств борьбы с грызунами. С 2001 по 2007 г. вспышки этой инфекции наблюдались и в Адлерском питомнике. В 2007 г. в вольере из 46 павианов гамадрилов погибло 37 особей. Изолят вируса оказался близок к штамму Менго [10].

Аденовирусная инфекция. В 1972 и 1973 гг. в питомнике были две небольшие вспышки этой инфекции. У макак резусов она протекала в виде конъюнктивита, у павианов гамадрилов – с признаками пневмонии. В обоих случаях выделенные изоляты вируса были идентифицированы как обезьяний вирусный агент SV-37 [58].

Энтеровирусное полиомиелитоподобное заболевание. Этиологическим агентом наблюдавшихся в 1981 – 1982 гг. групповых случаев этого заболевания макак резусов был вирус обезьян – SV-49. Клиническими проявлениями были: анорексия, нарушение двигательной активности нижних конечностей, их атрофия с развивающейся контрактурой. Гистологически наблюдался миозит нижних конечностей и миелит на уровне поясничных сегментов с выпадением нейронов передних рогов спинного мозга у погибавших в поздние сроки обезьян [33].

Герпесвирусная инфекция. В 1974 г. у макак резусов, перенесших лучевую болезнь, наблюдался язвенный стоматит. Из изъязвленных участков полости рта был выделен вирус герпеса В обезьян, антигенно родственный вирусу простого герпеса человека [2]. Известно, что у макак эта инфекция протекает в латентной форме. Однако в случаях снижения резистентности могут развиться изъязвления в ротовой по-

лости и вокруг ротового отверстия и даже с тяжелыми церебральными поражениями и гибелью [37]. Для человека этот вирус чрезвычайно опасен: все случаи заражения заканчивались развитием смертельного энцефаломиелита [47].

Коронавирусная инфекция. Прижизненное вирусологическое и серологическое обследование отдельных групп макак резусов и павианов гамадрилов (1982 – 1986 гг.) выявило значительную инфицированность их коронавирусами [14]. Из 182 обезьян коронавирусы были обнаружены в органах 94 (кишечник и легкие). Спонтанная коронавирусная инфекция была охарактеризована как персистентная с периодическими обострениями в виде пневмонии и (или) энтероколита [6]. Выделенные от макак резусов и павианов гамадрилов штаммы КВМР и КВПГ приняты в Государственную коллекцию вирусов МЗ СССР как оригинальные.

Гепатит А. Следует подчеркнуть приоритетность данных по спонтанному гепатиту А. Вопреки существовавшему мнению нами впервые была показана естественная чувствительность к вирусу гепатита А низших обезьян Старого Света [9]. Эпизоотии гепатита А у 5 видов этих обезьян изучены и описаны совместно с сотрудниками Института вирусологии АМН СССР и Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. Дана комплексная вирусологическая, серологическая, биохимическая и патоморфологическая характеристика заболеваний [1, 11, 30]. Следует подчеркнуть, что все эпизоотии наблюдались в партиях обезьян новопривезенных из мест естественного обитания, находящихся в состоянии акклиматизационного стресса (период с 1985 по 1992 г.). От больных обезьян было получено три культуральных штамма: ВГА-МР, ВГА-ЗМ и ВГА-ПГ [12], которые зарегистрированы как оригинальные в Государственной коллекции вирусов МЗ СССР. Следует отметить важность получения штамма вируса ВГА человека, патогенного для обезьян – Авторское свидетельство [34].

Вторая часть нашего исследования посвящена моделированию на обезьянах вирусных инфекций. Данные представлены в таблице 2. Выявленное сходство вышеописанных заболеваний обезьян и их возбудителей явилось основой для получения моделей [15]. Об использовании моделей полиомиелита и кори было изложено выше (с. 2).

Экспериментальная коронавирусная инфекция была воспроизведена на макаках резусах и павианах гамадрилах с помощью штаммов, выделенных от этих обезьян, антигенно родственных коронавирусу ОС-43 человека [6]. Инфекция, сходная со спонтанной, была охарактеризована как персистентная с латентным течением и периодическими обострением в виде пневмонии и (или) энтероколита [7].

Экспериментальный энцефаломиокардит был воспроизведен на 25 обезьянах четырех видов [38]. Показана способность вируса ЭМК-70 вызывать в организме обезьян изменения в головном мозге и миокарде. Изменения на ЭКГ в остром периоде сходны с таковыми, наблюдающимися у людей при инфаркте миокарда. Изложенные выше данные литературы свидетельствуют о том, что энцефаломиокардит является серьезной проблемой для многих приматологических учреждений. Экспериментальная модель на обезьянах остается актуальной и используется для испытания на ней вакцин и терапевтических препаратов [41].

Таблица 2

Модели вирусных инфекций

Инфекция	Использованный вирус	Вид обезьян	Что изучено	Ссылки
Полиомиелит	Полиовирус человека	Макаки резус, макаки яванские, зеленые мартышки, павианы гамадрилы	Патогенез, эпидемиология, испытание вакцинных штаммов	[3, 5]
Корь	Вирус кори человека	Макаки резус, павианы гамадрилы	Патогенез, вакцинальный процесс	[24, 25]
Коронавирусная	КВМР	Макаки резус	Клинико-патоморфологическая характеристика	[7]

Энцефаломиокардит	ЭМК-70	Макаки резус, павианы гамадрилы, зеленые мартышки, красные обезьяны	Клинико-патоморфологическая характеристика	[38]
Гепатит А	Гепатит А человека	Макаки резус	Клинико-патоморфологическая характеристика, патогенез, испытание вакцины	[31, 32, 36]
ГЛО	«Сухуми-64»	Макаки резус	Клинико-патоморфологическая характеристика, патогенез, танатогенез	[19, 27, 29]

Экспериментальный гепатит А был воспроизведен на обезьянах четырех видов (макаки резусы и яванские, зеленые мартышки, павианы гамадрилы) с помощью штаммов, выделенных от обезьян и штамма от больного человека [31, 56]. Наиболее значимой и изученной является модель на макаках резусах, воспроизведенная с помощью штамма ВГА-Ч. Эта модель не менее адекватна, но экономически более выгодна и доступна, чем предшествующие аналоги на шимпанзе и мармозетах. На ней получены приоритетные результаты о хроническом течении инфекции с персистенцией вируса гепатита А [32]. Эти данные внесли новое понимание в эпидемиологию гепатита А: длительное сохранение вируса в иммунном организме чувствительных к нему приматов позволяет считать его резервуаром инфекции в межэпидемический период. На модели макак резусов испытана культуральная инактивированная вакцина против гепатита А предоставленная

учеными ФРГ Ф. Дейнхардтом и Б. Флемигом. Выявлены ее хорошие протективные свойства при проверке заражением патогенным штаммом ВГА человека [36]. В последние годы использование вакцин со сходной технологией изготовления показало их высокую эффективность при иммунизации людей.

Экспериментальная ГЛО. С помощью вируса «Сухуми-64» на макаках нами была воспроизведена геморрагическая лихорадка, сходная со спонтанной [49]. На этой модели изучены вопросы патогенеза инфекции. Была показана тропность вируса к клеткам ретикуло-эндотелиальной – моноцитарно-макрофагальной системы (ММС). Гибель этих клеток ведёт к освобождению тканевых прокоагулянтов с повышением свёртывания крови. Первичная фаза гиперкоагуляции сменяется гипокоагуляцией. Характер коагулограмм соответствует наблюдаемым при тромбогеморрагическом синдроме (ТГС) с развивающемся при этом синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) [19, 27]. Аналогичные данные были получены рядом авторов при изучении геморрагической лихорадки Эбола: о тропности вируса к клеткам эндотелия и макрофагам [21] и о том, что коагуляционные нарушения являются следствием первичной тропности этого вируса к клеткам ММС [43]. Сравнение полученных результатов с имеющимися в литературе данными свидетельствует о том, что в основе патогенеза различных ГЛ лежат общие патофизиологические механизмы. Для их изучения адекватной моделью можно считать только обезьян, так как лишь у них эти заболевания протекают в сходной форме. Учитывая вышеизложенное и отсутствие патогенности вируса «Сухуми-64» для людей, воспроизведенная с его помощью на макаках экспериментальная геморрагическая лихорадка была предложена нами в 1974 году как модель геморрагических лихорадок человека [27, 29].

В настоящее время повысился интерес и к вирусу, и к модели, что объясняется возросшим эпидемическим потенциалом особо опасных геморрагических лихорадок человека и возможностью их интродукции на неэндемичные территории [13, 20]. Актуальность проблемы обусловлена и внесением их возбудителей в список биотеррористических агентов. Особенно тревожная ситуация сложилась относительно лихорадки Эбола. С 1976 г., когда эта инфекция заявила о себе в Суда-

не, Заире и других странах Африки, вспышки заболевания продолжаются с перерывами 2 – 4 года, с летальностью от 25% до 90%. Самую крупную вспышку, наблюдавшуюся в Западной Африке в 2014 г., ВОЗ объявила чрезвычайной, имеющей в области здравоохранения международное значение. В ряде стран вспышки заболевания людей совпали с множественной гибелью в ближних лесах горилл и шимпанзе. Существует опасность резкого сокращения в природе человекообразных обезьян [40, 53]. Установлено, что источником заражения людей являются больные и погибшие обезьяны.

Средства терапии и профилактики ГЛ человека отсутствуют. Для проверки разрабатываемых препаратов необходима экспериментальная модель. Использование обезьян как единственных животных, у которых эти заболевания протекают в сходной с человеком форме, ограничено из-за опасности работы с их возбудителями. Описаны смертельные случаи при лабораторном заражении [23]. В литературе поднимается вопрос о необходимости использования вируса ГЛО и предложенной нами экспериментальной геморрагической лихорадки макак как единственной безопасной и адекватной модели для оценки разрабатываемых средств терапии опасных для человека геморрагических лихорадок. Исследованиям в этой области придается большое значение [46].

Представленные данные свидетельствуют о том, что исследования, проведенные на обезьянах Сухумского питомника, являются важной частью того вклада, который обезьяны внесли в проблему изучения и профилактики вирусных инфекций человека. Следует иметь в виду, что и в настоящее время для приматологических центров, колоний и зоопарков сохраняется опасность возникновения эпизоотий при ввозе обезьян из мест естественного обитания, инфицированных опасными вирусами. Мерами предупреждения являются: строгое соблюдение карантина и серологическое и вирусологическое обследование обезьян. Актуальным остаётся использование моделей вирусных инфекций для испытания терапевтических и профилактических средств. Во избежание активации латентных вирусов (герпес В обезьян, вирус иммунодефицита обезьян и др.) наиболее эффективным является разведение обезьян, свободных от этих опасных патогенов [41, 60].

Литература

1. Анджапаридзе А.Г., Шевцова З.В., Корзая Л.И. и др. Признаки естественной инфекции гепатита А у бурых макак. Вопр. вирусол., 1987, №5, с. 541 – 544.
2. Васильева В.А., Шевцова З.В., Иванов М.Т., Дьяченко А.Г. Изучение свойств вируса герпеса, выделенного от макак резусов. Реф. Журнал «Биология», 1976, 10 (1), с. 47.
3. Ворошилова М.К. Экспериментальный полиомиелит у обезьян. В кн.: Теоретические и практические вопросы медицины и биологии в экспериментах на обезьянах. Под ред. И.А. Уткина. Медгиз, 1956, с. 165 – 178.
4. Ворошилова М.К., Лапин Б.А., Голубева Н.Н. и др. Вспышка полиомиелита среди обезьян, спонтанно возникшая в Сухумском питомнике. Материалы конференции по биологии и патологии обезьян. Тезисы докладов. Сухуми, 1961, с. 20 – 21.
5. Ворошилова М.К., Чумаков М.П. Резистентность и антитела у обезьян, иммунизированных разными типами вируса полиомиелита. В кн.: Аннотации научных работ АМН СССР за 1954 год. Медгиз, 1955, с. 388.
6. Гончарук Е.И., Шевцова З.В., Румель Н.Б. и др. Спонтанная коронавирусная инфекция обезьян. ЖМЭИ, 1994 (приложение), август – сентябрь, с. 109 – 114.
7. Гончарук Е.И., Шевцова З.В., Крылова Р.И. и др. Коронавирусная инфекция обезьян как модель инфекции человека. ДАН (вирусология), 1992, т. 325, №4, с. 845 – 848.
8. Джикидзе Э.К., Шевцова З.В. Вспышка кори среди обезьян, подвергавшихся длительному облучению в малых дозах. Вопросы физиологии, экспериментальной патологии и радиобиологии. Сухуми, 1965, с. 302 – 330.
9. Дорошенко Н.В., Шевцова З.В., Стаханова В.М. и др. Чувствительность макак резусов и яванских к вирусу гепатита А человека. Вопросы вирусологии, 1990, №4, с. 299 – 303.
10. Калайджян А.А., Агумава А.А., Альховский С.В. и др. Расшифровка вспышки острого инфекционного миокардита среди павианов гамадрилов Адлерского питомника обезьян. Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии. Материалы Сочинской третьей международной научной конференции. Сочи – Адлер, 2016, т. 1, с. 243 – 250.
11. Корзая Л.И., Шевцова З.В., Джелиева З.Н. и др. Спонтанный и экспериментальный гепатит А павианов гамадрилов. Вопросы вирусологии, 1992, №4, с. 187 – 191.

12. Корзая Л.И., Шевцова З.В., Лапин Б.А. и др. Получение и характеристика культуральных штаммов вируса гепатита А человека и обезьян. Вопросы вирусологии, 1997, №2, с. 60 – 63.
13. Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней. ЖМЭИ, 2008, №1, с. 17 – 23.
14. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. и др. Проблемы инфекционной патологии обезьян. Москва, РАМН, 2004.
15. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Шевцова З.В. и др. Моделирование инфекционных заболеваний человека на лабораторных приматах. Сочи, 2011.
16. Лапин Б.А., Пекерман С.М., Яковлева Л.А. и др. Геморрагическая лихорадка обезьян. Вопросы вирусологии, 1967, №2, с. 168 – 173.
17. Лапин Б.А., Шевцова З.В. Изучение вирусной геморрагической лихорадки обезьян. Тезисы IX Международного конгресса по микробиологии. Москва, 1966, с. 465 – 466.
18. Лапин Б.А., Шевцова З.В. К 50-летию открытия геморрагической лихорадки обезьян и вируса ГЛО. Вопросы вирусологии, 2015, т. 60, №1, с. 5 – 11.
19. Лапин Б.А., Шевцова З.В. Экспериментальная геморрагическая лихорадка макак как модель геморрагических лихорадок человека. Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии. Материалы Сочинской третьей международной научной конференции. Сочи – Адлер, 2016, т. 1, с. 121 – 132.
20. Маркин В.В., Марков В.И. Вирусные геморрагические лихорадки – эволюция эпидемического потенциала. ЖМЭИ, 2002, №1, с. 91 – 98.
21. Рябчикова Е.И., Лучко С.В., Гражданцева А.А., Рассадкин Ю.Н. Опыт использования лабораторных приматов при изучении вирусной геморрагической лихорадки Эбола. В кн.: Перспективные направления использования лабораторных приматов в медико-биологических исследованиях Материалы Всесоюзной конференции. Сочи – Адлер, 2006, с. 32 – 38.
22. Рязанцева Н.Е. Вспышка кори среди обезьян. ЖМЭИ, 1956, №4, с. 88.
23. Сёмина Н.А., Ковалёва Е.П. Заболевания медработников особо опасными инфекциями, ассоциированными с лабораторными заражениями. Эпидемиология. Вакцинопрфилактика, 2005 (20), с. 23 – 28.
24. Сергиев П.Г., Рязанцева Н.Е., Шройт И.Г. Материалы по патогенезу кори. Педиатрия, 1963, №2, с. 28 – 35.
25. Сергиев П.Г., Шройт И.Г., Челышева Е.М. и др. Материалы по патогенезу кори и вакцинального процесса. Acta virol., 1966, No. 5, с. 430 – 439.
26. Шевцова З.В. Дальнейшее изучение вируса геморрагической лихорадки обезьян. Вопросы вирусологии, 1969, №5, с. 604 – 607.

27. Шевцова З.В. Геморрагическая лихорадка обезьян макак. Автореферат дисс. докт. мед. наук. Сухуми, 1974, с. 1 – 45.
28. Шевцова З.В., Джикидзе Э.К., Ворошилова М.К. и др. Характеристика вируса энцефаломиокардита, выделенного от больных обезьян. Вопросы вирусологии, 1976, №5, с. 531 – 536.
29. Шевцова З.В., Лапин Б.А., Кармышева В.Я. и др. Геморрагическая лихорадка обезьян – модель для изучения патогенеза геморрагических лихорадок человека. В кн.: Использование обезьян в экспериментальной медицине. Тезисы докладов. Сухуми, 1974, с. 63 – 66.
30. Шевцова З.В., Крылова Р.И., Белова Е.Г. и др. Спонтанный гепатит А со смертельным исходом у макак резусов. Вопросы вирусологии, 1987, №6, с. 686 – 690.
31. Шевцова З.В., Крылова Р.И., Дорошенко Н.В. и др. Экспериментальная модель гепатита А на макаках резусах, зараженных вирусом гепатита А человека. Бюлл. экспериментальной биологии и медицины, 1990, №6, с. 536 – 539.
32. Шевцова З.В., Крылова Р.И., Лапин Б.А. Хроническое течение спонтанного и экспериментального гепатита А у макак резусов с персистенцией вируса. ЖМЭИ, 1991, №6, с. 68 – 72.
33. Шевцова З.В., Корзая Л.И., Лапин Б.А. и др. Материалы вспышки заболевания макак резусов, ассоциированного с энтеровирусом обезьян. Вестник АМН СССР, 1986, №3, с. 26 – 28.
34. Шевцова З.В., Корзая Л.И., Дорошенко Н.В. и др. Штамм Virus hepatitis homonis для моделирования инфекции, изучения патогенеза, иммуногенеза и контроля вакцин. Авторское свидетельство №1547311 от 01.11.1989.
35. Шевцова З.В., Пекерман С.М., Крылова Р.И. Геморрагическая лихорадка обезьян по материалам Сухумского питомника. В кн.: Лапин Б.А. (ред.). Моделирование патологических состояний человека. Москва, 1977, т. II, с. 114 – 118.
36. Шевцова З.В., Флемиг Б., Лапин Б.А. и др. Испытание культуральной инактивированной вакцины гепатита А на макаках резусах. ЖМЭИ, 1995, №2, с. 55 – 59.
37. Daniel M.D., Garcia F.G., Melendez L.V. et al. Multiple herpes virus simiae isolation from a rhesus monkey which died of cerebral infarction. Lab. Anim. Sci., 1975, v. 25, No. 3, p. 303 –
38. Dzhikidze E.K., Shevtsova Z.V., Krylova R.I. et al. Experimental encephalomyocarditis in some monkey species. Exp. Pathol., 1976, vol. 12, No. 8, p. 242 – 249.

39. Dshikidze E.K., Shevtsova Z.V., Krylova R.I. et al. Zur Ätiologie der Encephalomyocarditis von Rhesusaffen. Z. Versuchstierkunde, 1974, Bd. 16, S. 142 – 149.
40. Ebola virus devastates Central African ape population. IPPL News, 2003, v. 30, p. 12 – 31.
41. Emerson C.L., Wagner J.L. Antibody responses in two encephalomyocarditis virus vaccines in rhesus macaques. J. Med. Primatol., 1996, v. 25, No. 1, p. 42 – 45.
42. Gaskin J.M., Jorge M.A., Simpson C.T. et al. The tragedy of encephalomyocarditis virus infection in zoological parks of Florida. Proc. Annu. Am. Assoc. Zoo Vet., 1980, p. 1 – 70.
43. Geisbert T.W., Young H.A., Jahrling P.B. et al. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in Ebola hemorrhagic fever. J. Infect. Dis., 2003, 188 (11). 1618 – 1629.
44. Gravell M., London W.T., Rodriguez M. et al. Simian hemorrhagic fever: new virus isolate from a chronically infected patas monkeys. J. Gen. Virol., 1980, v. 52, p. 99 – 106.
45. Hubbard G.B., Soike K.F., Butler T.M. et al. An encephalomyocarditis virus epizootic in a baboon colony. Lab. Anim. Sci., 1992, v. 42, p. 233 – 239.
46. Johnson R.F., Dodd L.E., Yellayi S. et al. Simian hemorrhagic fever virus infection of rhesus macaques as a model of hemorrhagic fever: clinical characterization and risk factors for severe disease. Virology, 2011, 42 (2): 129 – 140.
47. Kaplan J.E. Herpes virus simiae (B-virus) infection in monkey handlers. J. Infect. Dis., 1988, v. 157, No. 5, p. 1080 – 1090.
48. Kuhn J.H., Lauck M., Bailey A.L., …, Shevtsova Z.V. et al. Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. Arch. Virol., 2016, 161: 755 – 768.
49. Lapin B.A., Shevtsova Z.V., Krylova R.I. Experimental hemorrhagic fever of monkeys. Proceedings 2nd Intern. Congress of Primatol. / Ed. by Hofer H.O. Atlanta, Karger/Basel, 1969, vol. 3, p. 196 – 203.
50. Lapin B.A., Shevtsova Z.V. On the identity of two simian hemorrhagic fever virus strains (Sukhumi and NIH). Z. Versuchstierkunde, 1971, Bd. 13, Nr. 1, S. 21 – 24.
51. Lauck M., Alkhovsky S.V., Bao Y., Shevtsova Z.V. et al. Historical outbreaks of simian hemorrhagic fever in captive macaques were caused by distinct arteriviruses. Journal of Virology. 2015, vol. 89, No. 15, p. 8082 – 8087.
52. Lauck M., Sibley S.D., Hyeroba D. et al. Exceptional simian hemorrhagic fever virus diversity in a wild African primate community. J. Virol., 2013, 87 (1): 688 – 691.

53. Leroy E.M., Rouquet P., Furmenty P. et al. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of Central African Wildlife. Sci., 2004, v. 33, issue 5656, p. 387 – 390.
54. Madden D.L., Fuccillo D.A., Dorosz J.A. et al. Antigenic relationship of two strains of SHFV. Lab. Anim. Sci., 1978. 28 (4): 422 – 427.
55. Palmer A.E., Allen A.M., Tauraso N.M. et al. Simian hemorrhagic fever. I. Clinical and epizootologic aspects of an outbreak among quarantined monkeys. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1968, 17, 404 – 412.
56. Shevtsova Z.V., Lapin B.A., Doroshenko N.V. et al. Spontaneous and experimental hepatitis A in an Old World monkeys. J. Med. Primatol., 1988, v. 17, No. 4, p. 177 – 194.
57. Tauraso N.M., Shelokov A., Palmer A.E et al. Simian hemorrhagic fever. III. Isolation of viral agent. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1968, 17, 422 – 431.
58. Vasilieva V.A., Ivanov M.T., Rumel N.B. et al. Isolation and biological characterization of an adenovirus of rhesus macaques. Acta Biol. Med. Germ., 1978, Bd. 37, Nr. 8, S. 1281 – 1287.
59. Vatter H.A., Donaldson E.E., Huynh J. et al. A simian hemorrhagic fever virus isolate from persistently infected baboons. Virology, 2015, 474, 186 – 198.
60. Ward J.A., Hillard J.K. Virus-specific pathogen-free breeding colonies of macaques issues surveillance and results in 1992. Lab. Anim. Sci., 1994, v. 44, p. 222 – 228.

РОЛЬ ПРИМАТОВ В ОТКРЫТИИ И ИЗУЧЕНИИ ПРИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

В. А. Зуев

ФГБУ «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

zuev.factor@mail.ru

Резюме

Краткий обзор, посвященный особой роли приматов в открытии и изучении прионных болезней

Ключевые слова: приматы**,** прионы, медленные инфекции

ROLE OF PRIMATES IN DISCOVER AND STUDY OF PRION DISEASES

V. A. Zuev

«Scientific Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya» of the Ministry of Healthcare, Moscow, Russia

Abstract

Short review dedicates about especial role of primates in discovery and study of prion diseases

Key words: primates, prions, slow infections

История открытия и изучения прионных болезней представляет собой едва ли не самую романтическую страницу в истории инфектологии, полную неожиданных поворотов, коллективных заблуждений, долгого непонимания фактов и великих открытий. Формальное знакомство с прионными болезнями уходит своими корнями в далекое прошлое, когда 285 лет тому назад была описана в Англии (1732 г.), а вскоре и в Германии (1750 г.) одна из «классических» прионных болезней – скрепи у овец. Эта болезнь с 1755 г. уже столь широко распространена, что становится даже предметом петиции в Британский парламент,

поданной фермерами-овцеводами графства Линкольншир. Только в 1899 г. удается доказать инфекционную природу скрепи. Постепенно болезнь широко распространяется среди племенных овец и в различных странах получает свои названия [1].

Однако истинная история изучения скрепи, как научной проблемы, началась лишь с середины XX века, то есть с того момента, когда Бьёрн Сигурдсон – профессор Рейкьявикского Института экспериментальной патологии (Исландия) – включил скрепи в категорию так называемых медленных инфекций, прочитав свои знаменитые лекции в Лондонском университете [1, 2].

Задолго до этого Б. Сигурдсон был приглашен исландскими фермерами для выяснения причин массовых заболеваний овец на различных фермах острова. Он столкнулся с весьма разнообразными клиническими проявлениями этих действительно разных заболеваний, среди которых были признаки поражения у животных и центральной нервной системы (ЦНС), и нарушения со стороны дыхательных органов. Однако, несмотря на различия симптоматики, Б. Сигурдсон обнаружил между этими болезнями и определенные черты сходства: необычно продолжительный инкубационный период (годы), медленно прогрессирующий характер течения процесса, необычность поражения органов и тканей и неизбежный летальный исход. Именно эти четыре признака и легли в основу наименования таких заболеваний как «медленные инфекции» [8-10].

Казалось бы, опубликовано важное открытие? Однако никакого отклика оно не получило. Во-первых это были овцы, во-вторых, где-то на севере и на острове, в- третьих, сами болезни носили какие-то непривычные названия – «скрепи», «висна», «мэди». Но спустя 3 года, будущий лауреат Нобелевской премии американский вирусолог Карлетон Гайдушек и его сотрудник Винсент Зигас публикуют сообщение о новом неизвестном ранее массовом заболевании папуасов-людоедов на острове Новая Гвинея, признаки которого точно соответствуют всем четырем характеристикам медленных инфекций [4].

Несомненно, заслуживает упоминания и сама история доказательства именно инфекционной природы этого необычного заболевания, получившего название «куру».

Внимание к куру было привлечено еще австралийской медицинской общественности, т.к. остров Новая Гвинея в то время находился под протекторатом Австралии. Однако все попытки австралийских медиков обнаружить в клиническом и постмортальном материалах какие-либо признаки инфекционных агентов закончились безрезультатно. Активное изучение болезни началось после приезда на остров К. Гайдушека, который по приезде развернул в очаге этого заболевания госпиталь с лабораторией. К Гайдушеку потянулись энтузиасты из разных стран и работа, что называется, закипела. Будучи широко образованным и весьма состоятельным человеком, К. Гайдушек предпринял широкое изучение жизни и деятельности местного населения, начиная с особенностей питания, обрядов, приемов охоты и прочее. Вместе с тем, и в богато оснащенной лаборатории на месте, и в лабораториях Австралии и США, куда испытуемые материалы доставлялись по морю и по воздуху, предпринимались энергичные попытки обнаружить инфекционные агенты в различных биологических материалах от больных и погибших от куру путем заражения овец, коз, свиней, сирийских хомяков, крыс, морских свинок, кур, уток, а также 20 различных пород мышей. Для заражения используют и мышей, предварительно обработанных иммунодепрессантами. Увы! Все эти попытки оказались тщетными. В конце концов, как рассказывал мне сам К. Гайдушек, как акт отчаяния, он ввел мозговые суспензии от погибших людей двум шимпанзе – самке и самцу. И стал ждать…

Правда, это не было ожиданием «спустя рукава»: обезьян ежедневно осматривали невропатологи, им измеряли температуру тела, хорошо кормили. Но время шло, а никаких признаков заболевания не наблюдали. Прошли 6 месяцев, 10 месяцев, 20 месяцев, а обезьяны не обнаруживали ни малейших признаков недомогания. Миновал 21-й месяц, у самки шимпанзе появилась… сонливость, позднее присоединились признаки расстройства координации движений, вначале малозаметные они постепенно усиливались. Четко вывелось прогрессирующее нарушение походки, и последующая неспособность ходить и даже сидеть. Через 9 месяцев после появления первых симптомов обезьяна погибает. На вскрытии обнаруживается типичная картина для кура – губкообразное состояние серого вещества головного моз-

га. Самец щимпанзе заболевает через 30 месяцев после заражения. На вскрытии та же картина губкообразного состояния серого вещества головного мозга.

Заболевание характеризуется многолетним инкубационным периодом, начинается с двигательной атаксии, развивающейся медленно и постепенно, к которой присоединяется характерное дрожание туловища, конечностей и головы. Кстати, и название болезни – куру – означает в переводе с папуасского «дрожание от страха или от холода». Характерная особенность куру уже с первых месяцев заболевания – повышенная возбудимость, не всегда уместный смех, улыбки на лице, а иногда и приступы буйного беспричинного веселья. Эти проявления были столь необычны для смертельной болезни, что первоначально в средствах массовой информации, с легкой руки журналистов, заболевание получило название «хохочущая смерть».

При вскрытии людей, умерших от куру, патологические изменения только в головном мозге. Характкерные изменения включают гибель нейронов, в результате чего образуютсмя вакуоли, их число увеличивается и мозговая ткань на гистологичнеских срезах напоминает губку (status spongiosus) [4]. Отсюда и первоначальное наименование всех инфекционных заболеваний, которые характеризует подобная патогистология – «трансмиссивные губкообразные энцефалопатии». Это сообщение о возможности развития предполагаемой медленной инфекции и у людей в корне изменило отношение к этой новой проблеме.

Тогда – в середине XX столетия – был период бурного развития медицинской вирусологии, связанный с продолжающимся открытием и изучением многочисленных вирусных агентов – возбудителей острых лихорадочных заболеваний. И именно тогда, с начала второй половины XX века, начинает все более укрепляться мнение о возможности формирования и широкого распространения скрытых форм вирусного инфекционного процесса. Отсюда понятно, почему в предпринимающихся энергичных поисках возбудителей медленных инфекций господствовало мнение об их вирусной природе.

И вскоре такое предположение, как казалось, действительно начало оправдываться. В 1960 г. в лаборатории Б. Сигурдсона был выделен вирус висны – возбудитель типичной медленной инфекции овец, опи-

санной еще Б. Сигурдсоном в своих первых лекциях. По своим морфологическим и биохимическим свойствам вирус висны неожиданно оказался близок хорошо известным онкорнавирусам. Это открытие еще более укрепило мнение о вирусной природе медленных инфекций. И, действительно, вскоре был получен очень важный аргумент в пользу такого представления – установлена вирусная природа известной еще с 1933 г. медленной инфекции детей и подростков – подострого склерозирующего панэнцефалита (ПСПЭ) – смертельного заболевания, вызываемого, как оказалось, вирусом кори [6].

Дальнейшее развитие проблемы медленных вирусных инфекций отличалось необычайным динамизмом: родившись в рамках ветеринарии, эта проблема уверенно вошла в медицину, когда медленные вирусные инфекции были многократно описаны у человека.

Не смотря на большие успехи в расшифровке вирусной этиологии медленных инфекций человека и животных, причина трансмиссивных губкообразных энцефалопатий человека и животных оставалась не установленной. Однако, и следует подчеркнуть еще раз, именно благодаря использованию приматов, с помощью которых была впервые установлена инфекционная природа куру – первой медленной инфекции человека с характерными симптомами трансмиссивной губкообразжной энцефалопатии, – пробудился интерес к изучению всей проблемы медленных инфекций человека и животных и особенно к расшифровке этиологии этих смертельных заболеваний.

Действительно, вскоре эти находки заставили шире взглянуть на всю проблему и в центре внимания ученых оказался целый ряд длительно протекающих тяжелых неврологических заболеваний людей, причины которых многие годы оставались неизвестными.

Среди подобного рода страданий наибольшее внимание привлекла описанная еще в 20-е годы прошлого столетия болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ). В 1967 г. БКЯ обсуждается на специальном Международном симпозиуме, ей посвящается большое число статей, даже выходит отдельная монография. Однако её причины остаются неизвестными, как и неизвестной остается её природа.

В ноябре 1966 г. в лабораторию К. Гайдушека (г. Бетесда, США) доставляется замороженная ткань головного мозга 60-летнего англичанина, погибшего от БКЯ. Приготовленную взвесь вводят молодому

самцу шимпанзе. Через 13 месяцев у зараженного шимпанзе развились признаки нарушения зрения. К которым потом присоединились параличи конечностей и прогрессирующее слабоумие. Через 2 месяца обезьяна погибла. Из ткани её головного мозга приготовили 10- и 0,1-процентную суспензии, Первую суспензию ввели в головной мозг и внутривенно шимпанзе-самке, а вторую – шимпанзе-самцу.

Самка заболела через 13 месяцев, а зараженный самец, несмотря на то, что ему была введена в 100 раз меньшая доза заражающего материала, заболел через 14 месяцев. Обе обезьяны погибли через месяц после появления первых признаков БКЯ [5].

Так была доказана инфекционная природа БКЯ. Позднее удалось передать заболевание четырем видам шимпанзе и даже домашней кошке, морским свинкам, сирийским хомякам и лабораторным мышам. Более того, в 1985 г. в мире (главным образом в лаборатории К. Гайдушека) были получены пробы мозга более чем от 500 больных с диагнозом «БКЯ»; в 218 пробах присутствие инфекционного агента было доказано путём заражения приматов /3/. Эти основополагающие исследования на приматах послужили отправной точкой широких разработок в разных странах, результатами которых сегодня являются уже более полутора десятков нозологических форм, объединенных понятием «прионные болезни человека и животных» (табл. 1). Более того, результаты использования приматов заложили основу исследований прионных болезней во всей их полноте. Здесь речь идет и о выяснении способов заражения, и путей распространения инфекционного агента в зараженном организме, и накопления его в различных органах и тканях млекопитающих, что в конце концов, послужило основой для выбора научного подхода к выявлению природы инфекционного агента – инфекционного прионного белка, 35-летнюю годовщину открытия которого Стенли Прузинером /7/мы сегодня отмечаем.

Таблица 1.

Прионные болезни человека и животных

Название заболевания	Хозяин
Куру	Человек
Болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ) спорадическая форма	Человек

семейная форма	
ятрогенная форма	
Новый вариант БКЯ (нвБКЯ)	Человек
Синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера	Человек
Смертельная семейная бессонница	Человек
Спорадическая смертельная бессонница	Человек
Протеаза-чувствительная нейропатия	Человек
Нейропатия с диареей	Человек
Скрепи	Овцы, козы
Трансмиссивная энцефалопатия норок	Норки
Хроническая изнуряющая болезнь	Олени, лоси
Трансмиссивная губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота	Коровы, быки
Губкообразная энцефалопатия кошек	Кошки
Губкообразная энцефалопатия экзотических копытных	Антилопы, большой куду

Литература

1. Зуев В.А. – Прионы – особый класс возбудителей медленных инфекций человека и животных//Российский медицинский журнал. Неврология и психиатрия.- 2013.- № 30.- С. 1559-1566.
2. Покровский В.И., Киселев О.И., Черкасский Б.Л. Прионы и прионные болезни.- М.: РАМН, 2004.-384 с.
3. Gajdusek D.C. – In: Subviral pathogenesis of plants and animals: viroids and prions. New York. 1985, p. 483-544.
4. Gajdusek D.C., Zigas V.- Degenerative disease of the central nervous system ikn New Guinea. The endemic occurrence of “Kuru” in the native population// New Engl. J. Med.- 1957.- V. 257.- P. 974-978.
5. Gibbs C.J., Gajdusek D.K., Asher D.M. et al.=- Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopaty) transmission to the chimpanzee//Science.- 1968.-V. 161.- P. 388-389.
6. Payne F.E., Baublis J.V., Itabashi H.H. – Isolation of measles virus from cell cultures of braine from a patient with
7. subacute sclerosing panencephalitis//New Engl. J. Med.1969.-V. 281.- P.585-589.
8. Prusiner S.B. – Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie// Science.- 1982. – V. 216. – P. 136-144.

9. Sigurdsson B.- Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep; An epizoological and pathological study//Brit. vet. J.,1954a.- V. 10.- P. 255-270.
10. Sigurdsson B. – Paratuberculosis (Johne's disease) of sheep in Iceland. Immunological studies and oservations on its mode of spread//Brit. Vet. J.,1954b.-V.110.- P.307-322.
11. Sigurdsson B. – Rida, chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections with develop slowly and some of theikr special characreristics//Brit. Vet. J.1954c.-V. 110.- P. 341-354.

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ЛАБОРАТОРИИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ: СОЗДАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Лапин Б. А., Аршба И. М., Стасилевич З. К., Джикидзе Э. К.
ФГБНУ «НИИ Медицинской приматологии», Сочи, Россия
blapin@yandex.ru

THE HISTORY OF THE PROGRESS OF THE LABORATORY OF INFECTIOUS PATHOLOGY: CREATING BIOLOGICAL MODELS TO STUDY THE HUMAN BACTERIAL DISEASES

Lapin B. A., Arshba I. M., Stasilevitch Z. K., Dzhikidze E. K.
Federal State Budget Scientific Institution "The Research Institute of Medical Primatology" (FSBIU "NII MP"), Sochi, Russia

Abstract

The laboratory of infectious pathology was organized in 1932 on the initiative of Academician P.F. Zdrodovsky and originally called the "Department of Epidemiology". The main research direction of the laboratory was conducting experimental studies on infectious pathology and bacteriological diagnosis of diseases and death causes in monkeys. In 1951 the "Department of Epidemiology" was renamed into the

laboratory of infectious pathology. On the basis of this laboratory, prominent scientists conducted scientific research on the topical problems of infectious pathology. Under the guidance of outstanding scientists at the Institute were tested and subsequently implemented in health practice the methods of active prophylaxis of tetanus and diphtheria (P.F. Zdrodovsky), asian cholera (Z.V. Ermol'eva), gangrene (G.V. Vygodchikov). Also a highly effective poliomyelitis vaccine was developed (M.P.Chumakov, M.K.Voroshilova). The clinical course, pathomorphology, and immunology of many monkey infectious diseases (pneumonia, tuberculosis, dysentery, colibacteriosis, salmonellosis, pseudotuberculosis, tetanus, etc.) have been studied. Experimental models of different etiological forms of dysentery, coli-infection, salmonellosis, gangrene, intestinal yersiniosis, ikterohemorrhagic leptospirosis, streptococcosis (E.K. Dzhikidze, A.S. Aksenova, S.M. Pekerman, Z.K. Stasilevich, K.N. Kavtaradze) were established.

Лаборатория инфекционной патологии организована в 1932 году по инициативе академика П.Ф.Здродовского и сначала называлась «Отдел эпидемиологии», основным направлением лаборатории являлось проведение экспериментальных исследований по инфекционной патологии и бактериологической диагностике заболеваний и причин гибели обезьян. Первым заведующим лабораторией был назначен ученик П. Ф. Здродовского – Б.В. Воскресенский. В 1951 г. «Отдел эпидемиологии» был переименован в лабораторию инфекционной патологии. С 1951-1962 гг. научным руководителем лаборатории был видный ученый микробиолог, академик В.Л.Троицкий. С именем академика В.Л.Троицкого были связаны широко известные исследования по изучению на обезьянах дизентерии и других кишечных инфекций, радиационной микробиологии и иммунологии. В 1961 г. руководителем лаборатории инфекционной патологии стала ученица В.Л. Троицкого – Э.К. Джикидзе, которая являлась одним из ведущих специалистов в области инфекционной патологии приматов (до 1996г.)

Инфекционная патология приматов – одно из наиболее перспективных направлений медицинской приматологии. При создании биологических моделей инфекционных заболеваний человека исключительное значение приобретает правильный выбор экспериментально-

го животного, то есть использование такого объекта исследования, на котором с достаточным постоянством и максимально приближенной к естественному заболеванию форме воспроизводятся основные клинические и патоморфологические проявления изучаемого процесса. У большинства лабораторных животных, несмотря на их безусловную ценность для экспериментальных исследований, далеко не во всех случаях можно воспроизвести инфекционную болезнь в целом. Это касается в первую очередь антропонозных инфекций, возбудители которых исторически (эволюционно) приспособлены к паразитированию в организме человека. В этом отношении обезьяны, составляющие наряду с человеком единый отряд приматов, стали привлекать внимание исследователей. С середины XX столетия приматы особенно интенсивно стали использоваться для решения самых разнообразных проблем медицины и биологии, и в первую очередь, для изучения проблем инфекционной патологии человека. Данные исследований института и обширная литература по сравнительной патологии приматов свидетельствуют, что обезьяны проявляют естественную восприимчивость ко многим бактериальным, вирусным, грибковым и паразитарным болезням человека. Эти болезни можно наблюдать как спонтанно возникающие у диких обезьян, посещающих населенные пункты в местах естественного обитания приматов, и особенно часто в виде спорадических случаев и энзоотий при попадании в условия неволи [14, 15].

Модели инфекционных заболеваний на обезьянах можно разделить на три основные группы: 1) естественные модели – т.е. заболевания, возникающие спонтанно и сходные с заболеваниями человека и животных, 2) искусственные модели – заболевания, которые могут быть воспроизведены в эксперименте и по патогенезу, клинико-морфологическим проявлениям идентичны или очень близки соответствующим нозологическим формам человека, 3) искусственные модели, которые можно создать воздействием на организм ряда факторов, снижающих естественную резистентность и тем самым благоприятствует заражению (иммунодепрессанты, специальные диеты, стресс и др.). К настоящему времени на разных видах обезьян уже созданы модели практически всех наиболее распространенных инфекций человека, а полученные данные принесли большие успехи медицине и здравоохранению [14, 15].

На базе лаборатории видными учеными проводились научные исследования по актуальным проблемам инфекционной патологии. В институте под руководством выдающихся ученых страны были апробированы и в дальнейшем внедрены в практику здравоохранения методы активной профилактики столбняка и дифтерии (П.Ф. Здродовский), азиатской холеры (З.В. Ермольева), газовой гангрены (Г.В. Выгодчиков). В тесном контакте с лабораторией инфекционной патологии работали академик Чумаков М.П. и член-корр. АМН СССР Ворошилова М.К., проводившие на обезьянах – единственных животных, восприимчивых к полиомиелиту, опыты по изучению этиологии и патогенеза, иммунологии и активной профилактике полиомиелита. Благодаря этим исследованиям была создана высокоэффективная противополиомиелитная вакцина, которая внесла огромный результат в борьбе с заболеванием. Исследования академика Сергиева П.Г по изучению кори на обезьянах привели к созданию противокоревой вакцины, была подробно изучена экспериментальная коревая инфекция, ее патоморфология и вопросы патогенеза [6,9,10,11, 14].

Изучены клиника, патоморфология, иммунология многих инфекционных заболеваний обезьян (пневмония, туберкулез, дизентерия, колибактериоз, сальмонеллезы, псевдотуберкулез, столбняк и др.) [1, 13, 14,15, 23, 24].

Получены экспериментальные модели разных этиологических форм дизентерии, коли-инфекции, сальмонеллезов, газовой гангрены, кишечного иерсиниоза, иктерогеморрагического лептоспироза, стрептококкозов (Э.К. Джикидзе, А.С.Аксенова, С.М. Пекерман, З.К. Стасилевич, К.Н. Кавтарадзе).

Особое внимание было уделено изучению шигеллезов, как основной причины гибели обезьян от кишечных инфекций. Заболевание животных дизентерией может быть обусловлено различными видами и серологическими типами шигелл – возбудителями человека. Испытание одного и того же штамма в нескольких экспериментальных моделях дает возможность получить более полное представление о его вирулентности. Имеется корреляция данных по вирулентности свежевыделенных штаммов в кератоконъюнктивальном тесте на морских свинках, легочной модели на белых мышах, в развивающихся куриных

эмбрионах и в культурах ткани. В различных моделях экспериментального шигеллеза показано, что патогенные свойства возбудителей дизентерии обезьян соответствуют инфективности, инвазивности и токсичности шигелл человека. (К.Н. Кавтарадзе). Спонтанная и экспериментальная дизентерия обезьян позволила установить характер и продолжительность постинфекционного иммунитета и постулировать его строго видо- и типоспецифический характер [12, 22, 25].

Установлена зависимость изменения показателей неспецифического иммунитета у обезьян при различных инфекционных заболеваниях (пневмония, геморрагическая лихорадка обезьян и сальмонеллез) от стадии и тяжести болезни. Изучены нормативные показатели неспецифической противоинфекционной резистентности у разных видов обезьян в онтогенезе и нарушения этих показателей при акклиматизации, стрессе и различных патологических состояниях; апробированы различные иммуномодуляторы и разработаны схемы и методы иммунокоррекции (Н.А. Восканян, С.М. Пекерман) [3].

Проведены сравнительно-видовые и возрастные исследования кишечной микрофлоры обезьян в норме и при патологии. Установлены нормативные показатели микрофлоры, а также факторы, способствующие нарушению качественного и количественного ее состава. Также как и у человека выделены 4 степени развития кишечного дисбиоза и разработаны рекомендации по их лечению с помощью биопрепаратов. (В. В. Поспелова, С.А. Шагинян).

Приведенные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что некоторые неспецифические факторы – ионизирующая радиация, интеркуррентные заболевания (корь) и особенно гиповитаминоз «С» способствует снижению естественных защитных механизмов организма обезьян к сальмонеллезам и колиэнтеритам. Результаты проведенных исследований показали, что воспроизведение у обезьян сальмонеллеза Гейдельберга, паратифа «В» Гертнера, а также колиэнтериты являются моделями соответствующих заболеваний человека. (З.К. Стасилевич) [16, 18,19,20,26].

Исследования по кишечным заболеваниям выполнялись Аксеновой А.С., Джикидзе Э.К., Стасилевич З.К., Пекерман С.М., Кавтарадзе К.Н., Восканян Н.А., Шагинян С.А., Кукава Г.Г.

Использование приматов для воспроизведения стрептококковой инфекции являлось весьма перспективным исследованием из-за их естественной восприимчивости к этой инфекции и сходства соединительной ткани человека и обезьяны. По предложению ученых Тимакова В.И. и Каган Г.Я. на протяжении ряда лет изучалась возможность воспроизведения экспериментальной ангины обезьян путем многократного и длительного их инфицирования стабильными L-формами β-гемолитического стрептококка группы А и их родительскими культурами. Работы проводились совместно с сотрудниками ин. Гамалеи Н.Ф. и французской исследовательницей из Международного центра детства (Париж). Результаты опыта на макаках резусах показали, что многократное и циклическое (хроническое) заражение L-формами стрептококка, как и бактериальными формами приводит к развитию очень тяжелых ангин, осложненных очаговым миокардитом, независимо от места введения возбудителя. Было показано, что обезьяны, не болеющие ангиной в естественных условиях, являются благоприятным объектом для воспроизведения экспериментальной ангины, вызванной L-формами и бактериальными формами стрептококка. Основное достижение данной работы заключалось в том, что удалось показать, что L-формы сохраняют патогенность, вызывают ангину, осложненную миокардитом, что установлено в организме инфицированных животных под влиянием пенициллинотерапии может происходить индукция L-форм, при которой удается выделять возбудителя из крови на протяжении 3 недель после последнего введения, возможна длительная персистенция L-форм в организме [7,15].

Большим разделом и продолжением исследований лаборатории с конца 60-х годов явилось изучение микоплазм и ассоциированных с ними заболеваний. Исследования по микоплазмам были начаты под руководством выдающегося ученого Г.Я. Каган. В ходе работы установлена частота обнаружения различных видов микоплазм в норме и при разных патологических процессах. Изучена роль микоплазменной инфекции в спонтанной патологии обезьян, получены и охарактеризованы модели микоплазменной и уреаплазменной инфекции легких и урогенитального тракта в опытах на обезьянах (Е.А.Балаева, А.Н. Марантиди, Р.И. Крылова, Э.К. Джикидзе). Модель рекомендована для

изучения микоплазменной инфекции мочевыделительной системы человека и разработки методов этиотропной терапии.

В течение ряда лет в институте проводились испытания новых антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний, разрабатывались схемы и методы терапии. Так был разработан и внедрен в практику здравоохранения комбинированный метод иммуно- и химиотерапии для лечения острой и хронической дизентерии и санации стойких бактерионосителей (В.Л. Троицкий, М.А. Туманян, Э.К. Джикидзе) для парентерального циклического лечения препаратами тетрациклинового ряда острых и хронических кишечных инфекций (З.В. Ермольева, И.С. Гвазава, А.С. Аксенова).

Практически все поколения вакцин против кишечных инфекций (шигеллезов, сальмонеллезов) энтерального и парентерального применения испытаны в опытах на обезьянах совместно с сотрудниками НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского с целью оценки их безвредности и эффективности. Лаборатория все годы тесно сотрудничала с указанными научно-исследовательскими институтами.

Лаборатория инфекционной патологии активно принимала участие в международном сотрудничестве с Йенским институтом микробиологии экспериментальной терапии ГАН по созданию и изучению профилактической эффективности М-протеиновых вакцин из β- гемолитических стрептококков группы А, с институтом экспериментальной медицины Чехословакии по профилактике лучевой болезни препаратами из *Aspergilus flavus,* с институтом ветеринарии Венгрии по микоплазмам и Германским зоопарком по изучению спонтанных инфекционных заболеваний в сравнительном плане.

Тесно контактировала лаборатория инфекционной патологии с врачами практического здравоохранения Абхазии. С участием сотрудников лаборатории впервые было установлено распространение в Абхазии крысиного сыпного тифа и марсельской лихорадки, серозного менингита. По инициативе заведующей лабораторией д.м.н. Джикидзе Э.К. был создан Абхазский филиал общества микробиологов, эпидемиологов, инфекционистов, в котором участвовали специалисты из

разных районов Абхазии. Проводились круглые столы, семинары по актуальным проблемам инфекционной патологии.

По результатам исследований лаборатории было опубликовано огромное количество работ (до 500) в отечественных и иностранных периодических журналах, сборниках трудов, составлены методические рекомендации, выполнены 2 докторские и 10 кандидатских диссертаций. Сотрудники лаборатории являются соавторами руководств по медицинской приматологии.

В заключении хотелось отметить, что при планировании экспериментов на обезьянах необходимо придерживаться следующих принципов:

- обезьян следует использовать в эксперименте для решения важных задач медицины и биологии;

- обезьян можно использовать в экспериментах при отсутствии альтернативных моделей или невозможности получения корректных результатов при использовании других лабораторных животных;

- обезьян следует использовать при испытании эффективности и безопасности новых лекарственных препаратов.

Литература

1. Балаева Е.Я., Кукава Г.Г., Джикидзе Э.К. Биологически свойства Yersinia enterecolitica, выделенных от обезьян // Ж. микробиол. – 1968- № 9-с.120-121.
2. Балаева Е.Я., Марантиди А.Н. Серологическое изучение микоплазма-инфекции среди обезьян различных видов. // В кн.: Матер. Всесоюз. конф. «Проблемы обеспечения обезьянами медико-биологических исследований и перспективы использования обезьян в эксперименте» – Сухуми – 1983 – с. 104-105.
3. Восканян Н.А. Некоторые показатели неспецифического иммунитета у обезьян. //Автореферат – Москва – 1970- 21с.
4. Джикидзе Э.К., Кавтарадзе К.Н. Изучение безвредности и профилактической эффективности живых энтеральных вакцин Флекснера и Зонне в опытах на обезьянах. // В кн.: Живая дизентерийная вакцина. М., – 1985 – с.32-36.
5. Джикидзе Э.К., Кавтарадзе К.Н., Белая Ю.А. и др. Изучение энтеральной вакцинации против шигеллезов в опытах на обезьянах. // В кн.: Тез. Докл.

XVI Всесоюзного съезда микробиол. и эпидемиол. Ч.2. М. -1977 – с.164-165.
6. Джикидзе Э.К., Кавтарадзе К.Н., Стасилевич З.К. и др. Изучение кишечных инфекций в опытах на обезьянах.// Вестн. АМН СССР – 1977 – №8 -с.59-65.
7. Джикидзе Э.К., Восканян Н.А., Крылова Р.И. и др. Экспериментальное воспроизведение стрептококковой инфекции на обезьянах. // Известия АНГССР – 1983 – т. 9 – № 6 – с. 373-378.
8. Джикидзе Э.К., Восканян Н.А., Келлер В. и др. Сравнительное изучение М-протеиновых вакцин на обезьянах. – Иммунология – 1985 – № 4 –с. 49-52.
9. Джикидзе Э.К., Аксёнова А.С. Эффективность предохранительной вакцинации против столбняка в эксперименте на обезьянах при длительном облучении в малых дозах. // Ж. микробиол. – 1964 – № 12 – с. 29-32.
10. Джикидзе Э.К., Аксёнова А.С. Предохранительная вакцинация обезьян против газовой гангрены, вызванной Cl.perfringes, в условиях хронического облучения. // Ж. микробиол. – 1963 – № 1- с. 132-137.
11. Джикидзе Э.К., Шевцова З.В. Вспышка кори среди обезьян, подвергавшихся длительному облучению в малых дозах // Вопросы физиологии, экспериментальной патологии и радиобиологии – 1965 – с.302-330.
12. Кавтарадзе К.Н. Биологические свойства шигелл, выделенных от обезьян. //Автореферат – Москва – 1971 – 23с.
13. Крылова Р.И., Джикидзе Э.К., Мачавариани М.Н. Псевдотуберкулез у обезьян //Архив патол.- 1976 – т.38 – № 3 – с. 61-66.
14. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К. Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии // М. – 1987 – 137 с.
15. Лапин Б.А., Яковлева Л.А. Очерки сравнительной патологии приматов // М.-1960 – 302 с.
16. Лапин Б.А., Яковлева Л.А., Пекерман С.М. Воспроизведение паратифа «В» у обезьян // «БЭБиМ – 1956 – № 1 – с. 33-38.
17. Марантиди А.Н., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. и др. Экспериментальная микоплазменная инфекция урогенитального тракта у обезьян. // Ж. микробиол. – 1987 – № 1 – с. 87-90.
18. Стасилевич З.К. Влияние гиповитаминоза С на течение экспериментальных кишечных инфекций у обезьян // БЭБиМ-1963-№ 6-с.52-55.
19. Стасилевич З.К. Экспериментальные сальмонеллезы и колиэнтериты обезьян // Автореферат, Сухуми-1961- 14с.
20. Стасилевич З.К. Моделирование брюшного тифа на обезьянах //В кн. Вопр. физиологии, эксперим. патологии и радиобиол.-Сухуми-1965-с. 190-197.

21. Степанова Л.К., Геккер В.Д., Стасилевич З.К. и др. Сравнительное изучение в опытах на обезьянах эффективности корпускулярных и химических вакцин при подкожном и энтеральном применении // Ж. микробиол.гигиены, эпид., микроб, и иммун.-1972-т.6, № 4-с. 346-356.
22. Троицкий В.Л., Джикидзе Э.К., Туманян М.А. и др. Дизентерия у обезьян как экспериментально-биологическая модель дизентерии человека.// В кн.: Теоретич. и практич. вопросы медицины и биологии в эксперим. на обезьянах. // М. – 1956 – с. 139-153.
23. Шургая М.А. Инвазивные Escherichia coli серогруппы О139:К // Ж. микробиол. -1983- № 6 – с. 163-167.
24. Шургая М.А. Характеристика эшерихий серогруппы 0132:К, выделенных при кишечных заболеваниях обезьян // Ж. микробиол.-1982-№ 11-с. 39-43.
25. Яковлева Л.А. К вопросу о патолого-анатомических изменениях при экспериментальной дизентерии Флекснера// Вопр. инфекц. патологии в экспер. на обезьянах.1958—Сухуми—с 65-72.
26. Яковлева Л.А. Морфологическая характеристика экспериментальных сальмонеллезов у обезьян. // Архив патологии -1966 – т.28 – № 2 – с.78-81.

МИКОПЛАЗМЕННЫЕ ИНФЕКЦИИ У ОБЕЗЬЯН, РЕЗУЛЬТАТЫ МНОГОЛЕТНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

[1]Аршба И. М., [2]Раковская И. В.
[1]ФГБНУ «НИИ Медицинской приматологии», Сочи, Россия aim26@mail.ru
[2]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия

Резюме

Представители класса *Mollicutes* широко распространены среди людей, животных и растений; у обезьян, как и у человека, встречаются одни и те же представители родов *Mycolasma, Ureaplasma и Acholeplasma* как патогенные, так и сапрофитические варианты, выделенные из слизистых оболочек носоглотки, урогенитального тракта и кишечника. Показана этиологическая роль отдельных представителей класса *Mollicutes* в развитии некоторых заболеваний приматов. Развивающиеся микоплазменные инфекции имеют сходство по клинико-морфологическим проявлениям с таковыми, обнаруживаемыми у человека, что позволяет считать перспективным использование обезьян в качестве лабораторных животных для изучения микоплазмозов человека.

Ключевые слова: микоплазменные инфекции, обезьяны, респираторный, урогенитальный тракт, микоплазмозы человека.

THE RESULTS OF LONG-TERM STUDIES OF MYCOPLASMA INFECTIONS IN MONKEYS

[1]Arshba I.M., [2]Rakovskaya I.V.
[1]Federal State Budget Scientific Institution "The Research Institute of Medical Primatology" (FSBIU "NII MP"), Sochi, Russia, aim26@mail.ru
[2]Federal State Budget Institution «Gamaleya Federal Scientific Research Center of Epidemiology and Microbiology», Moscow, Russia

Abstract

The Mollicutes class representatives of are widely distributed among humans, animals and plants. The same members of the genus Mycoplasma, Ureaplasma and Acholeplasma (both pathogenic and saprophytic variants) were isolated from nasopharyngeal mucosa, mucous membrane of urogenital tract and intestine of monkeys. The etiological role of individual representatives of the *Mollicutes* class in some primate diseases is shown. Developing mycoplasmal infections have similar clinical and morphological manifestations to those found in humans, which makes it promising to use monkeys as laboratory animals for studying human mycoplasmosis.

Key words: mycoplasma infection, monkeys, respiratory, urogenital tract, mycoplasmosis human.

Представители класса *Mollicutes*- микоплазмы, лишенные клеточной стенки бактерии – относятся к мельчайшим способным к самостоятельному воспроизведению прокариотам.

Возбудители микоплазмозов относятся к семейству *Mycoplasmataceae*, роду *Mycoplasma*. Инфекция широко распространена повсеместно среди людей, животных, птиц и растений. Обезьяны разных видов и человек, являются носителями микоплазм, уреаплазм, ахолеплазм. К настоящему времени от обезьян изолировано более 15 видов условно-патогенных и сапрофитических микоплазм из респираторного, урогенитального и кишечного трактов. У обезьян обнаружены и собственные виды микоплазм: *M. primatum, M. moatsii*, а также серологические варианты, близкие по культуральным свойствам к *A. laidlawii*, но антигенно отличные от них [4, 6, 9].

Сотрудники НИИ ЭПиТ при спонтанной пневмонии лангуров из легочной ткани, верхних дыхательных путей, крови и паренхиматозных органов изолировали *M.pneumonia* – возбудителя атипичной пневмонии человека [5, 9].

Имеются сведения об ассоциации нефритов и другой урогенитальной патологии обезьян с микоплазмами, ахолеплазмами и уреаплазмами. Серологическое исследование сывороток более 1000 обезьян Сухумского питомника разных видов – павианов гамадрилов, мака-

ков бурых, макаков лапундеров, макаков яванских показало широкое распространение микоплазменной инфекции среди обезьян (43,6%). Показатель удельного веса каждого вида микоплазменной инфекции в стаде обезьян варьирует от 3,6% до 14,4%. Наиболее высокий процент носительства антител к виду *M. fermentans* – 14,4. Антитела к виду *M.pneumoniae* обнаруживаются у 9,5% обезьян, *M. hominis* – у 3,6% , к ахолеплазмам – у 8,5-10% животных [4, 6] .

Различные исследователи неоднократно пытались изучить на обезьянах развитие инфекционного процесса, обусловленного микоплазмами, выделенными из разных источников. Наиболее часто обезьяны наряду с другими лабораторными животными используются для изучения этиологической роли различных видов микоплазм в патологии респираторного и урогенитального трактов [12, 13, 14, 15].

В НИИ ЭПиТ макаков резусов заражали *M.pneumoniae*. Для заражения использовали 24-х часовую бульонную культуру возбудителя (10^7 КОЕ/мл), свежевыделенную от больного пневмонией ребенка. Материал вводили в трахею в объеме 1 мл. На 3-7 сутки у обезьян появлялись признаки заболевания: вялость, малоподвижность, гиперемия задней стенки глотки, жесткое дыхание и хрипы в легких, одышка, нейтрофильный лейкоцитоз и ускорение СОЭ. Микоплазмы реизолировали из зева на 4-35 сутки, из крови – на 9-25 сутки после заражения. У умершвленных обезьян морфологически обнаруживались интерстициальная пневмония и лимфоидная инфильтрация в подчелюстной слюнной железе, тонзиллит, бронхит, очаги лимфоидной инфильтрации в легких и почках, гиперплазия селезенки и лимфоузлов. Микоплазмы выделялись из легких, трахеи и бронхов, миндалин, селезенки, почек и мочевого пузыря. Эти данные свидетельствуют о генерализации инфекции. Таким образом, была получена модель респираторного микоплазмоза, характеризующаяся не только поражением респираторных органов, но и органов мочеполовой системы, широкой генерализацией и длительной персистенцией (до 65 суток в различных органах) [4, 5, 7].

В НИИ ЭПиТ, были предприняты попытки моделирования микоплазменной инфекции урогенитального тракта на трех видах обезьян – макаках резусах, макаках лапундер и павианах гамадрилах, с ис-

пользованием культур микоплазм и уреаплазм, свежеизолированных от больных людей [5, 6]. Для интрауретрального заражения использовали бульонные культуры *U.urealyticum* в дозе 10^5 цветообразующих единиц на 1 мл (ЦОЕ/мл) и *M.hominis* в дозе 10^8 колониеобразующих единиц на 1 мл (КОЕ/мл) в объеме 1,0-1,5 мл. Материал вводили с помощью резинового катетера в уретру обезьянам после предварительного внутримышечного введения калипсола (в дозе 0,1 на 1 кг веса). Таким образом, была получена модель уретрита с клинически выраженной симптоматикой (серозное истечение из уретры, гиперемия, отек, частое мочеиспускание), подтвержденный гистологическими исследованиями (инфильтрация слизистой мочевого пузыря и уретры лимфоцитами, образование периваскулярных инфильтратов, наличие мелких эрозий в слизистой уретры). При этом указанные признаки более выражены при смешанном заражении, чем при соответствующих моноинфекциях. Показана генерализация процесса. Микоплазмы были реизолированы не только из уретры и мочевого пузыря, но также из семенников, предстательной железы и других органов, где и обнаруживались морфологические изменения (уретрит, цистит, простатит, а также лимфоидная гиперплазия селезенки и лимфоузлов). Установлена персистенция возбудителей до 40 суток (при уреаплазменной инфекции) и 30-ти – (при микоплазменной) [4, 8, 10].

В НИИ ЭПиТ были выполнены две кандидатские диссертации Балаевой Е.Я. – «Биологическая характеристика микоплазм, выделенных от обезьян в норме и при гемобластозе», 1977г.; Марантиди А.Н. – «Частота выделения ахолеплазм у обезьян и их биологическая характеристика», 1982г. Научным руководителем указанных исследований являлась доктор медицинских наук, профессор Э.К. Джикидзе.

Сведения об естественном инфицировании обезьян урогенитальными микоплазмами: *M.hominis* и *U.urealyticum* были также получены и продолжены в «НИИ Медицинской приматологии» г. Сочи. Изучается распространение среди обезьян возбудителей инфекций урогенитального тракта и возможная их этиологическая роль в патологии беременности и родов, бесплодия и рождением мало жизнеспособного потомства. Исследования проводятся совместно с лабораторией микоплазм L-форм бактерий под руководством д.м.н. Раковской И.В. в «ФНИЦЭиМ им. почетн. академика Н.Ф.Гамалеи» [1, 3].

С помощью ПЦР-метода было установлено широкое распространение носительства *M. hominis u U.urealyticum* у обезьян разных видов, что подтверждается обнаружением специфических антигенов в реакции агрегат-гемагглютинации. Серологические исследования подтверждают широкое распространение возбудителей урогенитальных инфекций как у обезьян с патологией урогенитального тракта, так и у клинически здоровых особей.

Определена нуклеотидная последовательность фрагмента 16SpРНК микоплазмы, выявленного методом ПЦР в урогенитальном соскобе макаки яванской *(M.fascicularis*). Секвенированный фрагмент микоплазмы *M.fascicularis* сравнивали с известными последовательностями микоплазм млекопитающих. Проведенный сравнительный и филогенетический анализ секвенированного фрагмента ДНК установил, что выявленная микоплазма принадлежит к виду *M .primatum* и входит в один кластер с *M. hominis* [11].

Выявлена высокая частота обнаружения *M.pneumon*iae у обезьян с патологией органов дыхания.

Проведенные исследования также установили спонтанную инфицированность микоплазмами у особей 3-4 поколения акклиматизированных и находящихся в условиях неволи, а также обезьян (мартышки зеленые), привезенных из мест естественного обитания (Танзания) [2].

Показано, что длительно персистировать могут не только живые клетки урогенитальных микоплазм обезьян, но и их отдельные АГ, о чем свидетельствуют серологические данные [3].

Впервые из сыворотки и урогенитальных соскобов от обезьян выделены мини-колонии неизвестного ранее морфотипа микоплазм, идентифицированные с помощью ПЦР – диагностики как *M.hominis*. Обнаруженные в сыворотке крови обезьян мини-клетки *M.hominis*, образующие на агаре мини-колонии, возможно, являются одной из форм персистенции микоплазм в организме животных, возникающей, по-видимому, под воздействием различных стрессорных факторов иммунной защиты хозяина. Как известно из литературы, клетки микоплазм имеют сниженные потенции к росту и размножению ин витро, но способные вызывать генерализованную инфекцию с длительной персистенцией в тканях и сыворотке крови [2].

Таким образом, показана этиологическая роль отдельных представителей класса *Mollicutes* в развитии некоторых заболеваний приматов. Развивающиеся микоплазменные инфекции имеют сходство по клинико-морфологическим проявлениям с таковыми, обнаруживаемыми у человека, что позволяет считать перспективным использование обезьян в качестве лабораторных животных для изучения микоплазмозов человека. Исследования по теме продолжаются.

Литература

1. Аршба И.М. Распространение возбудителей урогенитальных инфекций у обезьян и их роль в патологии беременности и родов.// Автореферат: Сочи, 2008. – 29 с.
2. Аршба И.М., Раковская И.В., Бархатова О.И., Левина Г.А., Горина Л.Г., Гамова Н.А., Гончарова Н.А. Инфицированность микоплазмами обезьян, находящихся в условиях неволи и вновь привезенных из Танзании. Астраханский медицинский журнал – 2016. – том 11, №2 – с.64-70.
3. Аршба И.М., Джикидзе Э.К., Раковская И.В., Горина Л.Г., Гончарова С.А. Иммунологические показатели инфицированности обезьян «урогенитальными микоплазмами» // Журн микробиол.- 2007. – №5 – с. 87-90.
4. Балаева Е.Я. Биологическая характеристика микоплазм, выделенных от обезьян в норме и при гемобластозе. //Автореферат: Москва, 1997 – 23с.
5. Джикидзе Э.К., Марантиди А.Н., Балаева Е.Я. *и др.* Микоплазмы обезьян и их роль в патологии. // Вест. АМН СССР – 1987. – № 10 – с. 23-27.
6. Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. Спонтанные микоплазмозы у обезьян. // БЭБиМ – 2001. – т. 32, № 12 – с. 678-684.
7. Козлюк А.С. Патогенез и иммунологическая реактивность при респираторном микоплазмозе у обезьян. // В кн.: Актуальные вопросы бактериологии и микоплазматологии. – Кишинев – 1979. – с. 48-49.
8. Крылова Р.И., Джикидзе Э.К., Марантиди А.Н. Экспериментальные микоплазмозы обезьян // БЭБиМ – 2002. – №1 –с.106-111.
9. Марантиди А.Н. Частота выделения ахолеплазм у обезьян и их биологичексая характеристика. //Автореферат: Москва, 1982. – 23 с.
10. Марантиди А.Н., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. и др. Экспериментальная микоплазменная инфекция урогенитального тракта у обезьян. // Ж. микробиол. – 1987. – № 1 – с. 87-90.
11. Чикобава М.Г., Джикидзе Э.К., Задорожный Д.В., Кебу Т.И., Аршба И.М. и др. Филогенетический анализ микоплазмы, выделенной от макаки яван-

ской (*M.fascicularis*) // Ж. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 2008. – №1 – с.23-26.
12. *Barile M.F.* Mycoplasmal Flora of simians. // J. Inf. Dis. – 1973. – vol. 127. Suppl. – p. 17-20.
13. *Brunner H.* Models of mycoplasma respiratory and genital infections. // Klin. Wochenschr. – Wien – 1997. – vol. 709 – № 14-15 – p. 569-573.
14. *Cole B.C., Graham C.E., Ward J.R.* The isolation of mycoplasmas from chimpanzees. // In: The chimpanzee – Basel-New York – 1970. – vol. 2 – p. 390-409.
15. *FriedlenderR.P.,Grizzard M.B.,Helms C.M. et. al.* Experimental production of respiratory tract infection with Mycoplasma pneumoniae in rhesus monkeys.\\J. Inf. Dis.-1976. – vol. 133, – p.343-346.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ У ОБЕЗЬЯН СУХУМСКОГО ПИТОМНИКА

Аршба И. М., Агрба С. Л., Смыр С. Р., Лалыкина О. С., Аргун Э. Н., Чанба А. Г., Ардашелия С. Н.

НИИ Экспериментальной Патологии и Терапии АНА, Сухум, Абхазия
aim26@mail.ru

Резюме

В результате проведенного бактериологического исследования у обезьян Сухумского питомника энтеропатогенные бактерии – шигеллы, сальмонеллы обнаружены не были. Было установлено, что у больных обезьян, с выраженными дисбиотическими проявлениями кишечника, выделялись условно-патогенные энтеробактерии рода *Proteus, Klebsiella, Morganella, Escherichia.* При антибиотикограмме отмечена чувствительность выделенных штаммов к цефалоспоринам 2-4 поколения, а резистентность к антибиотикам пенициллинового ряда.

Ключевые слова: обезьяны, идентификация, энтеробактерии, кишечные инфекции, диарейный синдром, антибиотикограмма.

IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIA IN MONKEYS OF THE SUKHUM NURSERY

Arshba I. M., Agrba S. L., SmyrS. R., Lalykina O. S., Argun, E. N., Chanba A. G., Ardashelia S. N.
Institute of Experimental Pathology and Therapy ANA, Sukhum, Abkhazia
aim26@mail.ru

Summary.

There were no detected enteropathogenic bacteria Shigella or Salmonella in bacteriological studies of monkeys of the Sukhum nursery. It was found that ill monkeys, with the expressed dysbiotic manifestations of the intestine, had opportunistic enterobacteria of the genus Proteus, Klebsiella, Morganella, Escherichia. In antibiogramme, the sensitivity of the dedicated strains to cephalosporins 2-4 generations was found, as well as resistance to the antibiotic penicillin.

Key words: monkeys, identification, enterobacteria, intestinal infection, diarrhea syndrome, antibiogram.

Введение. Обезьяны являются наиболее информативной моделью для выяснения разных сторон жизненно важной роли симбиотической микрофлоры в организме человека. Они же представляют собой высокочувствительную и наиболее адекватную живую модель для изучения различных форм клинической патологии человека, расшифровки патогенеза заболеваний, разработки и испытания новых средств терапии [2, 7].

В спонтанной инфекционной патологии обезьян по частоте возникновения большую роль играют кишечные инфекции бактериальной природы, которые нередко являются причиной, как тяжелых заболеваний желудочно-кишечного тракта, так и массовой гибели обезьян [1, 8, 9]. Многолетние бактериологические исследования, проведенные ранее в лаборатории инфекционной патологии Сухумского питомника, по изучению кишечных заболеваний обезьян показали этиологическую связь с известными патогенными возбудителями семейства *Enterobacteriaceae (Shigella, Salmonella, Yersinia и др.).* В то же время

большое число случаев острых кишечных инфекций остается нерасшифрованными, хотя клинические и эпизоотологические наблюдения свидетельствуют об их инфекционной природе [3, 6].

Установлено, что нормальная микрофлора кишечника разных видов низших азиатских и африканских обезьян представлена различными таксономическими группами микроорганизмов и по качественному и количественному показателям приближается к таковой здорового человека [1, 4, 5, 8].

Целью настоящего исследования является идентификация патогенных и условно-патогенных энтеробактерий у клинически здоровых и больных обезьян с патологией кишечника.

Материалы и методы исследования

Общее количество исследованных обезьян составило 466 особей разного вида (макаки резусы, макаки яванские, макаки японские, павианы гамадрилы) обоего пола, разных возрастных групп (таблица 1).

Таблица 1

Видовой состав и количество обследованных обезьян

№	Вид обезьян	Распределение по полу		Количество
		Самки – ♀	Самцы – ♂	
1.	Макаки резусы	179	188	367
2.	Макаки яванские	15	47	62
3.	Макаки японские	2	5	7
4.	Павианы гамадрилы	24	6	30
Всего		220	246	466

Материалом для исследования служили образцы фекалий у здоровых и больных обезьян, у погибших особей исследовали паренхиматозные органы и отделы кишечника. Обезьяны содержались в открытых вольерах или в групповых клетках, в которых кормовые площадки, отапливаемые в зимнее время домики, водопровод с автопоилкой, естественное освещение. Питались животные сбалансированным брикетированным кормом, фруктами, овощами и т.п.

В работе использовали дифференциально-диагностические питательные среды для культивирования энтеробактерий: Среды Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар, мясопептонный агар. Первичные посевы производили на пластинчатые среды. При первоначальном осмотре инкубированных чашек фиксировали внимание на морфологических особенностях тех или иных колоний. Для первичной родовой дифференцировки использовали короткий биохимический ряд – трехсахарный агар Клиглера, цитрат Симмонса, фенилаланин-агар.

При видовой идентификации применяли набор «ЭНТЕРОтест-16», производства Erba Lachema, CZ (Чехия). Набор рассчитан на 60 определений и включает 10 стриппированных пластмассовых пластинок, содержащих 96 ячеек с высушенными питательными средами и субстратами для 16 тестов: сероводород, лизин, индол, орнитин, уреаза, фенилаланин, эскулин, цитрат симмонса, малонат, инозитол, адонитол, целлобиоза, сахароза, сорбитол, трегалоза и маннтиол, идентификация дополняется тестами на бумажных полосках для определения цитохромоксидазы, β –галактозидазы и продукции ацетоина. При оценке «ЭНТЕРОтест -16» ориентировались по цветным реакциям контрольных штаммов, цветной шкале сравнения, бланк для регистрации результатов позволял легко получить так называемый профиль, т.е. цифровой код по которому можно найти результат вида полученного микроорганизма по Книге кодов («идентификационной таблице»).

При постановке антибиотикограммы выделенных условно-патогенных энтеробактерий использовали основной набор для определения чувствительности энтеробактерий к противомикробным лекарственным препаратом, в состав которых входили девять антибиотиков: ампициллин, триметоприм/сульфаметоксазол, амоксициллин-клавуланат, норфлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим. Дополнительно были применены и другие антибиотики – оксациллин, левомицетин, цефазолин, ванкомицин, гентамицин. Постановку антибиотикочувствительности проводили на среде АГВ согласно «Микробиологическому мониторингу и эпидемиологическому анализу антибиотикорезистентности микроорганизмов». Критерии интерпретации результатов определения антибиотикочувствительности проводили, учитывая пограничные значения диаметров

зон задержки роста микроорганизмов, указанных в таблице прилагаемой инструкции.

Результаты исследования

В результате исследования было обследовано 342 клинически здоровых обезьян, 118 больных особей с кишечными дисфункциями, а также исследованы 6 погибших обезьян с патологией желудочно-кишечного тракта (таблица 2.).

Таблица 2

Группы исследованных обезьян

Группы обезьян	Пол	Количество обезьян
Здоровые обезьяны	♂ – 172 ♀ – 170	342

Проведенное бактериологическое исследование обезьян позволило дать сравнительную характеристику микрофлоры кишечника клинически здоровых и больных обезьян. В результате исследования патогенные представители семейства *Enterobacteriaceae (Shigella, Salmonella, и др.)* у обезьян не обнаружены.

По данным исследований в группе клинически здоровых особей в кишечнике были обнаружены с высокой частотой представители вида *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью и *Enterococcus.* Нормальная микрофлора кишечника выполняет ряд важных функций – участвует в обменных процессах, оказывает влияние на состояние гуморального иммунитета, обладает витаминнообразующей функцией и выраженной антагонистической активностью по отношению к патогенным и гнилостным бактериям. Некоторые представители условно-патогенных энтеробактерий обнаруживались в группе клинически здоровых обезьян на пластинчатых чашках в виде единичных колоний, что свидетельствует об их низкой концентрации в исследуемом материале.

При дисбиотических явлениях желудочно-кишечного тракта, диарейных синдромах у больных обезьян выделялись чаще представители условно-патогенных энтеробактерий – представители рода – *Proteus, Enterobacter, Morganella, Klebsiella.* Указанные энтеробактерии являются представителями резидентной флоры и обнаруживаются в кишечном содержимом обезьян в норме непостоянно или в низких титрах. Частота обнаружения рода – *Proteus* превышает у больных обезьян в 2-3 раза по сравнению с другими энтеробактериями, что служит подтверждением этиологической связи представителей гнилостной флоры в патологическом процессе кишечника.

Исследования чувствительности выделенных условно-патогенных штаммов энтеробактерий к антибиотикам показало их устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда и чувствительность к ряду цефалоспоринов 2-4 поколения, что дает возможность для лечения возбудителей кишечных инфекций.

При исследовании погибших обезьян с патологоанатомическим диагнозом катаральные и геморрагические проявления в отделах кишечника условно-патогенные энтеробактерии выделялись как из фекалий, так и из паренхиматозных органов (печени, селезёнки и мезентериальных лимфоузлов).

Частота обнаружения условно-патогенных энтеробактерий у больных и погибших обезьян в отделах кишечника, а также выделение энтеробактерий у погибших обезьян из паренхиматозных органов, позволяет предположить этиологическую причастность данных микроорганизмов в развитии кишечных патологий.

Нужно отметить, что остается высокий процент этиологически не расшифрованных кишечных инфекций и это требует расширения спектра исследуемых бактериальных агентов, в том числе микроаэрофилов и анаэробов, а также возможную причастность энтеровирусов, вызывающих кишечные диарейные заболевания.

Таким образом, приведенные материалы бактериологического исследования больных, погибших, от кишечных инфекций обезьян свидетельствуют, что в стаде питомника среди обследуемых видов обезьян не циркулируют патогенные представители энтеробактерий.

Сходство состава нормофлоры кишечника, а также причин и механизмов развития дисбиозов, кишечных инфекций у обезьян и челове-

ка позволяет рекомендовать обезьян как адекватный биообъект для доклинической оценки безвредности и эффективности разрабатываемых микробных и сывороточных биопрепаратов медицинского назначения, предлагаемых для нормализации кишечного микробиоценоза.

Литература

1. Алешкин В.А., Лапин Б.А., Афанасьев С.С., Поспелова В.В., Джикидзе Э.К., Афанасьев М.С. Обезьяна как объект изучения иммунобиологических препаратов. // Вестник РАМН. – 2006- №2 – с.11-15.
2. Джикидзе Э.К., Шагинян С.А., Поспелова В.В. Использование обезьян как модели для оценки эффективности микробных препаратов при заболеваниях, связанных с дисбактериозом. // Вестник АМН СССР. – 1986 – №3- с. 74-77.
3. Кукава Г.Г., Джикидзе Э.К., Стасилевич З.К., Крылова Р.И., Кебу Т.И. Биологическая характеристика клебсиелл, выделенных от обезьян в норме и при патологии. // Baltic.J.Lab.Animal. Sci.- 1998- 8 – 321-237.
4. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии. // М.-1987-с.188.
5. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Шагинян С.А., Поспелова В.В., Вильшанская Ф.Л. и др. Применение бактерийных биопрепаратов при клинически выраженных дисбактериозах у обезьян в условиях питомников и зоопарков // Методические рекомендации. – г. Сухуми- 1986- с14.
6. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Шевцова З.В., Стасилевич З.К..Моделирование инфекционных заболеваний человека на лабораторных приматах.// Сочи – 2011 – с.225.
7. ОнищенкоГ.Г., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Поспелова В.В. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии // Москва – ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ – 2002 – 608с.
8. Шагинян С.А. Дисбактериоз у обезьян, его профилактика и лечение бактерийными препаратами // Автореферат.- М. – 1971- с.22.
9. Kebu. T. I., Stasilevich Z. K., Dzhikidze E.K., Krylova R. I. Opportunistic bacteria in healthy and sick monkeys of different species, suffering from acute intestinalis infections. // Baltic J. Lab. Anim. Sci.- 1998.- №8. P. 177-182.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА ОБЕЗЬЯН ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ И ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA PERTUSSIS*

А. А. Амичба[2], А. Ю. Медкова[1], А. З. Матуа[2], Л. Н. Синяшина[1], Е. Г. Семин[1], Кубрава[2] Д. Т., Конджария[2], В. С. Баркая[2], З. В. Шевцова[2], З. Я. Миквабиа[2] , Г. И. Каратаев[1]

[1]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д.18,

[2]НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии Наук Абхазии, 384900, Абхазия, Сухум, ул. Гора Трапеция, д. 27

e-mail: karataevgi@rambler.ru

Резюме

Проведено сравнительное изучение реакции организма обезьян макака резус в ответ на экспериментальное интраназальное введение рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis 4M* и изогенных вирулентных бактерий *B.pertussis 475.* Показана схожая динамика накопления специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови, размножения и эрадикации в носоглотке обезьян рекомбинантных аттенуированных и изогенных вирулентных бактерий *B.pertussis.* Клинические и лабораторные признаки коклюша были отмечены только у обезьян, первично инокулированных вирулентными бактериями *B.pertussis 475.* Таким образом, рекомбинантные аттенуированные бактерии *B. pertussis 4M* безопасны и способны формировать защитный иммунный ответ, сопоставимый с постинфекционным.

Ключевые слова: обезьяны, коклюш, экспериментальная инфекция, вирулентные бактерии, аттенуированные бактерии, иммунитет, инфекционный процесс.

THE COMPARATIVE STUDY OF NON-HUMAN PRIMATES BODY REACTION TO EXPERIMENTAL INTRANASAL ADMINISTRATION OF RECOMBINANT ATTENUATED AND VIRULENT *BORDETELLA PERTUSSIS* BACTERIA

A. A. Amichba[2], A. Yu. Medkova[1], L. N. Sinyashina[1], E. G. Semin[1], A. Z. Matua[2], D. T. Kubrava[2], I. G. Kondzariya[2], V.S.Barkaiy[2], Z.V. Shevtsova[2] , Z. Ya. Mikvabia[2], G. I. Karataev [1]

[1]Gamaleya Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098 Russia

[2]Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Abkhazian Academy of Sciences, Sukhumi, Abkhazia

Abstract

The comparative study of *Macaca mulatta* body reaction to experimental intranasal administration of recombinant attenuated bacteria *Bordetella pertussis 4M* and isogenic virulent bacteria *Bordetella pertussis 475* was conducted. Similar dynamics of specific antibodies accumulation in blood serum, of bacterial growth and eradicating in primates' nasopharynx of recombinant attenuated and isogenic virulent *Bordetella pertussis* bacteria was shown. Clinical and laboratory signs of pertussis were found only in primates first inoculated by virulent bacteria *B. pertussis 475*. Therefore, recombinant attenuated bacteria *Bordetella pertussis 4M* are harmless and capable of developing protective immune response against whooping cough, comparable to postinfection immunity.

Key words: non-human primates, pertussis, experimental infection, virulent bacteria, attenuated bacteria, immune response, infection process

Введение

Коклюш – антропонозное инфекционное заболевание, вызываемое патогенными бактериями *Bordetella pertussis*, характеризующееся острым катаром дыхательных путей и упорным продолжительным кашлем. Резервуаром и источником инфекции является только человек. Входными воротами инфекции служит слизистая оболочка ре-

спираторного тракта. На месте внедрения возбудителя наблюдаются местные изменения в виде первичного аффекта – катаральное воспаление и увеличение секреция слизи.

Высшие приматы – единственные животные, у которых описана вспышка коклюша с развитием кашля [8]. В открытом зоологическом парке в Швеции у девятнадцати шимпанзе и двух горилл коклюш протекал в типичной форме с приступами кашля, катаральными явлениями и образованием вязкой слизи. В начальном периоде заболевания отмечали лейкоцитоз в периферической крови, а в более поздние сроки методом ELISA были выявлены антитела к *B. pertussis* и ретроспективно поставлен диагноз «Коклюш». Характерный для типичной формы коклюша кашель, наряду с лабораторными показателями коклюша и размножением бактерий *B. pertussis* в носоглотке, индуцировало экспериментальное инфицирование неполовозрелых павианов анубис [9,10].

В более ранних работах имеются сообщения о воспроизведении ряда признаков коклюша у низших приматов – тайваньских макак и мармозет: развитие лимфоцитоза, катаральных явлений, образование слизи, а также передача бактерий *B. pertussis* другим особям [7].

В наших исследованиях, выполненных на базе НИИЭПиТ АН Республики Абхазия, зарегистрированы передача бактерий *B. pertussis* павианам гамадрилам естественным путем от рабочего по уходу за животными и эпизоотический очаг коклюша в условиях питомника. Установлена возможность передачи бактерий *B. pertussis* от человека к обезьяне и от обезьяны к обезьяне без характерного коклюшного кашля [5]. Экспериментальное инфицирование вирулентными бактериями *B. pertussis* половозрелых обезьян 4-х видов (макак-резус, макак японский, макак яванский и павиан гамадрил) в возрасте 2-3 лет вызывало развитие патологического процесса в верхних дыхательных путях, характеризующегося катаральными явлениями с образованием вязкой слизи. Лабораторные клинические анализы выявили наличие лейкоцитоза и гипогликемии и размножение возбудителя в носоглотке животных. Патологический процесс сопровождался выработкой специфических антител к возбудителю коклюша и развитием специфического Т-клеточного иммунного ответа [2, 6]. Кашля, характерного для

типичной формы коклюша, у инфицированных обезьян зарегистрировано не было, при этом была выявлена передача бактерий *B. pertussis* от экспериментально инфицированных обезьян к нативным [5].

Представленные результаты позволяют говорить, что низшие приматы являются воспроизводимой экспериментальной моделью и перспективной для более глубокого изучения патогенеза коклюша и взаимодействия бактерий *B. pertussis* с макроорганизмом. Можно ожидать, что, несмотря на высокую стоимость экспериментов с использованием обезьян, дальнейшее развитие получат исследования не только по изучению иммунного ответа при коклюше, но и работы направленные на определение роли отдельных факторов вирулентности в формировании поствакцинального иммунитета.

Цель исследования – сравнительное изучение реакции организма обезьян в ответ на экспериментальное интраназальное введение изогенных вирулентных и аттенуированных бактерий *B. pertussis.*

Материалы и методы работы

Питательные среды для выращивания бактерий B. pertussis

Бактерии *B. pertussis* и смывы с назофарингеальных тампонов культивировали на твердой питательной среде КУА (казеиново-угольный агар ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России) или КУА с добавлением 15% дефибринированной крови барана.

Введение бактерий B.pertussis

Использовали половозрелых обезьян макак-резус Сухумского питомника в возрасте 2-5 лет, мужского пола, по клиническим и лабораторным данным находящихся в состоянии соматического здоровья. Перед манипуляциями (введение бактерий и взятие мазков из носоглотки) обезьян усыпляли внутримышечным введением 0,03-0,04 мл золетила (*Virbac*, Франция) в концентрации 100 мг/мл (с премедикацией 20 мг/мл ксилазингидрохлорида). Вирулентные *(B. pertussis 475)* и аттенуированные (*B. pertussis 4M*) бактерии вводили обезьянам интраназально в количестве 10^9-10^{10} микробных клеток (м.к.) в 0,5 мл 0,85% раствора NaCl.

Определение специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови обезьян проводили с помощью ИФА в соответствии с описани-

ем наборов: IgG и IgM к коклюшному токсину (КТ) и филаментозному гемагглютинину (ФГА) *Ridascreen* (Германия). Исследования проводили в динамике, начиная с третьего дня после экспериментального введения. Кровь для анализа брали из вены обезьян без наркоза с использованием «прижимных клеток». Количество иммуноглобулинов определяли в процентах из соотношения $ОП_{К+}/ОП_i$ х100%, где $ОП_{К+}$ – значение оптической плотности положительного контроля, а $ОП_i$ – значение оптической плотности измеряемого образца**.**

Выделение ДНК из смывов с назофарингеальных тампонов проводили с использованием магнитного сорбента в соответствии с инструкцией к набору *Wizard Genomic DNA Purification System* («*Promega*», США).

Для выявления ДНК B. pertussis в образцах использована модифицированная тест-система ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [3,4].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы *Microsoft Excel* 2007 и методов статистической обработки, принятых в биологии и медицине [1]. Для каждого исследуемого параметра определяли среднее значение, и стандартное отклонение. Для сравнения величин использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Две экспериментальные группы животных включали по 5 половозрелых особей мужского пола в возрасте 2-3-х лет. Обезьянам интраназально вводили изогенные вирулентные бактерии *B. pertussis 475* и аттенуированные бактерии *B. pertussis 4M* в дозе 10^9-10^{10} бактерий, по 0,5 мл суспензии в каждую ноздрю.

Через 6 месяцев было проведено повторное экспериментальное введение. Спустя 12 месяцев после повторного введения аттенуированных бактерий *B. pertussis 4M* обезьян экспериментально инфицировали вирулентными бактериями *B. pertussis 475*.

Обследование обезьян после каждого экспериментального введения проводили по описанной ранее схеме: наблюдение за общим состоянием здоровья; общий и биохимический анализ крови, определе-

ние специфических иммуноглубулинов IgM и IgG и изучение динамики бактериальной нагрузки методом ПЦР-РВ [2].

Изучение общего состояния здоровья обезьян и анализа крови после экспериментального заражения вирулентными и атенуированными бактериями B. pertussis

Первое и повторное интраназальное введение обезьянам аттенуированных бактерий *B. pertussis 4M* не выявило отклонений от нормы в поведении и общем состоянии здоровья животных, биохимическом анализе крови, формуле крови и содержании глюкозы. Не было выявлено воспалительных реакций в носоглотке животных, что свидетельствовало об отсутствии местных реакций на введение рекомбинантных бактерий.

Экспериментальное введение обезьянам вирулентных бактерий *B. pertussis* через 12 месяцев после повторного введения аттенуированных бактерий *B. pertussis 4M* также не выявило отклонений от нормы измеряемых параметров (таблица 1). В то же время при интраназальном введении нативным обезьянам вирулентных бактерий *B. pertussis 475* на 3-10 день были зарегистрированы признаки развития инфекционного процесса при коклюше: увеличение количества лейкоцитов и снижение уровня глюкозы в крови, образование вязкой слизи и катарального воспаления верхних дыхательных путей.

Таблица 1.

Результаты анализа крови макак-резусов после экспериментального введения изогенных вирулентных и рекомбинантных аттенуированных бактерий *B. pertussis*

Инокуляция бактерий	дни после инокуляции	Лейкоциты (абс. кол-во, тыс)	Глюкоза Ммоль/литр
Первая B. pertussis 4M	фон	10,1±2,8	5,4±1,1
	3	8,2±1,9	4,7±0,3
	7	9,8±2,7	5,5±0,5
	14	9,1±2,6	4,7±0,7

Первая B. pertussis 475	фон	9,8±1,9	6,2±0,3
	3	12,1±1,4	5,7±0,7
	7	17,8±2,9	4,4±0,6*
	14	19,3±2,9*	4,7±0,4*
Повторная B. pertussis 475	фон	7,2±1,9	4,4±0,6
	3	8,0±3,1	4,7±0,4
	7	9,4±2,6	5,3±0,5
	14	9,8±2,5	4,7±0,4
B. pertussis 4M + B. pertussis 475	фон	10,8±1,9	6,2±0,3
	3	11,1±1,7	5,7±0,6
	7	11,8±2,7	6,1±0,7
	14	10,9±1,9	6,7±0,4

B. pertussis 4M – рекомбинантные аттенуированные бактерии*;* \

B. pertussis 475 – вирулентные бактерии; *- достоверное отличие между фоновыми и измеряемыми значениями (p>0,95).

Таким образом, первичное интраназальное введение обезьянам аттенуированных бактерий *B. pertussis 4M* и последующее экспериментальное инфицирование вирулентными бактериями *B. pertussis 475* не привело к развитию клинических и лабораторных признаков развития инфекционного процесса при коклюше. В отличие от этого, интраназальное введение вирулентных бактерий *B. pertussis 475* нативным обезьянам сопровождалось выраженными катаральными явлениями в верхних дыхательных путях с образованием вязкой слизи и лейкоцитозом. Схожие параметры развития инфекционного процесса были описаны нами при разработке экспериментальной модели коклюша у низших обезьян [2].

Изучение бактериальной нагрузки в носоглотке обезьян после интраназального введения рекомбинантных аттенуированных бактерий B.pertussis

Размножение бактерий *B. pertussis* в носоглотке и персистенция в организме человека является важной характеристикой коклюшной инфекции.

Аттенуированные бактерии *B. pertussis* при интраназальном введении обезьянам, предположительно, должны размножаться в верхних дыхательных путях аналогично вирулентным бактериям *B. pertussis 475*. Для регистрации бактерий *B. pertussis* в носоглотке обезьян используется бактериологический и молекулярно-генетический методы.

«Золотым стандартом» для диагностики коклюша является бактериологический метод. Согласно стандартной методике, проводили посев материала, взятого с задней стенки носоглотки обезьян на среду КУА с кровью. Используя методы типирования колоний с помощью специфических сывороток к агглютиногенам 1, 2 и 3, нам удалось в большинстве случаев идентифицировать аттенуированные бактерии *B. pertussis* в разные сроки после инокуляции бактерий. Однако бактериологическим методом не удалось количественно определить бактерии *B. pertussis* в носоглотке. Поэтому для количественной идентификации бактерий *B. pertussis* был использован метод ПЦР-РВ.

На рисунке 1 представлена динамика изменения количества бактерий *B. pertussis* в смывах с назафорингеальных тампонов обезьян, которым интраназально вводили вирулентные или аттенуированные бактерии *B. pertussis*. Видно, что после первого введения количество выявленных геном-эквивалентов *B. pertussis 475* и *4M* достигло максимума спустя 7-14 дней и совпало со значениями, приведёнными в работе американских авторов для бактерий *B. pertussis D420*, полученных при использовании детёнышей павиана анубис [9].

После повторного интраназального введения в носоглотке обезьян накопления как аттенуированных бактерий *B. pertussis 4M*, так и вирулентных бактерий *B. pertussis 475* зарегистрировано не было. Значительно уменьшился и максимальный период элиминации бактерий *B. pertussis*. С помощью ПЦР-РВ к 28 дню после повторной инфекции удалось зарегистрировать лишь единичные геном-эквиваленты *B. pertussis* (кривые 2, 4), в то время как в эти же сроки после первого введения число геном-эквивалентов составляло несколько десятков. Аналогичная картина наблюдалась у обезьян, которым инокулировали вирулентные бактерии *B. pertussis 475* через 12 месяцев после первичного введения аттенуированных бактерий.

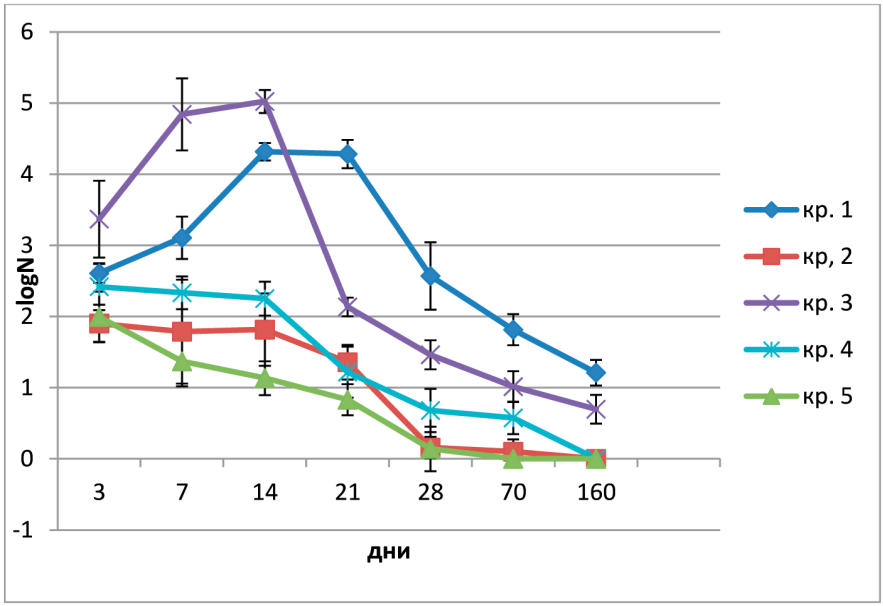


Рисунок 1. Динамика изменения количества геном-эквивалентов B. pertussis в носоглотке обезьян после первого и повторного интраназального введения изогенных вирулентных и аттенуированных бактерий B. pertussis

Кривая 1 – первое введение аттенуированных бактерий; кривая 2 – повторное введение аттенуированных бактерий; кривая 3 – первое введение вирулентных бактерий; кривая 4 – повторное введение вирулентных бактерий; кривая 5 – введение вирулентных бактерий через 12 месяцев после введения аттенуированных бактерий.

У контрольных животных (2 обезьяны) бактерии *B. pertussis* обнаружены не были ни бактериологическим методом, ни в ПЦР-РВ.

Изучение динамики изменения титров специфических IgG и IgM в сыворотке крови обезьян макак-резус после интраназального введения рекомбинантных аттенуированных бактерий B. pertussis

При первом интраназальном введении вирулентных и аттенуированных бактерий *B. pertussis* количество специфических IgG в сыворотки крови животных нарастало с 10-14 дня, и достигало максимума к 21-28 дню (рисунок 2).

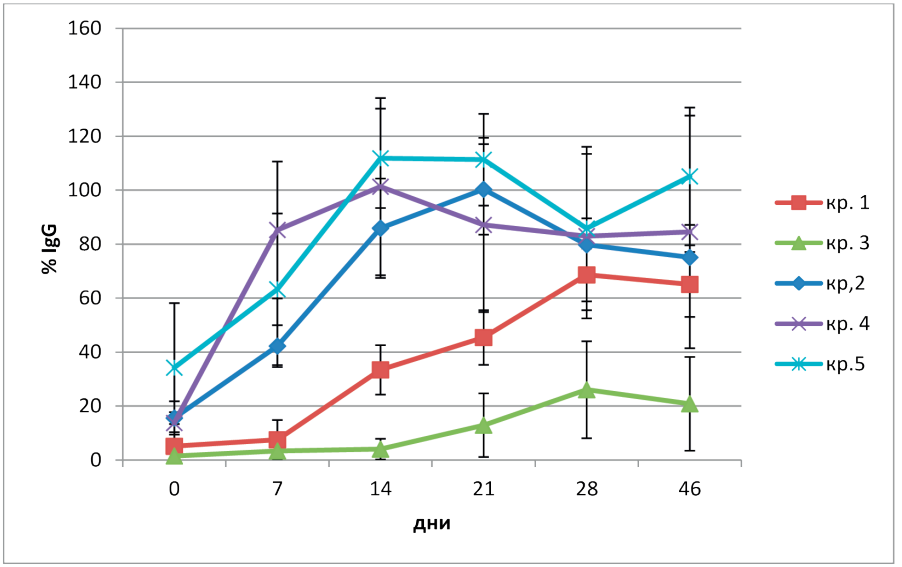


Рисунок 2. Динамика изменения количества IgG в сыворотке крови обезьян после первого и повторного экспериментального введения изогенных вирулентных и аттенуированных бактерий B. pertussis

Кривая 1 – первое введение аттенуированных бактерий; кривая 2 – повторное введение аттенуированных бактерий; кривая 3 – первое введение вирулентных бактерий; кривая 4 – повторное введение вирулентных бактерий; кривая 5 – введение вирулентных бактерий через 12 месяцев после введения аттенуированных бактерий.

При повторном интраназальном введении динамика изменения титров специфических IgG в организме обезьян заметно менялась. Практически у всех животных количество антител нарастало быстро и достигало максимума уже к 10-14 дню. Абсолютные значения количества IgG так же были значительно выше, чем после первого введения. Эти результаты полностью соответствовали нашим данным, полученным на других видах обезьян Старого Света при разработке модели экспериментального коклюша и показали также наличие выраженного бустерного эффекта при гуморальном иммунном ответе после по-

вторного введения как аттенуированных бактерий *B. pertussis 4M*, так и изогенных вирулентных бактерий *B. pertussis 475*. Быстрое нарастание специфических антител после повторного контакта с антигенами *B. pertussis,* по-видимому, способствует подавлению размножения возбудителя коклюша и ускорению эрадикации из респираторных путей. Возможно, этот процесс усиливается за счет местного мукозального иммунитета. При повторном введении уровень IgA увеличивается не только в периферической крови обезьян, но и в слизистой носоглотки. Однако, зарегистрировать значимого повышения уровня IgA у макак резусов нам не удалось, вероятно, из-за невозможности использования наборов *R-Biopharm* (Германия), предназначенных для определения антител IgA у человека.

Таким образом, экспериментальное введение обезьянам бактерий *B. pertussis* приводило к продукции специфических иммуноглобулинов IgG, динамика накопления которых не отличалась у животных, инфицированных однократно или двукратно как вирулентными, так и рекомбинантными аттенуированными бактериями. Первый контакт с вирулентными и аттенуированными бактериями *B. pertussis* приводит к формированию защитной реакции организма обезьян: наблюдается подавление размножения возбудителя коклюша, ускорение темпов эрадикации из носоглотки и развитие гуморального иммунного ответа. Повторная коклюшная инфекция сопровождалась бустерным эффектом и не зависела от штамма бактерий *B. pertussis*. Представленные результаты выявили идентичный иммунный ответ у обезьян после интраназального введения аттенуированных бактерий *B. pertussis 4M* и изогенных вирулентных бактерий *B. pertussis 475.*

Этот вывод подтвердился и результатами измерения специфических IgG в сыворотке крови обезьян, которым через 12 месяцев после первого интраназального введения аттенуированных бактерий *B. pertussis* повторно ввели вирулентные бактерии *B. pertussis 475* (рисунок 2). Кривая 5 практически не отличается от кривых 2 и 4, отражающих динамику накопления IgG после повторного введения бактерий *B. pertussis*. Такую же закономерность можно увидеть при сравнении кривых эрадикации вирулентных бактерий *B. pertussis* из носоглотки обезьян (рисунок 1).

Отсутствие тест-систем для определения коклюшных иммуноглобулинов методом ИФА у обезьян значительно осложняет регистрацию специфических антител у этих животных. Использованная нами тест-система ИФА IgG человека *B. pertussis Ridascreen* (Германия) была эффективной для регистрации IgG у макак-резусов, однако тест-система этой же фирмы для IgA человека была совершенно не чувствительна к IgA обезьян. Количество IgM у обезьян на разных сроках после экспериментального введения удалось определить с помощью тест-системы ИФА IgM человека *B. pertussis Ridascreen* (Германия), несмотря на низкую эффективность этой тест-системы при работе с сыворотками обезьян. После повторного введения не был выявлен бустерный эффект выработки IgM, независимо от штамма бактерий. Скорее, регистрируется тенденция к уменьшению максимальных значений IgM при повторном экспериментальном инфицировании животных, что объясняется, по-видимому, отсутствием клеток памяти, обеспечивающих ускоренный синтез IgM при повторном контакте с возбудителем коклюша.

Заключение

Использование обезьян вида макак-резус позволило сравнительно изучить реакцию макроорганизма в ответ на интраназальное введение рекомбинантных аттенуированных бактерий *B. pertussis 4M* и изогенных вирулентных бактерий *B. pertussis 475*. Интраназальное введение макакам резус рекомбинантных аттенуированных бактерий *B. pertussis 4M* не сопровождалось развитием клинико-лабораторных показателей коклюша, в отличие от инфекционного процесса, индуцированного изогенными вирулентными бактериями *B. pertussis 475*. При этом выявлена однотипная гуморальная реакция организма обезьян с выработкой специфических IgG, сопровождающаяся выраженным бустерным эффектом при повторном введении бактерий *B. pertussis*. Определена схожая защитная реакция слизистой верхних дыхательных путей обезьян с эрадикацией вирулентных и аттенуированных бактерий *B. pertussis* в течение 10-14 дней после экспериментального инфицирования.

Сравнительное изучение реакции организма обезьян при экспериментальном интраназальном введении аттенуированных и виру-

лентных бактерий *B. pertussis* показали, что кандидатные для живой коклюшной вакцины рекомбинантные аттенуированные бактерии *B. pertussis 4M* безопасны и способны формировать защитный иммунный ответ сопоставимый с постинфекционным.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М: Практика, 1999. – 459 с.
2. Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н. и др. Экспериментальный коклюш у обезьян // Вестник РАМН. – 2013. -№ 8. – С. 4-8.
3. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н. и др. Выявление инсерционных мутантов авирулентных bvg$^-$-мутантов Bordetella pertussis у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией и практически здоровых людей // Молекул. генетика, микробиология и вирусология – 2010. – № 4. – С. 9-13.
4. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н. и др. Распространенность стертых форм коклюша и анализ фазовых состояний бактерий Bordetella pertussis // Детские инфекции. – 2010. – № 4. – С. 19-22.
5. Медкова А.Ю., Каратаев Г.И.Шевцова З.В.., и др. Эпизоотический очаг коклюша у обезьян вида Papio gamadryas // Журнал инфектологии – 2015. – Т.7. – №3. -С. 103-111.
6. Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Сёмин Е.Г. и др. Иммуногенность и безопасность живой коклюшной вакцины на модели обезьян вида макака резус // Материалы 3-й международной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии». – Сочи-Адлер, 2016. – Т.1. -С. 97-105.
7. Elahi S., Holmstrom J., Gerdts V. The benefits of using diverse animal models for studying pertussis // Trends. Microbiol. – 2007. -V. 15. – № 10. – P. 462-468.
8. Gustavsson O.E., Röken B.O., Serrander R. An epizootic of whooping cough among chimpanzees in a zoo // Folia Primatol (Basel).- 1990. -V. 55. – № 1. – P. 45-50.
9. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K. et al. Nonhuman primate model of Bordetella pertussis // Infect. Immun. – 2012. – V. 80. – № 4. – P. 1530-1536.
10. Warfel J.M., T.J. Merkel. Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1immune memory cells in nonhuman primates // Mucosal Immunology – 2013. –V.6. – № 4. -P. 786-797

ПРОТОЗОЙНЫЕ ИНВАЗИИ ПРИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ У ОБЕЗЬЯН

Егорова Т. П.
ФГБНУ Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи, Россия
tateg49@yandex.ru

Резюме

Установлены представители паразитических протозоозов при кишечной патологии у обезьян. Был исследован материал от 292 погибших животных, из которых 174 (59.5%) оказались с патологией кишечника. Из них у 129 (74.1%) обезьян обнаружена инвазия паразитическими простейшими Lamblia intestinalis, Balantidium coli и Blastocystis sp. в виде моноинвазий и полиинвазий в различных сочетаниях.

Ключевые слова: обезьяны, кишечная патология, протозойные инвазии, Lamblia intestinalis, Balantidium coli, Blastocystis sp.

PROTOZOA INVASIONS IN ACUTE INTESTINAL DISEASES IN MONKEYS

Egorova T. P.
FSBSI "Scientific Research Institute of Medical Primatology", Sochi-Adler, Russia
tateg49@yandex.ru

Abstract

There were detected representatives of protozoa parasitic at monkeys' intestinal pathology. Were searched data of 292 dead animals, while 174 (59, 5%) of them had intestinal pathology. Among them 129 (74, 1%) monkeys had parasitic protozoa invasion *L*amblia intestinalis, Balantidium coli, Blastocystis sp. in the form of monoinvasions and polyinvasions in different combinations.

Key words: monkeys, intestinal pathology, parasitic protozoa invasions, *L*amblia intestinalis, Balantidium coli, Blastocystis sp.

Введение. Желудочно-кишечные заболевания, возникающие на фоне различных предрасполагающих факторов, являются наиболее частой патологией при содержании обезьян в неволе. Паразитарные болезни у обезьян встречаются с раннего возраста и являются одним из основных видов патологии. Важными возбудителями острых кишечных расстройств являются паразитарные инвазии, в том числе протозойные. Среди протозойной фауны у обезьян в пищеварительном тракте могут существовать 15 видов простейших, из них только несколько видов являются патогенными, т.е. способны вызывать заболевания [4]. Общеизвестно, что находясь в кишечнике, паразиты являются частью паразитоценоза данного биотопа, участвуют в его формировании и, как следствие, при нарушении баланса его сочленов создаются условия для развития патологических процессов [3].

Целью работы было проанализировать результаты встречаемости патогенных простейших у погибших обезьян с патологией органов пищеварения.

Методы исследования. Исследования проводились в условиях питомника обезьян, находящегося в Адлерском районе г. Сочи. В основу работы положены результаты паразитологических обследований погибших животных с диагнозами острых кишечных заболеваний (энтериты, энтероколиты, колиты) в период с 2014 по 2016 г. Материалом для данного исследования послужили пробы содержимого из трёх отделов кишечника погибших обезьян 6 видов – Макак резус, М. яванский, М. лапундер, Мартышка зеленая, Павиан анубис, П. гамадрил (табл. 2). Для исследований применялся метод микроскопии нативных препаратов из фекалий с физиологическим раствором и окрашенных раствором Люголя. Микроскопическое исследование проводили при увеличении 10х10, 10х40.

Результаты и их обсуждение. За данный период времени у погибших обезьян с патологиями кишечника в виде энтеритов, энтероколитов и колитов, нами были обнаружены протозойные инвазии простейшими Lamblia intestinalis, Balantidium coli и Blastocystis sp. Известно, что эти простейшие при определенных условиях могут проявлять свои патогенные потенциалы.

Лямблии паразитируют в тонком кишечнике и, прежде всего, нарушают его функцию, вызывая, как механическое, так и токсическое повреждение эпителия на значительной поверхности кишечника. Атрофия ворсинок кишечника – основное патологоанатомическое нарушение, сопровождающее лямблиозную инвазию. Исследования по проблеме лямблиоза свидетельствуют о способности паразитов отягощать сопутствующие заболевания желудочно-кишечного тракта, приводят к мальабсорбции и длительной диарее. При этом лямблиоз ведет не только к нарушению эффективности пищеварения, но и к снижению защитных сил, нарушает иммунную систему [1. 2].

Обычным местом локализации балантидий является толстый кишечник (в основном слепая и ободочная кишка), реже – нижний отдел тонкого кишечника. Локализуясь в просвете кишечника, балантидии могут проявить свою патогенность, переходя к тканевому паразитизму, поселяясь в толще кишечной стенки. При попадании в подслизистый слой балантидии начинают интенсивно размножаться, в результате чего иногда образуются очень значительные скопления инфузорий, вызывающие изъязвления мышечного слоя кишечной стенки [5].

Экологической нишей для бластоцист является слепая кишка и проксимальная часть ободочной кишки, в меньшей мере самая дистальная часть подвздошной кишки, где паразит обнаруживается в эпителии слизистой оболочки. До недавнего времени бластоцистную инвазию рассматривали не как этиологический фактор патологического состояния, а как транзитный протозооз, характерный для путешественников в тропические и субтропические страны [6]. В настоящее время термин «бластоцистоз» правомочно применяют для обозначения самостоятельно нозологической формы инвазионного заболевания [7, 8].

Объединяет эти протозойные инвазии то, что они вызывают, как правило, клинически и субклинически заболевания, протекающие по прямому циклу по типу разветвленных цепных процессов. В связи с этим заражение животных наступает постоянно или периодически. Сходны также фекально-оральный механизм передачи этих инвазий и путь распространения – водный, пищевой, контактно-бытовой.

Нами было исследован материал от 292 погибших обезьян, из которых у 174 (59.5%) были поставлены посмертные диагнозы, связанные

с патологией кишечника – энтерит, энтероколит, колит – группой заболеваний, которые характеризуются острым или хроническим воспалением слизистой оболочки кишечника. Из них у 129 животных общая инвазированность простейшими Lamblia i., Balantidium c. и Blastocystis sp. составила 74.1%.

Анализ результатов исследований показал, что у большинства обезьян инвазия представлена в виде моноинвазий (72.8%), когда обнаруживался только один из названных паразитов. Также нами были выявлены варианты сочетаний разных видов простейших в виде полиинвазий (27.2%), в основном двучленные, реже трехчленные (табл. 1, 2). Чаще всего встречались двучленные сочетания, также именно бластоцист с лямблиями. Как свидетельствуют результаты исследований больше всего таких сочетаний наблюдалось у м. резусов и м. яванских. Высокие показатели инвазии у павианов анубисов и макаков лапундеров (табл. 2), дают нам повод считать их статистически недостоверными в связи с недостаточным количеством обследованных животных в этих группах. На основании анализа полученных данных нами также установлено, что у детенышей и старых животных полиинвазии встречались чаще, чем моноинвазии. Вероятно, это связано со сниженными защитными силами организма у этих категорий животных.

Таблица 1

Встречаемость простейших у обезьян при кишечной патологии

Простейшие	Встречаемость	
Моноинвазии	абс.	%
Lamblia intestinalis	47	27.0
Balantidium coli	14	8.0
Blastocystis sp.	33	18.9
Итого	94	72.8
Полиинвазии		
Balantidium. c., Lamblia i.	1	0.5
Balantidium c., Blastocystis sp.	4	2.3
Blastocystis sp., Lamblia i.	25	14.3
Blastocystis sp., Balantidium c., Lamblia i.	5	2.8
Итого	35	27.2

Таблица 2

Моноинвазии и полиинвазии протозоозов у обезьян разных видов

Обезьяны	Кол-во обследованных	Кол-во инвазированных	Кол-во моноинвазий	Кол-во полиинвазий
Макак резус	158	66(41.7%)	44 (66.6%)	22(33.4%)
Макак яванский	56	35(62.5%)	27 (77.2%)	8 (22.8%)
Макак лапундер	4	4(100%)	2 (50%)	2 (50 %)
Мартышка зеленая	13	7(53.8%)	6 (85.7%)	1 (14.3%)
Павиан анубис	13	3(23.1%)	3 (100%)	-
Павиан гамадрил	48	14(29.2%)	12 (85.7%)	2 (14.3%)
Итого	292	129	94 (72.8%)	35 (27.2%)

Выводы

Таким образом, есть основания полагать, что рассматриваемая нами паразитарная инвазия такими простейшими, как лямблии, балантидии и бластоцисты у обследованных обезьян, может служить причиной или фоном для развития острых кишечных заболеваний или отягощать их течение. Кроме того они могут выступать в качестве этиологических факторов острых кишечных заболеваний в случае снижения резистентности организма. Наличие полиинвазий свидетельствуют об отсутствии между ними каких либо антагонистических отношений, скорее всего они сожительствуют, многократно увеличивая ущерб, наносимый организму животного. В связи с этим присутствие и количество протозойных инвазий и оценка характера взаимоотношений в микробиоценозе будет определять тяжесть заболевания и его исход.

Литература

1. Егорова Т.П., Кебу Т.И. Лямблиозная инвазия у низших обезьян в условиях неволи. // Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии: Материалы Сочинской третьей международной конференции. – Сочи-Адлер. 2016. – Т.1. С.232-238.
2. Корниенко Е.А., Минина С.Н. Клиника, диагностика и лечение лямблиоза у детей. – СПб, 2008. – 31 с.
3. Лысенко А.Я. Роль условно-патогенных простейших в патологии человека на современном этапе // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 1994. – № 4. С. 3-8.С. 3-8.
4. Сахарова Т.В. Кишечные простейшие низших обезьян в условиях неволи. 1998. // Автореф. дис. …канд. биол. наук – М., 1998. – 21 с.
5. Сченснович В.Б., Хамцов В.Г. Балантидиаз. Многотомное руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней / Под ред. П.Г Сергиева. 1968 . – Т.9. Разд.1, Гл.9. – С. 194-199.
6. Чайка Н.А. Бластоцистоз и СГШД // Медицинская паразитология и паразитарные болезни – 1992. – №.4. С. 48-51.
7. Garavelli P.L. The therapy of Blastocystosis. // J. Chemother. – 1991. -V. 3, Suppl. 1. – P. 245-246.
8. Zierdt C.Y. Blastocystis hominis a longmisunderstood intestinal pathogen // Parasitol. Today – 1988. – V. 4. – P. 15-19.

ДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ У ОБЕЗЬЯН ПРИ ПНЕВМОНИЯХ

Калашникова В. А., Султанова О. А., Демерчян А. В.
ФГБНУ «научно-исследовательский институт медицинской приматологии», Сочи-Адлер, Россия.
vikky.aw@gmail.com

Резюме

В данной работе представлен динамический анализ особенностей этиологической структуры микроорганизмов, выделенных при пневмониях у обезьян Адлерского питомника. Анализ позволил установить этиологический спектр возбудителей пневмоний у обезьян, который представлен преимущественно *Staphylococcus spp.* (38,5%) и семейством *Enterobacteriaceae* (60,4%). Ведущую роль в развитии пневмоний у обезьян играют *S. aureus* (28,9%) и *E. coli* (38,0%).

Ключевые слова: обезьяны, пневмония, стафилококки, грамотрицательные бактерии, микробные ассоциации.

DYNAMIC ANALYSIS OF THE CARACTERISTICS OF THE ETHIOLOGICAL STRUCTURE OF MICROFLORA, ISOLATED AT PNEUMONIA IN MONKEYS

Kalashnikova V. A., Sultanova O. A., Demerchyan A. V.
FSBSI «Scientific Research Institute of Medical Primatology», Sochi-Adler, Russia.
vikky.aw@gmail.com

Abstract

A dynamic analysis of the characteristics of the ethiological structure of microorganisms isolated in pneumonia in monkeys of the Adler monkey colony is presented. The analysis allowed to establish the ethiological spectrum of pathogens of pneumonia in monkeys, which is represented

mainly by Staphylococcus spp. (38.5%) and the Enterobacteriaceae (60.4%). The leading role in the development of pneumonia in monkeys is played by S.aureus (28.9%) and E.coli (38.0%).

Key words: monkeys, pneumonia, Staphylococcus, gram-negative bacteria, microb association.

Введение. В ветеринарной медицине проблема пневмоний в настоящее время актуальна, поскольку достаточно высок уровень заболеваемости разных животных (кошки, собаки, лошади) [2, 9]. В зарубежной литературе отсутствуют данные по роли *S. aureus* и других бактериальных возбудителей в развитии пневмоний у обезьян. Актуальность исследования возбудителей данной патологии у обезьян, содержащихся в условиях неволи, обусловлена высокой степенью заболеваемости, приводящей к гибели животных. Она регистрируется в качестве самостоятельного процесса, а также часто развивается как сопутствующее вторичное заболевание [3, 4].

Цель работы – изучение динамики выявления патогенной и условно-патогенной микрофлоры в лёгких и установление этиологической структуры возбудителей пневмоний у обезьян.

Материалы и методы. За анализируемый период (2014 – 2016 г.г.) исследовано 292 образца биоматериала (лёгких) обезьян, погибших от пневмонии. Материалом для изучения послужили культуры микроорганизмов, полученные в результате бактериологического исследования лёгких обезьян. Для этого брали кусочки секционного материала (легкие) размером 2х2 см. Выделение и идентификацию микробных культур проводили общепринятыми лабораторными методами. Посевы осуществляли на дифференциально-диагностические среды (Эндо, Плоскирева). Для выявления гемолитических свойств культур применяли 5% кровяной агар, для определения лецитиназной активности – желточно-солевой агар (ЖСА). Посевы инкубировали в термостате при 37^0С в течение 24 ч. Видовую идентификацию чистых культур бактерий осуществляли с использованием стандартных сред для определения биохимических признаков (агар Клиглера, среда Симмонса, фенилаланин-агар и др.) и биохимических коммерческих тест-систем («ММТ С» и «ММТ Е24»). Идентификацию стафилококков также осу-

ществляли на основании характеристики колоний, их пигментации, окраски по Граму и морфологии. Для определения видовой принадлежности использовали тест на плазмокоагулирующую активность. Наборы «Мультимикротесты для биохимической идентификации энтеробактерий (ММТ Е24)» и «Мультимикротесты для биохимической идентификации стафилококков (ММТ С)», основаны на определении у микроорганизмов ферментных систем, действующих на соответствующие субстраты (производство ООО НПО «Иммунотэкс», Россия). Набор «ММТ Е24» позволяет определить такие биохимические свойства, как наличие уреазы, образование индола, наличие лизиндекарбоксилазы, утилизацию маннита, цитрата натрия, сахарозы, инозита, наличие фенилаланиндезаминазы, образование сероводорода, наличие аргининдигидролазы, орнитиндекарбоксилазы, утилизацию лактозы, малоната натрия, сорбита, дульцита, мальтозы, наличие β-галактозидазы, утилизацию арабинозы, рамнозы, адонита, салицина, глюкозы, наличие нитратредуктазы. Набор «ММТ С» позволяет определить следующие бихимические свойства стафилококков: наличие аргининдигидролазы, уреазы, β-галактозидазы, утилизацию маннита, сахарозы, лактозы, мальтозы, раффинозы, трегалозы, фруктозы, наличие фосфотазы и нитратредуктазы. Исследование проводилось согласно прилагаемым инструкциям.

Частоту встречаемости различных видов микроорганизмов рассматривали по показателю постоянства, вычисленному по формуле: $C = (p \cdot 100) / P$, где С – показатель постоянства, р – число выборок, содержащих данный род/вид, Р – общее число взятых выборок.

Результаты и их обсуждение. За 3 года (2014 – 2016 г.г.) от пневмонии погибли 292 обезьяны, что составило 40,1% от числа всех погибших за указанный период. В 88,7% случаев обнаружены представители патогенной и условно-патогенной микрофлоры. Анализ структуры условно-патогенной микрофлоры показал, что более половины выделенных микроорганизмов (60,5%) принадлежало к грамотрицательным бактериям, в том числе, представителям семейства *Enterobacteriaceae* (60,4%) и неферментирующим бактериям семейства *Pseudomonaciae* (*Ps. aeruginosa*) – 1,4%. Второе место по частоте встречаемости (38,1%) занимает грамположительная кокковая флора, в частности, стафи-

лококки (*Staphylococcus spp*.) При этом *S. aureus* идентифицирован в 30,4%, а *S. intermedius* – в 7,7% случаев. В 11,3% случаев (33 образца) рост микроорганизмов на селективных питательных средах отсутствовал.

Выделенные из патологического материала энтеробактерии представлены преимущественно 2 родами – *Escherichia*, *Proteus*. Первое место по частоте колонизации лёгких среди энтеробактерий занимает *E. coli* (38,8%), второе – *Proteus spp*. (16,8%). В единичных случаях обнаружены *Klebsiella spp*. (2,1%) и *Enterobacter spp*. (1,2%), *Morganella morganii* и *Providencia stuartii* (0,7%), а также *Hafnia alvei* (0,2%).

Анализ выросшей микрофлоры показал, что бактерии встречались как в монокультуре, так и в ассоциациях (табл. 1).

Таблица 1

Варианты ассоциаций микроорганизмов при пневмониях у обезьян

Сочетание бактерий	Количество	%
Двухкомпонентные ассоциации: Staphylococcus spp.+E.coli	61	46,2
S. aureus+Proteus spp.	11	8,3
S. aureus+Klebsiella spp.	1	0,8
S. aureus+Enterobacter spp.	2	1,5
S. aureus+M. morganii	1	0,8
S. aureus+P. stuartii	1	0,8
S. aureus+ Ps. aeruginosa	1	0,8
E. coli+Proteus spp.	14	10,6
E. coli+K. pneumonia	2	1,5
E. coli+E. aerogenes	1	0,8
E. coli+P. stuartii	2	1,5
E. coli+ Ps. aeruginosa	1	0,8
P. vulgaris+Ps. aeruginosa	1	0,8

P. vulgaris+ K. ozaenae	1	0,8
Трёхкомпонентные ассоциации: S. aureus+E. coli+Proteus spp.	25	18,9
S. aureus+E. coli+Enterobacter spp.	2	1,5
S. aureus+E. coli+M. morganii	1	0,8
S. aureus+E. coli+Hafnia alvei	1	0,8
S. aureus+E. coli+Klebsiella spp.	2	1,5
E. coli+P. vulgaris+Ps. aeruginosa	1	0,8

Проведённый анализ показал, что в монокультуре обнаружено 126 культур микроорганизмов (29,4%), в ассоциациях – 302 (70,6%). В монокультуре было выделено 6 родов микроорганизмов. Доминирующими видами оказались *S. aureus* – 56 культур (44,5%) и *E. coli* – 53 культур (42,1%). Редко были обнаружены *P. vulgaris* (8,7%), *K. pneumonia* (2,4%), *Ps. aeruginosa* (1,6%) и *M. morganii* (0,8%).

Staphylococcus spp. был выделен в 107 случаях (35,4%) в ассоциациях с грамотрицательной микрофлорой. Наиболее частые – это сочетания стафилококков с *E. coli* (46,2%). В 12 вариантах ассоциаций микрофлора представлена сочетанием *S. aureus* с условно-патогенными бактериями (УПБ), из которых 8,3% – сочетание с микроорганизмами рода *Proteus*, а также с *E. coli* и *Proteus spp*. (18,9%). Сочетание с другими УПБ встречались редко и, скорее всего, они случайны (табл. 1).

Ассоциации грамотрицательных бактерий составили 8 вариантов. Обнаружены сочетания представителей сем. *Enterobacteriaceae* как друг с другом, так и с бактериями сем. *Pseudomonaceae*. С наибольшей частотой обнаруживались ассоциации в виде сочетаний *E. coli* с *Proteus spp*. (10,6%) (табл. 1). *Ps. aeruginosa* колонизировали лёгкие обезьян в виде ассоциаций с *E. coli*, *P. vulgaris* и *S. aureus*.

С целью изучения этиологической структуры микрофлоры, обнаруженной при пневмониях, в динамике по годам, рассмотрим рисунок 1.

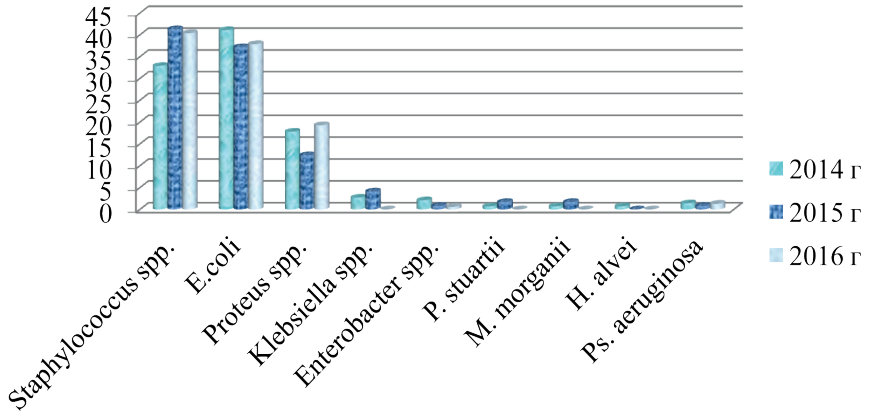


Рис. 1. Динамика выделения УПБ и стафилококков из легких по годам, %.

В целом, значительной смены условно-патогенной микрофлоры за 3 года не произошло, лишь наблюдается некоторый сдвиг в сторону увеличения выявления *Staphylococcus spp.* и *Proteus spp.* из лёгких обезьян. Также обращают на себя внимание пневмонии нерасшифрованной этиологии.

По данным последних лет, отмечено возрастание роли грамотрицательных бактерий в этиологии пневмоний у людей и установление ведущей роли *Klebsiella spp*., *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Ps. aeruginosa* в развитии заболеваний [1, 7]. На основе анализа результатов бактериологического исследования биоматериала обезьян, погибших от пневмоний, такие виды бактерий как *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumonia*, *Ps. aeruginosa*, выделенные из несвойственных им биотопов, оценены нами как возбудители заболевания. По утверждению некоторых авторов [5], это связано с низким иммунитетом и нарушением колонизационной резистентности бактерий, следовательно, влияет на характер течения инфекционного процесса. Анализируя частоту встречаемости отдельных микроорганизмов при пневмониях у обезьян, мы

отнесли к постоянной микрофлоре *Staphylococcus spp*. и *E. coli*, к добавочной – *Proteus spp*., к случайной – остальные бактерии. Из литературных данных следует, что бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Staphylococcus*, выделенные в ассоциациях, чаще обладают различными факторами патогенности, чем изолированные в виде монокультур [8].

Выводы.

1. Охарактеризована этиологическая структура бактериальных возбудителей пневмоний у обезьян: пневмонии у обезьян, в большинстве случаев имеют полимикробную этиологию.

2. Этиологическая структура бактериальных возбудителей пневмоний у обезьян представлена преимущественно *Staphylococcus spp.* (38,5%) и семейством *Enterobacteriaceae* (60,4%).

3. Ведущую роль в развитии пневмоний у обезьян играют *S. aureus* (28,9%) и *E. coli* (38,0%).

4. Отмечено значительное число ассоциаций бактериальных культур, из которых наиболее частые – *Staphylococcus spp.+E.coli*, *S. aureus.+E. coli+ Proteus spp*. и *E. coli+Proteus spp*.

5. Удельный вес пневмоний нерасшифрованной этиологии составил 11,3%.

Литература

1. Бова А. А., Крыжановский В. Л.. Этиология пневмоний // Медицинские новости. – 2000. – № 7. – С. 31-36.
2. Костылёва О. А. Стафилококкозы собак и кошек (клиника, лечение) // Вестник Алтайского Гос. Университета. – 2005. – № 2 (18). – С. 49-52.
3. Крылова Р. И. Сравнительная характеристика нозологического профиля людей и обезьян разных видов // «Лабораторные приматы для решения актуальных проблем медицины и биологии»: Материалы симпозиума. – М.: Издательство РАМН, 2004. – С. 18-21.
4. Лапин Б. А., Джикидзе Э. К., Крылова Р. И., Стасилевич З. К., Яковлева Л. А. Проблемы инфекционной патологии обезьян // М.: Издательство РАМН, 2004. – 140 с.

5. Холодок Г.Н. Этиология острых пневмоний и характеристика возбудителей // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2004. – Вып. 18. – С. 11-15.
6. Estell K. E., Young A., Kozikowski T., Swain E. A., Byrne B. A., Reilly C. M., Kass P. H., Aleman M. Pneumonia Caused by Klebsiella spp. in 46 Horses // J. Vet. Intern. Med. – 2016. – № 30. – P. 314-321.
7. Ihms E. A., Daniels J. B., Koivisto C. S., Barrie M. T., Russell D. S. Fatal Streptococcus anginosus-associated pneumonia in a captive Sumatran orangutan (Pongo abelii) // J. Med. primatol. – 2014. – Vol. 43, Issue 1. – P. 48-51.
8. Tadros M., Williams V., Coleman B. L., McGeer A. J., Haider S., Lee C., Iacovides H., Rubinstein E., John M., Johnston L., McNeil S., Katz K., Laffin N., Suh K. N., Powis J., Smith S.,Taylor G., Watt C., Simor A. E. Epidemiology and Outcome of Pneumonia Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Canadian Hospitals // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, Issue 9. – e75171 URL:https://www.plosone.org
9. Yayan J., Ghebremedhin B., Rasche K. No development of imipenem resistance in pneumonia caused by Escherichia coli // J. Medicine. – 2015 – Vol. 94, № 25. – e1020 URL:https://www.md-journal.com

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ И ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МИКРОБНОЙ ФЛОРЫ У ОБЕЗЬЯН, ЖИВУЩИХ В УСЛОВИЯХ НЕВОЛИ

Калашникова В. А., Султанова О. А.
ФГБНУ «научно-исследовательский институт медицинской приматологии», Сочи-Адлер, Россия.
vikky.aw@gmail.com

Резюме

За период с 2014 по 2016 годы структура острых кишечных инфекций остаётся практически неизменной и лидирующую позицию занимают энтероколиты (66%). Процент заболеваемости и гибели обезьян от кишечных заболеваний высокий (52,6%). Обнаружены 61,8% представителей патогенной и условно-патогенной микрофлоры, идентифицировано 26 видов энтеробактерий и неферментирующих грамотри-

цательных микроорганизмов. Доминирующее место при кишечных заболеваниях принадлежит *Proteus spp.* (51,7%), патогенные энтеробактерии обнаружены в 3%. В 38,2% случаев патогенная и условно-патогенная микрофлора не обнаружена.

Ключевые слова: обезьяны, острые кишечные инфекции, микрофлора, Enterobacteriaceae, этиологическая структура.

THE PREVALENCE OF MORBIDITY OF ACUTE INTESTINAL INFECTIONS AND ETHIOLOGICAL STRUCTURE OF MICROB FLORA IN CAPTIVITY MONKEYS

Kalashnikova V. A., Sultanova O. A.
FSBSI «Scientific Research Institute of Medical Primatology», Sochi-Adler, Russia

Abstract

During the period from 2014 to 2016 the structure of acute intestinal infections remains almost unchanged and the leading position is occupied by enterocolitis (66%). The percentage of morbidity and mortality of monkeys from intestinal diseases is high (52.6%). 61,8% of representatives of pathogenic and conditionally pathogenic microflora were found out, and 26 species of enterobacteria and non-fermenting gram-negative microorganisms were identified. The dominant position in intestinal diseases belongs to *Proteus spp.* (51.7%), pathogenic enterobacteria were detected in 3%. In 38.2% of cases, pathogenic and opportunistic microflora was not detected.

Key words: monkeys, acute intestinal infections, microflora, Enterobacteriaceae, ethiologycal structure.

Введение. Как известно, в условиях неволи обезьяны болеют многими инфекционными болезнями, свойственными другим животным и человеку [3,4,6,]. Особое место среди них занимают желудочно-кишечные патологии, которые являются наиболее частой причиной заболеваемости и гибели животных [3,4,5]. Прежде всего, это гастроэнтероколи-

ты и энтероколиты. Так, по данным клинико-ветеринарной и патоморфологической служб института, в структуре заболеваемости обезьян до 50% занимают острые кишечные инфекции (ОКИ) [1,3]. В настоящее время доказана этиологическая роль при острых кишечных инфекциях обезьян патогенных возбудителей из семейства *Enterobacteriaceae* – *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* [1,7]. До 1980-х годов основной причиной кишечных заболеваний у обезьян в 60-80% случаев являлись *Shigella*, (преимущественно *S. flexneri*), *Salmonella* (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. stanley*). С середины 1980-х годов, началась тенденция к снижению этиологической роли патогенных энтеробактерий в развитии ОКИ у обезьян [1,2]. На первое место «вышли» условно-патогенные бактерии (УПБ) из сем. *Enterobacteriaceae* [1,4,7].

Цель исследования – оценка видового спектра микробной флоры у обезьян, погибших от ОКИ.

Материалы и методы. Обследовано 727 обезьян (292 самца и 435 самок) 10 видов в возрасте от 0 дней (мертворождение) до 35 лет, погибших в период с января 2014 года по декабрь 2016 года (табл. 1).

Из общего числа погибших 382 обезьяны были с желудочно-кишечной патологией (энтероколит, колит, гастроэнтероколит, гастроэнтерит, энтерит).

Для исследования брали патологический материал (содержимое тонкого, слепого и прямого отдела кишечника). Забор материала, бактериологическое исследование (посев на питательные среды, выделение, идентификация микроорганизмов) проводили согласно общепринятым методикам. Посев материала осуществлялся на дифференциально-диагностические питательные среды (Эндо, Плоскирева), 5%-й кровяной агар, висмульт-сульфит агар (BCA), иерсиния-агар. Инкубацию посевов проводили при 37^0С в течение 24 ч (иерсиниозную среду инкубировали 48 ч при 30^0С). Выросшие микроорганизмы индентифицировали по коммерческим биохимическим тестам «Мультимикротесты для биохимической идентификации энтеробактерий (ММТ Е24)» (производство ООО НПО «Иммунотэкс», Россия), которые основаны на определении у микроорганизмов ферментных систем, действующих на соответствующие субстраты. Набор «ММТ Е24» позволяет определить такие биохимические свойства, как наличие уреазы, образование

индола, наличие лизиндекарбоксилазы, утилизацию маннита, цитрата натрия, сахарозы, инозита, наличие фенилаланиндезаминазы, образование сероводорода, наличие аргининдигидролазы, орнитиндекарбоксилазы, утилизацию лактозы, малоната натрия, сорбита, дульцита, мальтозы, наличие β-галактозидазы, утилизацию арабинозы, рамнозы, адонита, салицина, глюкозы, наличие нитратредуктазы. Неферментирующие грамотрицательные бактерии идентифицировали стандартными биохимическими тестами.

Частоту встречаемости различных видов микроорганизмов рассматривали по показателю постоянства, вычисленному по формуле: C = (p·100) / P, где C – показатель постоянства, p – число выборок, содержащих данный род/вид, P – общее число взятых выборок.

Результаты и их обсуждения. Гибель обезьян от желудочно-кишечных заболеваний в период с 2014 по 2016 годы составила 52,6%. Основной процент заболеваемости приходится на энтероколиты (66%). Доля гастроэнтероколитов составила 19% и колитов – 10%. В единичных случаях отмечены другие нозологические формы (энтерит – 4%, гастроэнтерит – 1%).

Как видно из рисунка 1, структура ОКИ на протяжении трёх последних лет остается практически неизменной. В целом отмечена лидирующая позиция энтероколитов.

Результаты бактериологических исследований показали, что в 61,8% случаев при ОКИ обнаружены патогенные и условно-патогенные представители семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonaceae*. У 146 погибших от ОКИ обезьян патогенная и условно-патогенная микрофлора не обнаружена (38,2%).

За указанный период исследования из кишечника 236 обезьян выделено 300 патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Выделенная микрофлора характеризовалась достаточным видовым разнообразием: 97,3% бактерий принадлежали к энтеробактериям и 2,7% – к неферментирующим грамотрицательным бактериям (*Pseudomonas aeruginosa*). Ведущими микроорганизмами, которые выделялись от погибших обезьян с поражением желудочно-кишечного тракта, были протей, энтеробактер, цитробактер, клебсиелла. Более половины выделенных энтеробактерий относилось к роду *Proteus*

(51,7%). Второе место по частоте встречаемости занимают представители родов *Enterobacter* и *Citrobacter* (12,6 и 9% соответственно). На долю других энтеробактерий приходилось от 6,6% (*Klebsiella spp*.) до 0,7% (*Edwardsiella tarda*). Выделенные патогенные энтеробактерии составили 3%, при этом *Y. pseudotuberculosis* обнаружены в 3 случаях, *Salmonella Arizona group III* – в 2 случаях, *Shigella flexneri 4a* – в 2 случаях, *Shigella flexneri 4b* и *Shigella flexneri 5x* – по одному случаю.

За период с 2014 по 2016 годы было идентифицировано 25 видов условно-патогенных энтеробактерий. Род *Proteus* был представлен 5 видами: *P. vulgaris* (37%), *P. mirabilis* (8%), *P. penneri* и *P. myxofaciens* (2,3%), *P. rettgeri* (2%). Среди других видов энтеробактерий выделялись: *E. agglomerans* (8%), *C. freundii* и *P. stuarii* (5%), *M. morganii* (4,7%). Более скромное место занимают *K. ozaenae* (2,7%), *E. cloacae* (2,3%), *K. oxytoca* и *C. amalonaticus* (2%), *E. aerogenes* и *K. pneumoniae* (1,7%), *C. diversus* (1%), *E. gergoviae* и *C. farmeri* (0,7%), *K. terrigena* и *P. alcalifaciens* (0,3%). В единичных случаях выявлены представители рода *Serratia – S. odorivera*, *S. marcenses*, *S. rubidaca*.

Анализируя частоту встречаемости патогенной и условно-патогенной микрофлоры в динамике за три года (2014 – 2016 г.г.), нами установлено, что лидирующее место принадлежит роду *Proteus spp.*, на втором месте – *Enterobacter spp*., несколько реже выделялись *Klebsiella spp.* и *Citrobacrter spp.* (рис. 2).

Анализируя частоту встречаемости отдельных микроорганизмов, выделенных при ОКИ у обезьян, мы отнесли к постоянной микрофлоре представителей рода *Proteus*, к случайной – остальные виды.

Выводы.

1. Структура острых кишечных инфекций на протяжении последних лет (2014–2016 г.г.) остается практически неизменной: лидирующее место принадлежит энтероколитам (66%).

2. Несмотря на многочисленность видов, изолированных от погибших обезьян, среди энтеробактерий доминирующим видом является *Proteus spp*. (51,7%). Реже выделялись *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* и *Citrobacter spp*.

3. Неферментирующие грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* идентифицированы в 2,7% случаев.

4. В 38,2%) патогенной и условно-патогенной микрофлоры при ОКИ у обезьян не обнаружено.

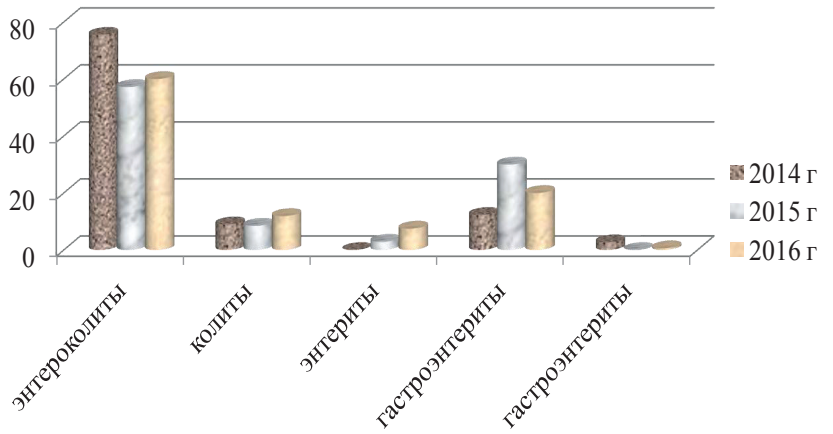


Рис. 1. Доля нозологических форм ОКИ у обезьян по годам, (%).

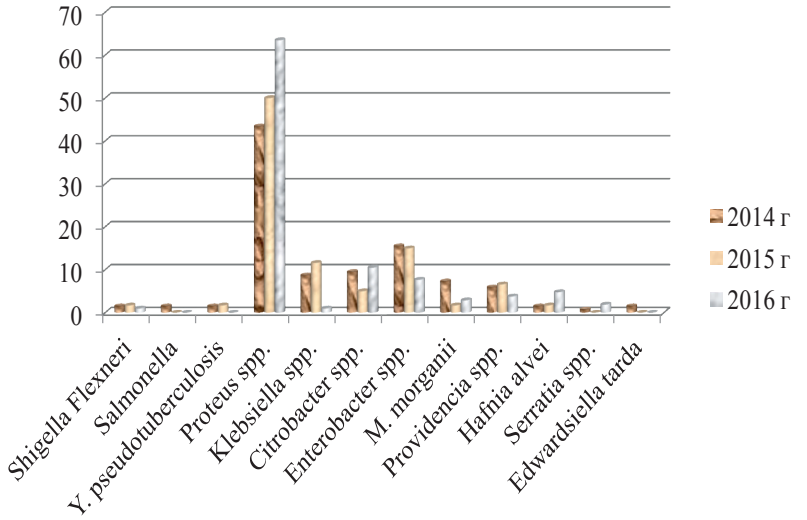


Рис. 2. Процентное соотношение выделенной микрофлоры при ОКИ у обезьян го годам.

Таблица 1.

Характеристика погибших от ОКИ обезьян

Вид	Кол-во	Возраст, годы				
		0-2	2-5	5-10	10-15	Старше 15
Макак резус (Macaca mulatta)	309	71	58	66	65	49
Макак яванский (Macaca fascicularis)	157	43	36	32	24	22
Макак лапундер	7		2		2	3
Макак ассамский	2					2
Макак бурый	1					1
Мартышка зелёная (Cercopithecus aethiops)	43	23	8	5	2	5
Мартышка мона	1					1
Мартышка аллена	1		1			
Павиан анубис (Papio anubis)	43	15	5	8	8	7
Павиан гамадрил (Papio hamadryas)	163	49	20	48	27	19
Всего	727	201	130	159	128	109

Литература

1. Ардашелия С.Н., Калашникова В.А., Джикидзе Э.К. Этиологическая структура бактериальных кишечных инфекций обезьян адлерского питомника // Бюллетень экспериментал. биологии и медицины. – 2011. – Т. 151, № 6. – С. 681-684.
2. Джикидзе Э.К. История создания и направление работ лаборатории инфекционной патологии ГУ НИИ МП РАМН // «Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии в опытах на обезьянах»: Материалы международной. научной конференции ГУ НИИ МП РАМН – Сочи-Адлер, 2007 – С. 39-48.
3. Калашникова В.А. Детекция Campylobacterjejuni и Helicobacter pylori, ассоциированных с заболеваниями ЖКТ у обезьян // Вет. патология. – 2009. – № 4 (31). – С. 8-12.
4. Кебу Т.И., Стасилевич З.К., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. Условно-патогенные бактерии у здоровых и больных острыми кишечными инфекциями обезьян // Baltic J. Lab. Anim. Sci. – 1998. – V. 8. – P. 177-182.

5. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И., Стасилевич З.К., Яковлева Л.А. Проблемы инфекционной патологии обезьян // М.: Изд-во РАМН. 2004, – 140 с.
6. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Яковлева Л.Я., Егорова Т.И., Корзая Л.И. Болезни обезьян, опасные для человека. Правила содержания и работы с обезьянами в карантине при поступлении животных из внешних источников, а также при экспериментальном инфицировании: Методические рекомендации. МР 1.3.0012/1-13 / М.: Федерал. центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2014, – 52 с.
7. Стасилевич З.К., Джикидзе Э.К., Кебу Т.И., Калашникова В.А., Султанова О.А. Изучение биологических особенностей представителей патогенных и условно-патогенных энтеробактерий в отряде приматов // «Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии в опытах на обезьянах»: Материалы международной. научной конференции ГУ НИИ МП РАМН – Сочи-Адлер, 2007 – С. 154-157.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ У ОБЕЗЬЯН ПРИ ПАТОЛОГИИ КИШЕЧНИКА

Высоцкая В. И., Аршба И. М., Демерчян А. В.
ФГБНУ «НИИ Медицинской приматологии», Сочи, Россия
Veronica-9509@mail.ru

Резюме

В данной работе исследовано 75 обезьян разных видов, среди которых клинически здоровые особи, больные и погибшие обезьяны с патологией ЖКТ (с основными диагнозами: энтероколит, гастроэнтероколит, катаральный энтерит, эрозивно-язвенный колит). Выделенные штаммы условно-патогенных энтеробактерий у больных и погибших обезьян по морфологическим, культуральным, и биохимическим тестам соответствуют своему таксономическому положению и видовой принадлежности. Показана как природная устойчивость условно-патогенных энтеробактерий к β-лактамным антибиотикам, так и их чувствительность к антибактериальным препаратам широкого спектра

действия, что позволяет рекомендовать использование антибиотиков широкого спектра действия в качестве рациональной антибиотикотерапии энтеробактериальных кишечных инфекций у обезьян.

Ключевые слова: обезьяны, условно-патогенные энтеробактерии, чувствительность к антибиотикам, колипротейный бактериофаг.

BIOLOGICAL FEATURES AND ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF OPPORTUNISTIC ENTEROBACTERIA IN INTESTINAL PATHOLOGY OF MONKEYS

Vysotskaya V. I., Arshba I. M., Demerchyan A.V.
Federal State Budget Scientific Institution "The Research Institute of Medical Primatology" (FSBSI "NII MP")
Veronica-9509@mail.ru

Abstract

Seventy-five monkeys of different species were examined. Among them were clinically healthy animals, sick and dead monkeys with pathology of the gastrointestinal tract (with basic diagnoses: enterocolitis, gastroenterocolitis, catarrhal enteritis, erosive ulcerative colitis). The strains of opportunistic enterobacteria isolated from diseased and dead monkeys correspond to their taxonomic position and species affiliation based on morphological, cultural, and biochemical tests. The natural resistance of opportunistic enterobacteria to β-lactam antibiotics as well as their sensitivity to antibacterials of a wide spectrum of action are shown, which allows us to recommend the use of broad-spectrum antibiotics as a rational antibiotic therapy for enterobacterial intestinal infections in monkeys.

Key words: monkeys, opportunistic enterobacteria, antibiotic sensitivity, Coli-proteus bacteriophage.

Введение. Многие условно-патогенные энтеробактерии, способны вызывать заболевания не только при снижении естественной резистентности макроорганизма, но и при отсутствии нозологической специфичности. Установлено, что патогенная и условно-патогенная

микрофлора, наиболее часто колонизирующая различные участки желудочно-кишечного тракта обладает значительным набором ферментативных свойств и полирезистентностью к широкому спектру антибиотиков, являясь потенциальным этиологическим фактором развития эндогенных инфекционных заболеваний и микробная флора биоценоза слизистых оболочек организма хозяина претерпевает изменения у лиц, страдающих различными заболеваниями [3, 4, 6].

Как известно, особенное место среди бактериальных инфекций обезьян занимают кишечные инфекции, которые нередко являются причиной массовой гибели животных, содержащихся в условиях неволи, при ограничении подвижности в начальном периоде акклиматизации значительно снижается естественная резистентность организма обезьян, что способствует формированию дисбактериоза, на фоне которого развиваются как неспецифические дисфункции кишечника, так и тяжелые, порой смертельные формы кишечных инфекций. Кишечные инфекции обезьян этиологически связаны с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами из семейства энтеробактерий [1, 2, 5, 7, 8].

Целью настоящего исследования является изучение биологических особенностей выделенных штаммов условно-патогенных энтеробактерий у обезьян при патологии кишечника и их чувствительность к антибиотикам.

Методы исследования. Объектом исследования являлись 75 обезьян разных видов (макаки резусы, макаки яванские, мартышки зеленые, мартышки зеленые), среди которых исследованы клинически здоровые особи, больные и погибшие обезьяны с патологией желудочно-кишечного тракта (с основными диагнозами: энтероколит, гастроэнтероколит, катаральный энтерит, эрозивно-язвенный колит).

В работе использовали общепринятый метод микробиологического исследования с использованием дифференциально-диагностических пластинчатых сред. Изучали морфологические, культуральные, ферментативные особенности выделенных энтеробактерий. Использовали мультимикротесты для биохимической идентификации энтеробактерий (ММТ Е24), производитель «Иммунотэкс». Для определения чувствительности к антибиотикам использовали метод диффузионных дисков (коммерческие наборы дисков, рекомендованные для микро-

организмов семейства энтеробактерий, производитель – ФГУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера») с использованием среды Мюллер-Хинтона. Определяли литическую активность колипротейного бактериофага (производитель НПО «МИКРОГЕН»). Спектр литического действия штаммов бактериофагов определяли в отношении изолятов выделенных от обезьян при помощи спот-теста.

Результаты и их обсуждение. В результате исследования из 37 здоровых обезьян у 29 выделены представители нормальной микрофлоры кишечника, что составило *E. coli – 40%*, *Enterococcus spp.* – 38%. Лишь у 8 особей выделены условно-патогенные энтеробактерии, в частности представители рода *Proteus – 22%: Proteus penneri* – 11%, *Proteus mirabilis* – 5% , *Proteus vulgaris* – 3%, *Proteus spp* –3%.

Условно-патогенные бактерии на селективно-дифференциальных средах, были представлены в виде единичных колоний, что говорит о низкой их концентрации в исследуемом материале. Колонии кишечной палочки *(E.coli)* были правильной округлой формы, с металлическим блеском, лактозоположительны и без гемолитических свойств.

При обследовании 11 больных обезьян (диарейный синдром, жидкий стул и т.п.) у 5 были обнаружены представители условно-патогенных энтеробактерий рода *Proteus*, что составило 45%.

Частота встречаемости рода *Proteus* была выше у макаков яванских в сравнении с макаками резусами.

При биохимической идентификации рода *Proteus*, оба вида ферментировали глюкозу с последующим газообразованием, не образовывали индол, дезаминировали фенилаланин. Отличались утилизацией цитрата Симмонса (*Proteus mirabilis)* и не образовывали сероводород *(Proteus penneri).*

Как известно род *Proteus* относится к гнилостным микроорганизмам, при большой концентрации вызывает патологические процессы в кишечнике, для культур характерен выраженный неприятный гнилостный запах и специфический рост, «роение» протеев часто мешает выделению других энтеробактерий. Протеи сравнительно устойчивы в окружающей среде. Их обнаруживают в сточных водах, почве, на различных гниющих органических субстратах. Обезьяны, содержащиеся в неволе при близком контакте, а также при ослабленной иммунной защите легко инфицируются указанными энтеробактериями [6].

Выделенные от больных обезьян штаммы энтеробактерий рода *Proteus* и рода *Escherichia,* оказались наиболее чувствительны к ципрофлоксацину (100%), ко-тримоксазолу (100%) и цефоперазону (100%). Резистентность выделенные штаммы проявили в отношении ампициллина (45,5%), амоксиклава (27,3%), цефтазидима (9,1%) и цефазолина (9,1%) (рис. 1).

Стоит отметить, что среди выделенных *E. coli* 50% были устойчивы к ампициллину, 16,7% к амоксиклаву. Среди представителей рода *Proteus, Proteus penneri* проявил 100% устойчивость в отношении ампициллина, амоксиклава и цефазолина. Резистентность *Proteus mirabilis* составила 25% к ампициллину, амоксиклаву и цефтазидиму.

Чувствительность к антибактериальным препаратам, в частности к цефалоспоринам широкого спектра действия позволяет назначить антибиотикотерапию для лечения животных. Некоторые изоляты *Proteus mirabilis* и *E. coli* проявили резистентность к ампициллину и амоксиклаву, о чем свидетельствуют и литературные данные, устойчивость протеев к β-лактамным антибиотикам обусловлена как способностью синтезировать β-лактамазы расширенного спектра, в том числе устойчивых к действию ингибиторов β-лактамаз, так и способностью маскировать мишени для их действия [6].

При определении литической активности колипротейного бактериофага, изолятов, выделенных от больных обезьян, было показано, что 50% выделенных штаммов чувствительны к колипротейному бактериофагу (*Proteus mirabilis* – 30%, *E. coli* – 20%). Интересен тот факт, что 2 штамма кишечной палочки обладали литической активностью колипротейного фага, в состав которого входят энтеропатогенные кишечные палочки различных серогрупп. Выделенные штаммы по ферментативным свойствам соответствуют кишечной палочке, но возможно с патогенными свойствами, штаммы *E. coli* будут использованы для дальнейших молекулярно-генетических исследований.

Количество погибших и исследованных постмортально обезьян составило 27 особей (макаки резусы – 10, макаки яванские – 10, павианы гамадрилы – 7). При патологоанатомическом исследовании обезьян основными диагнозами являлись патологии связанные с желудочно-

кишечным трактом – гастроэнтероколиты, катаральные энтериты, энтероколиты и др.

При изучении колоний кишечной палочки на среде Эндо были замечены формы в виде гладких и шероховатых форм колоний, а на кровяном агаре у кишечной палочки проявлялась гемолитическая активность, в виде просветления среды вокруг колоний. Проявление различных фенотипов свидетельствует о способности выделенных культур проявлять свои вирулентные свойства.

При использовании биохимических тестов у выделенных штаммов были установлены разные виды условно-патогенных энтеробактерий (рис.2). Основными показателями для идентификации представителей рода *Proteus*, являлись утилизация цитрата натрия, наличие фенилаланиндезаминазы, образование сероводорода. Вид *Citrobacter diversus* отличался отсутствием лизиндекарбоксилазы, образования сероводорода, утилизацией сахарозы, инозита, рафинозы и салицина. *Enterobacter cloacae* не проявлял образование индола, отсутствовали лизиндекарбоксилаза и фенилаланиндезаминидаза, а также не утилизиовалт инозит и дульцит. У представителей вида *Morganella morganii* присутствовала уреаза, индолообразование, фенилаланиндезаминаза и орнитиндекарбоксилаза. У *Providencia stuarti* отмечено индолообразование, утилизация цитрата натрия, сахарозы и инозита, а также наличие фенилаланиндезаминазы.

В результате исследования из 27 погибших обезьян у 21 особи выделены условно-патогенные энтеробактерии, что составило 77,8%.

Видовой состав выделенных штаммов от погибших обезьян был представлен – *Proteus mirabilis* – 22,2%; *Morganella morganii* и *Citrobacter diversus* – 11,1% , виды *Proteus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri, Providencia stuarti*, *Citrobacter amalonaticus*, *E. coli* (гем.), *Enterobacter cloacae* и *Enterobacter agglomerans* составили 7,4. Нормальная микрофлора составила 22,2 %.

При идентификации УПЭ была охарактеризована частота выделения энтеробактерий у обезьян разных видов. В частности при исследовании макаков резусов были выделены чаще *Proteus mirabilis u Citrobacter diversus*, реже *Morganella morganii* и представители рода *Enterobacter,* а в одном случае выделена гемолитическая кишечная па-

лочка. У макаков яванских были выделены чаще представители рода *Proteus,* реже – рода *Citrobacter* и вида *Morganella morganii.* У павианов гамадрилов были выделены чаще *Proteus mirabilis u Proteus penneri*, реже – *Providencia stuarti*.

Выделенные штаммы от погибших обезьян наиболее чувствительны к цефоперазону (94,7%), амоксиклаву (89,5%), цефтазидиму (89,5%), ко-тримоксазолу (84,2%) и ципрофлоксацину (84,2%). Резистентность проявили в отношении ампициллина (36,8%) и цефазолина (21,1%) .

Enterobacter agglomerans был устойчив в отношении ампициллина (100%) и амоксиклава (100%). *Citrobacter diversus* был устойчив к ампициллину (50%).

E. coli проявила резистентность в отношении ампициллина (80%), амоксиклава (20%), цефтазидима (20%), ко-тримоксазола (20%) и цефазолина (20%). *Morganella morganii* была устойчива к ко-тримоксазолу (50%) и цефазолину (100%).

Среди представителей рода *Proteus* 50% были устойчивы к ципрофлоксацину, а 16,6% к ампициллину, амоксиклаву, ко-тримоксазолу, цефазолину и цефоперазону. При этом *Proteus vulgaris* на 100% устойчив к ципрофлоксацину и ко-тримоксазолу. *Proteus mirabilis* на 50% устойчив к цефтазидиму и ципрофлоксацину, а *Proteus penneri* на 100% к цефазолину.

Из причин, приводящих к нарушению количественных и качественных соотношений микрофлоры кишечника, у обезьян следует выделить эмоциональный стресс, нарушение привычной диеты, антибиотикотерапию, индуцированные иммунодефициты, острые и хронические кишечные инфекции неустановленной этиологии.

Выводы

Таким образом, в результате исследования установлено, что УПЭ разных видов с высокой частотой обнаруживаются в содержимом кишечника как у больных обезьян при дисфункциях кишечника, так и у погибших особей с патологией желудочно-кишечного тракта. Представители нормальной микрофлоры кишечника у здоровых обезьян встречаются в 78% случаев. Выделяемые колонии кишечной палочки соответствуют своим фенотипическим признакам и ферментативным свойствам.

Выделенные штаммы условно-патогенных энтеробактерий у больных и погибших обезьян по морфологическим, культуральным, и биохимическим тестам соответствуют своему таксономическому положению и видовой принадлежности. В 45% условно-патогенные энтеробактерии у больных обезьян представлены родом Proteus, у погибших обезьян с патологией кишечника интенсивность выделения условно-патогенных энтеробактерий разных видов резко возрастает.

Показана как природная устойчивость условно-патогенных энтеробактерий к β-лактамным антибиотикам, так и их чувствительность к антибактериальным препаратам широкого спектра действия, что позволяет рекомендовать использование антибиотиков широкого спектра действия в качестве рациональной антибиотикотерапии энтеробактериальных кишечных инфекций у обезьян. Установлена литическая активность колипротейного фага, что дает право использовать фаг для лечения и коррекции патологии кишечника, вызванной соответствующими энтеробактериями.

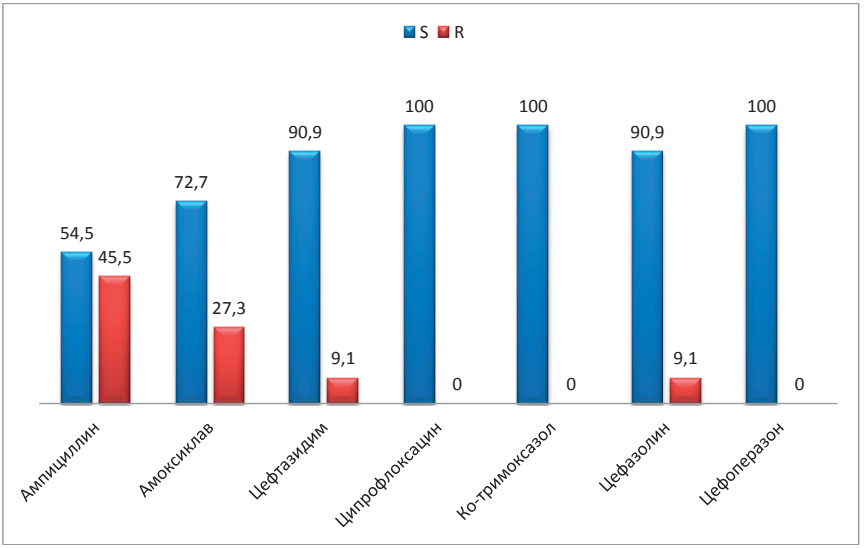


Рис. 1. Чувствительность и резистентность к антибиотикам УПЭ у больных обезьян.

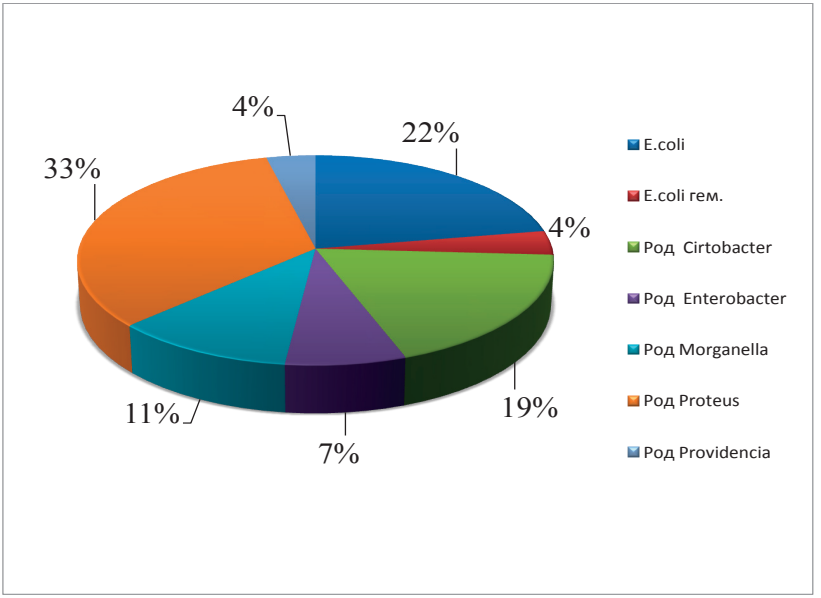


Рис.2. Условно-патогенные энтеробактерии выделенные от погибших обезьян.

Литература

1. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии – М.:1987-188с.
2. Дарсания М.Ш. Микрофлора кишечника обезьян и доклиническое изучение лечебных биопрепаратов: Автореф. дис. канд. биол. наук. – М., 2000. – 24 с.
3. Егорова С.А., Макарова М.А., Кафтырева Л.А. Этиологическая значимость условно-патогенных энтеробактерий при острых кишечных заболеваниях и дисбиотических состояниях кишечника // Ж. Инфекция и иммунитет– 2011. – Т.1, №2. – С. 181-184.
4. Мавзютов А.Р. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи //Ж. микробиологии – 2007. – №1. – с.89-97.

5. Кебу Т.И., Стасилевич З.К., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. Условно-патогенные энтеробактерии у здоровых и больных острыми кишечными инфекциями обезьян. //Baltic.J.Lab.Anim.Sci. – 1998.- №8.- с.177-182.
6. Поздеев О.К., Фёдоров Р.В. – Энтеробактерии: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР- Медиа. 2007.- 720 с.
7. McClure H.M. Bacterial diseases of nonhuman primates. // The comper. pathol. of zoo animals. – Washington – 1980 – p. 197-218.
8. Munson L., Montali R.J. Pathology and disease of great apes at the National Zoological Park. // Zoo biology – 1990 – vol. 9 – № 2 – p. 99-105.

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ НА ОБЕЗЬЯНАХ

Давыдкин В. Ю.[1], Лапин Б. А.[2], Мелихова А. В.[1], Джикидзе Э. К.[2], Давыдкин И. Ю.[1], Кебу Т. И.[2], Климова Э. В.[3], Холодилова Л. И.[2], Жиленкова О. Г.[1]

[1]ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Россия, Москва

[2]ОГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия

[3]МИРЕА (институт МИТХТ), Москва, Россия

davydv57@gmail.com

Резюме

В работе оценивали терапевтическую эффективность препаратов бифидобактерий при лечении острой кишечной инфекции (ОКИ) обезьян. Препараты – твердые желатиновые капсулы, содержащие лиофильно высушенную и измельченную биомассу Bifidobacterium adolescentis МС-42, были приготовлены в лаборатории медицинской биотехнологии МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Было сформировано 3 группы (всего 21 животное) обезьян макак резус. В результате все обезьяны были вылечены без применения антибиотиков.

Ключевые слова: бифидобактерии, препараты, обезьяны, терапевтическая эффективность.

EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFICACY OF THE BIFIDOBACTERIUM DRUGS ON MONKEYS

Davydkin V. U.[1], Lapin B. A.[2], Melikhova A. V.[1], Dzhikidze E. K.[2], Davydkin I. U.[1], Kebu T. I.[2], Klimova E. V.[3], Holodilova L. I.[2], Gilenkova O. G.1

[1]FBRI Gabrichevskiy' MRIEM, Moscow, Russia
[2]FSBSI Institute of Medical Primatology (RIMP), Sochi, Russia
[3]The Institute of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia
davydv57@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to evaluate therapeutic efficacy of the Bifidobacterium drugs in acute intestinal infections (AII) of monkeys. The drugs, based on hard gelatin capsules, contains freeze dried and crushed biomass of Bifidobacterium adolescentis MC-42, were prepared in the laboratory of medical biotechnology of FBRI Gabrichevskiy' MRIEM. Three groups (total 21 animals) of Macaca mulatta were formed to study the therapeutic efficacy of drugs in all the monkeys with diarrhea syndrome. As a result, all the monkeys were cured without the use of antibiotics.

Key words: bifidobacteria, drugs, monkeys, therapeutic efficacy

Введение. Биопрепараты нормофлоры, в том числе бифидобактерий, широко используются для лечения заболеваний, ассоциированных с различными нарушениями микробиоценоза желудочно-кишечного тракта. Причем, широко распространено мнение, что при поступлении в желудок таких препаратов происходит существенная инактивация микробных клеток, что приводит к снижению их терапевтической эффективности [5]. В результате разработчики биопрепаратов вынуждены изыскивать способы защиты активного начала от негативного воздействия агрессивных составляющих желудочного сока. Одним из таких способов является нанесение на лекарственную форму кислото- и ферментоустойчивого пленочного покрытия (как, например, у таких препаратов иностранного производства, как Линекс, Бифиформ и др.). Разработка в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского прописи и технологии приготовления кислотоустойчивого пленочного покрытия на основе клуцела [1] открыла возможность экспериментальной проверки вы-

шеуказанного мнения применительно к штамму бифидобактерий *B. adolescentis* МС-42.

Целью работы являлась оценка терапевтической эффективности препаратов бифидобактерий при острых кишечных инфекциях (ОКИ) у обезьян.

Методы исследования. Препараты на основе штамма бифидобактерий *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 готовили в лабораторных условиях, для чего в культуру третьей генерации, выращенную на казеиново-дрожжевой среде [4], вводили сахарозо-желатиновую защитную среду и высушивали сублимационной сушкой. Сухую биомассу бифидобактерий для улучшения ее реологических характеристик измельчали до состояния порошка в электромагнитном диспергаторе. Затем заполняли полученным порошком твердые желатиновые капсулы № 1 на лабораторной машине МС-1 (Италия). На часть капсул методом погружения наносили двухслойное пленочное кислотоустойчивое покрытие на основе ацетатфталата целлюлозы, производного метил-этил целлюлозы – клуцела (Clucel®), пчелиного воска и Tween 80.

Для изучения терапевтической эффективности препаратов из болеющих ОКИ с диарейным синдромом [6] обезьян вида макак резус было сформировано 3 группы общей численностью 21 обезьяна в возрасте от 2,5 до 18,3 лет и весом 3,6-7,2 кг. Диарейный синдром – частый жидкий стул со зловонным запахом без патологической примеси от 6 до 8 раз в сутки, умеренная сниженная активность, вздутие живота, урчание при пальпации, умеренный эксикоз. Состояние обезьян оценивалось как среднетяжелое.

Особенностью этой кишечной инфекции является то, что до настоящего времени возбудитель однозначно не выявлен. Возможна этиологическая связь с вирусами и простейшими. Однако, количественное возрастание в кишечном содержимом, а также нередкое обнаружение в мезентериальных лимфоузлах, печени и селезенке представителей условно-патогенной флоры – родов *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*), *Citrobacter* (*C. freundii*), *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*), *Morganella* (*M. morganii*) и *Enterobacter* (*E. aerogenes*), позволяет считать вклад этих микроорганизмов в возникновение ОКИ существенным.

Для лечения использовали следующие препараты:

Группа 1 получала препарат в твердых желатиновых капсулах № 1 без кислотоустойчивого покрытия (1 капсула один раз в день). Каждая капсула содержала $2,3\times10^9$ КОЕ *Bifidobacterium adolescentis* МС-42.

Группа 2 получала препарат в твердых желатиновых капсулах № 1 с кислотоустойчивым покрытием (1 капсула один раз в день). Каждая капсула содержала $2,3\times10^9$ КОЕ *Bifidobacterium adolescentis* МС-42.

Группа 3 получала препарат в твердых желатиновых капсулах № 1 с кислотоустойчивым покрытием (1 капсула один раз в день). Каждая капсула содержала $8,0\times10^7$ КОЕ *Bifidobacterium adolescentis* МС-42.

Проводилось бактериологическое исследование фекалий до, и после окончания лечения. Осуществлялось динамическое отслеживание клинических проявлений и состояния животных – внешний вид, поза, активность, аппетит, агрессивность, частота и характер стула – ежедневно в процессе лечения и после его окончания в течение 7 дней. Наблюдение за животными продолжалось в течение 2-3 недель.

В качестве основного критерия терапевтической эффективности препаратов использовали среднюю длительность клинических проявлений острой кишечной инфекции.

Результаты и их обсуждение. Как при первичном, так и последующих бактериологических исследованиях, патогенные представители энтеробактерий не были обнаружены ни у одной обезьяны.

Группа 1 – дисбиоз 2-ой степени: снижение содержания бифидобактерий, уменьшение количества нормальной кишечной палочки на 2-3 порядка. Увеличение численности кишечной палочки со слабой ферментативной активностью, а также клебсиелл, энтеробактерий и стафилококков. К окончанию лечения все 7 животных были практически здоровы. Применение *B. adolescentis* оказало благоприятное влияние на нормализацию кишечного микробиоценоза. Уже к 7 дню наблюдения отмечено повышение содержания бифидобактерий на 2-3 порядка, нормальных кишечных палочек – на 1-2 порядка на фоне снижения количества клеток с ослабленной ферментативной активностью. Через 7 дней после окончания дачи препарата наблюдалось полное восстановление микробиоценоза до нормальных величин. Средняя длительность клинических проявлений заболевания в группе – 9,3 дней.

Группа 2 – дисбиоз 2-ой степени: снижение содержания бифидобактерий, уменьшение количества нормальной кишечной палочки на

2-3 порядка. Увеличение численности кишечной палочки со слабой ферментативной активностью, а также клебсиелл, цитробактерий и стафилококков. К 7 дню эксперимента цитробактерии были полностью элиминированы, количество протея и эпидермального стафилококка было снижено на 2-3 порядка. Полная нормализация микробиоценоза кишечника обезьян произошла к 14 дню. Средняя длительность клинических проявлений заболевания в группе – 10,6 дней.

Группа 3 – дисбиотические проявления расценивались как 1-ой степени. К 14 дню наблюдения полностью исчезли гемолитические кишечные палочки, на 1-2 порядка уменьшилось количество слабоферментирующих кишечных палочек, резко снизилось количество стафилококков, уменьшилось количество обезьян, выделяющих клебсиеллы, энтеробактерии и протей. Средняя длительность клинических проявлений заболевания в группе – 13,5 дней.

Статистическая обработка результатов экспериментов с использованием непараметрического критерия U Манна-Уитни [2] показала, что средняя длительность клинических проявлений ОКИ у обезьян в группах 1 и 2 достоверно не отличалась (эмпирическое значение U_p составило 20, что больше критической величины критерия $U_т$, равной 8 при величине достоверности 95%). Это позволяет сделать два взаимоисключающих предположения:

1 – клетки бифидобактерий подверглись инактивации в желудке обезьян как в капсулах без покрытия (группа 1), так и в капсулах с кислотоустойчивым покрытием (группа 2);

2 – клетки бифидобактерий в обоих видах капсул не подверглись инактивации в желудке обезьян.

Первое предположение не выдерживает никакой критики, поскольку ранее проведенными исследованиями in vitro и in vivo, в том числе и рентгенографией [3], было показано, что разработанное пленочное покрытие на основе клуцела надежно обеспечивает целостность твердой желатиновой капсулы при нахождении ее в желудке обезьяны (до 4 часов) и разрушение капсулы с высвобождением содержимого при ее поступлении в тонкий кишечник. Следовательно, верным является второе предположение. А отсюда следует, что характеристика штамма *B. adolescentis* МС-42, включающая широкий спектр ферментативной

активности, выраженные антагонистические свойства против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, укороченный цикл размножения и более высокий уровень накопления биомассы по сравнению с широко используемыми в производстве штаммами вида *B. bifidum*, может быть дополнена повышенной устойчивостью к агрессивным составляющим желудочного сока.

Уменьшение концентрации бифидобактерий в лекарственной форме почти на 2 порядка (с $2{,}3\times10^9$ до $8{,}0\times10^7$ КОЕ) приводило к снижению терапевтической эффективности препарата, что выражалось в увеличении сроков лечения до нормализации стула и возвращения к норме зоосоциального поведения обезьян, а также нормализации микробиоценоза кишечника. Аналогичная вышеприведенной статистическая обработка данных по длительности клинических проявлений ОКИ в группах 1 и 3 с использованием критерия U показала достоверность различий сравниваемых величин (эмпирическое значение $U_р$ составило 5,5, что меньше критической величины критерия $U_т$, равной 8 при достоверности 95%).

В целом, вследствие применения препаратов *B. adolescentis* МС-42 в микробиоценозе ЖКТ обезьян происходили выраженные положительные изменения – возрастало количество нормальных представителей *E. coli,* существенно снижалось количество таких условно-патогенных микроорганизмов, как *Staph. epidermis*, представителей родов *Enterococcus*, *Proteus*, *Klebsiella* и *Citrobacter*. Нормализация клинических показателей носила необратимый характер, рецидивов заболевания не наблюдалось. Выздоровление обезьян достигалось без применения антибиотиков.

Заключение. Исходя из результатов проведенных исследований, можно заключить следующее. Твердые лекарственные формы (капсулы, таблетки, пелетты) на основе *B. adolescentis* МС-42 не нуждаются в защите от агрессивных составляющих желудочного сока, т.е. не требуют нанесения пленочного кислото- и ферментоустойчивого покрытия. Эти препараты могут быть использованы в качестве альтернативы антибиотикам (например, офлоксацину) при лечении неотягощенных форм острой кишечной инфекции обезьян. При этом целесообразно обеспечивать концентрацию бифидобактерий указанного штамма в лекарственной форме не ниже $1{,}0\times10^8$ КОЕ.

Литература

1. Алешкин В.А., Лапин Б.А., Давыдкин В.Ю., Джикидзе Э.К., Мелихова А.В., Симавонян К.В., Рубальский О.В., Давыдкин И.Ю. Способ определения целевой доставки в желудочно-кишечном тракте твердой лекарственной формы с защитным покрытием // Патент РФ на изобретение № 2317065. Опубликовано 20.02.2008. Бюллетень № 5.
2. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1975. – 77 с.
3. Давыдкин В.Ю. Технология и конструирование сухих биопрепаратов на основе микрокапельных порошков. Автореф. дисс. докт. биол. наук. – М., 2011. – 52 с.
4. Жиленкова О.Г. Селекция производственно перспективных штаммов бифидобактерий, выделенных от детей. Автореф. дисс. канд. биол. наук. – М., 2011. – 30 с.
5. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.А. Алешкина, С.С. Афанасьева, В.В. Поспеловой. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. – 608 с.
6. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И., Стасилевич З.К., Яковлева Л.А. Проблемы инфекционной патологии обезьян – М.: Издательство РАМН, 2004. – С. 48-49.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАТОГЕННОСТИ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА КРАСНУХИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ОБЕЗЬЯНАХ *MACACA RHESUS*

Лаврентьева И. Н.[1], Вышемирский О. И.[2], Агрба В. З.[2], Сухобаевская Л. П.[1], Гвоздик Т. Е.[2], , Леонтюк А. В.[2], Карал-Оглы Д. Д.[2], Шамсутдинова О. А.,[2] Симавонян К. В.[2]

[1] ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия
[2] ФУН «НИИ экспериментальной приматологии» ФМБА, Сочи, Россия
e-mail: pasteur.lawr@mail.ru

Резюме

Цель исследования – определение тератогенных свойств вакцинного штамма «Орлов-В» в эксперименте. В работе использован также препарат сравнения – штамм Wistar RA27/3. Беременные самки макака-резус (n=14) были иммунизированы против краснухи на ранних сроках беременности. В результате 3 месяцев наблюдений за развитием детенышей (клинические наблюдения, рентгенологические исследования, периодическое взвешивание), а также на основании вирусологических данных и отсутствия иммуноглобулинов класса М к вирусу краснухи в сыворотке крови новорожденных, сделано заключение о отсутствии тератогенных свойств штамма «Орлов-В».

Ключевые слова: вирус краснухи, вакцинный штамм, обезьяны макака-резус, тератогенность, IgM-антитела, IgG-антитела.

STUDY OF THE TERATOGENICITY OF RUBELLA VIRUS VACCINE STRAINS IN EXPERIMENT ON MACACA RHESUS MONKEYS

Lavrenteva I. N., Veshemirski O. I., Agrba V. Z., Suchobaevskaya L. P., Gvozgik T. E., Leontuk A.V., Chikobava M.G., Shamsutdinova O. A., Simavoniyn K. V.

Saint-Peterburg Pasteur Insitute, Saint-Peterburg, Russian Federation
Research Institute of Medical Primatology FMBA Sochi, Russian Federation

Abstract

The aim of the study was to determine the teratogenic properties of the vaccine strain “Orlov-V” in the experiment. In study also used the preparation of the comparison – strain Wistar RA27 / 3. Pregnant female rhesus monkeys (n = 14) were immunized against rubella in the early stages of pregnancy. As a result, 3 months of observations of the development of newborns (clinical observations, X-ray studies, periodic weighing), as well as on the basis of virological data and the absence of class M immunoglobulins in the blood serum of newborns, concluded that teratogenic properties of the strain “Orlov-V” are absence.

Key words: Rubella virus, vaccine strain, macaca rhesus monkeys, teratogenic properties, IgM- antibodies IgG- antibodies

Введение

Учитывая, что J.M. Best и др. описали возможность проникновения вакцинных штаммов вируса краснухи через плаценту [1], штаммы для живой краснушной вакцины должны тщательно изучаться в отношении возможного *тератогенного действия.*

В Великобритании, при обследовании 515 женщин, по тем или иным причинам привитых против краснухи во время беременности, в 10,6% случаев определяли внутриутробное инфицирование плода, хотя у рожденных детей не было выявлено признаков СВК [2].

Наиболее адекватной моделью для изучения вируса краснухи являются лабораторные приматы. Вирус краснухи патогенен, в частности, для обезьян Macacca rhesus и Macacca mulatta, чувствительных к интраназальному, внутримышечному и внутривенному заражению [3].

Значение этого вида лабораторных животных в доклинической оценке вакцинных штаммов для живых аттенуированных вакцин отмечено в ряде работ [4, 5].

Экспериментально доказанное развитие вирусемии при заражении обезьян Macacca rhesus патогенным штаммов вируса краснухи [6], свидетельствует о возможности проникновения вируса и через плаценту, что, в свою очередь, позволяет использовать эту модель для контроля возможного тератогенного действия вакцинных штаммов.

Тщательный контроль безопасности применения, в том числе контроль утраты тератогенных свойств, присущих «диким» штаммам вируса, – необходимый этап доклинического изучения вакцинного штамма для живой аттенуированной вакцины против краснухи. В экспериментах такого рода необходимым является использование препарата сравнения – препарата однонаправленного действия, желательно коммерческого производства [7].

Цель исследования: определение безопасности применения вакцинного штамма «Орлов-В» по критерию утраты тератогенных свойств в опыте на обезьянах макака-резус.

Материалы и методы

В работе использованы: вакцинные штаммы вируса краснухи «Орлов-В» («О-В») и Wistar RA27/3 (RA 27/3). Лабораторные животные:

серонегативные к краснухе беременные самки макака-резус в возрасте 4 – 7 лет на ранних сроках беременности (первая треть – первая половина гистации) в количестве 14 голов. Животные были разделены на три группы и иммунизированы: препаратом из штамма О-В – 12 самок; препаратом из штамма RA 27/3 – 2 самки; группу плацебо (для иммунизации использован растворитель вакцины) составили 2 самки.

Иммунизацию животных осуществляли однократным внутримышечным введением 0,5 мл препаратов из исследуемых штаммов. Прививочная доза составляла 1000 ТЦД50. Определение титров антител в сыворотке крови иммунизированных беременных обезьян проводили в РТГА, через 28 – 30 суток после иммунизации, используя «Диагностикум краснушный антигенный сухой для РТГА» производства ОНТ ФГУН «Санкт-Петербургский НИИЭМ имени Пастера»/ Анитела IgM-фракции определяли в сыворотке крови детенышей первого месяца жизни, родившихся от иммунизированных во время беременности самок. Для определения IgM-антител методом ИФА использовали тест-систему Вектор-Рубелла-IgM-стрип. Диагностические препараты использовали в соответствии с инструкцией. Все сыворотки крови были зашифрованы и исследовались одновременно.

Клиническое наблюдение за новорожденными обезьянами проводили ежедневно в течение 90 суток, на протяжении которых отмечали наличие или отсутствие отставания в развитии, клинических симптомов поражения центральной нервной системы, дыхательной системы, органов слуха и зрения. У новорожденных животных исследовали: объем и силу движений в конечностях; координацию движений; мышечный тонус (при пальпировании мышц конечностей в спокойном состоянии и при сгибании-разгибании). Определяли наличие тремора, гиперкинезы. Для определения возможного отставания в развитии детенышей периодически взвешивали. Формирование скелета оценивали рентгенологически.

Новорожденные животные, погибшие в родах, были исследованы патоморфологически: производили аутопсию, морфологическое и гистологическое исследование внутренних органов (провел к.м.н. А.В. Леонтюк). Гистологическому исследованию (с окраской гематоксилином и эозином и по методу Ниссля) были подвергнуты головной мозг, легкое, печень, почка, поджелудочная железа, селезенка новорожденных, а также плацента самок.

Молекулярно-генетические методы. Для выделения РНК вируса краснухи из исследуемого материала использовали набор реагентов «Рибо-сорб», производства ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва). Для проведения реакции ОТ-ПЦР использовали набор реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» (производства ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва). Амплификацию кДНК проводили с помощью набора реагентов для ПЦР-амплификации кДНК Rubella virus «АмплиСенс Rubella virus-EPh» (ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва). Анализ продуктов амплификации проводили разделением фрагментов кДНК в 2% агарозном геле. Все этапы реакции проводили по стандартной схеме в соответствии с инструкцией по применению.

Результаты и обсуждение

Клинические наблюдения и рентгенологическое исследование новорожденных, родившихся от иммунизированных во время беременности самок. Беременность 11 из 14 иммунизированных самок разрешилась нормальными, срочными родами; в двух случаях (1 – самка, иммунизированная препаратом из штамма «О-В», 1 – препаратом из штамма RA 27/3) беременность завершилась мертворождением вследствие родовой травмы. В одном случае гибель доношенного детеныша связана с отсутствием грудного вскармливания из-за отсутствия молока у матери, иммунизированной препаратом из штамма «О-В».

В ходе эксперимента были получены данные по клиническому наблюдению за детенышами, родившимися от вакцинированных во время беременности макак-резусов. Все 11 детенышей были оценены врачом-ветеринаром как клинически здоровые особи; первый месяц ежедневного клинического наблюдения не выявил ни в одном случае отставания в развитии условных рефлексов.

Периодическое взвешивание не обнаружило отставания в физическом развитии детенышей. В дальнейшем, в течение трех месяцев наблюдения никаких патологических состояний ни у одного из подопытных животных выявлено не было. Детеныши активно развивались, их поведение, вес, слух, зрение и структура костного аппарата соответствовала возрастной норме.

Учитывая, что одним из частых проявлений ВК является повышенная проницаемость костного аппарата, было проведено рентгенологическое обследование новорожденных для выявления возможных несоответствий развития скелета детенышей физиологической возрастной норме. Ни в одном случае не было выявлено характерных для врожденной краснухи (ВК) поражений костного аппарата. Обнаруженные у 2 особей (№ 40066 – группа «Орлов-В» и № 39978 – группа «плацебо») рахито-подобные изменения в ростовых зонах наиболее быстро растущих костей скелета оценены врачом-рентгенологом как не специфические. Сведения о динамике развития новорожденных (по показателю веса) на протяжении 60-80 суток после рождения представлены в таблице 1.

Как было указано ранее, в ходе эксперимента трое новорожденных детенышей погибли; двое из них в процессе родов, третий – от алиментарной дистрофии в связи с отсутствием грудного вскармливания (отсутствие молока у матери). Для определения возможной связи смерти плода с вакцинацией их матерей во время беременности, было проведено патолого-морфологическое и гистологическое исследование органов и тканей новорожденных. Ни в одном случае не было выявлено вирусспецифических поражений органов и тканей у погибших новорожденных.

Таблица 1

Показатели веса детенышей, родившимися от иммунизированных во время беременности обезьян макака-резус в динамике

№ №	Инв № матери	Штамм, использованный для иммунизации	Инв. № детены-ша, пол	Динамика веса в г (N= 300 – 600 г) /дни после рождения
1	36578	«Орлов-В»	39952, ж	400/ 7 415/ 14 430/ 25 460/ 28 570/ 80

2	34086	«Орлов-В»	39992, м	408/ 10 435/ 19 445/ 26 555/ 68
3	33605	«Орлов-В»	40066, ж	360/ 8 395/ 23 405/ 30 510/ 62
4	37085	«Орлов-В»	40063, ж	430/ 9 445/ 16 470/ 27 570/ 41 625/ 75
5	37174	«Орлов-В»	40064, ж	405/ 10 420/ 17 448/ 28 515/ 50 615/ 75
6	37686	«Орлов-В»	40116	505/10 540/ 21 535/ 28 540/ 46 590/ 70
7	37721	«Орлов-В»	40169, ж	415/ 9 445/ 18 455/22 475/28 530/45 580/ 85
8	33276	«Орлов-В»	40177, ж	510/ 7 565/12 575/20 605/28 665/65
9	37301	Wist. RA27/3	39964	445/ 8 460/15 480/22 495/30 615/70

10	33992	плацебо	39978	475/ 8 515/ 15 550/ 25 580/ 31 730/ 71
11	36518	плацебо	39991	410/ 9 420/18 420/ 26 630/65

Для определения возможного наличия РНК вируса краснухи в исследуемых образцах использовали метод полимеразной цепной реакции – ПЦР, как описано в главе «Материалы и методы». Материалом для исследования служили аутопсийный материал: ткани головного мозга, сердца, легкого, печени, почки, надпочечника, селезенки, толстой кишки новорожденных; ткань плаценты матери и образец пуповинной крови (1 образец – группа «О-В»). Вирусологическое исследование (методом ПЦР) тканей плаценты для определения возможного наличия РНК вируса краснухи удалось провести в 4 случаях, когда роды состоялись в утренние часы. В остальных 10 – образцы плаценты получить не удалось, так как роды происходили в ночное время, когда обслуживающий персонал отсутствовал в изоляторе содержания животных. Известно, что обезьяны в естественных условиях поедают плаценту сразу после родов, что и имело место в данном эксперименте.

Ни в одном из исследованных образцов РНК вируса краснухи не обнаружена, что свидетельствует об отсутствии проникновения вакцинных штаммов вируса краснухи через плаценту и, отсутствии внутриутробного инфицирования плода в каждом из исследованных случаев гибели новорожденного.

Исследование сывороток крови самок, иммунизированных против краснухи во время беременности проводили через 28-30 суток после иммунизации в РТГА с использованием антигенного краснушного эритроцитарного диагностикума производства ОНТ ФГУН «Санкт-Петербургский НИИЭМ имени Пастера» в соответствии с инструкцией по применению препарата. В качестве контроля в этом же опыте ис-

следовали сыворотки крови обезьян группы «плацебо». Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Титры антител в сыворотке крови иммунизированных и не иммунизированных против краснухи обезьян

№ макаки	Штамм, использованный для иммунизации	Титры антител в РТГА
36578	«Орлов-В»	1 : 160
34086	«Орлов-В»	1 : 320
33605	«Орлов-В»	1 : 160
37085	«Орлов-В»	1 : 640
37174	«Орлов-В»	1 : 1280
37686	«Орлов-В»	1 : 320
32771	«Орлов-В»	1 : 160
37721	«Орлов-В»	1: 640
33276	«Орлов-В»	1: 1280
37988	«Орлов-В»	1 : 640
31939	WistarRA27/3	1 : 640
37301	WistarRA27/3	1 : 320
33992	Плацебо	< 1: 10
36518	Плацебо	< 1: 10

Однократная иммунизация сопровождалась 100% сероконверсией, то есть, все подопытные животные ответили на введение вакцинных препаратов образованием специфических антител в высоких титрах. В то же время, по окончании периода наблюдения в сыворотке крови животных группы «плацебо» специфические антитела не определялись. Результаты свидетельствуют о развитии выраженного иммунного ответа на вакцинацию препаратами из вакцинных штаммов «Орлов-В» и WistarRA27/3 и подтверждают факт иммунизации животных.

Исследование выворотоk крови детенышей на наличие IgM-фракции противокраснушных антител проводили, собирая образцы

крови в течение первых 30 суток после рождения, т.к. частота выявления IgM- антител в сыворотках крови детей с ВУИ краснушной этиологии максимальна в первый месяц жизни, когда она составляет 100%. [8]. Все образцы до исследования хранились при температуре – 25 ° С.

Для определения IgM-антител методом ИФА использовали тест-систему Вектор-Рубелла-IgM-стрип в соответствии с инструкцией по применению. В качестве положительного и отрицательного контроля (помимо контролей, заложенных в тест-системе) были исследованы две выворотки крови людей: одна, полученная от больного с лабораторно подтвержденной краснухой, другая – от больного с отрицательным результатом на IgM-антитела к вирусу краснухи. Указанные сыворотки получены из вирусологической лаборатории Санкт-Петербургского Регионального центра по надзору за корью и краснухой, где указанные пациенты были обследованы ранее. Ни в одном случае в сыворотке крови детенышей, родившихся от иммунизированных во время беременности матерей, не было выявлено противокраснушных IgM-антител.

Известно, что в отличие от противовирусных IgG-антител, передающихся от матери к плоду и обеспечивающих пассивный противовирусный иммунитет детей первых месяцев жизни, антитела фракции IgM не проходят через плаценту. Их присутствие в крови новорожденных свидетельствует о развитии внутриутробной инфекции. Это обстоятельство было убедительно доказано E. Miller и соавт. (1982 г.) в когортных исследованиях детей, рожденных с внутриутробными инфекциями (ВУИ) краснушной этиологии. В связи с чем, согласно классификации ВОЗ, диагноз «врожденная краснуха» устанавливается только на основании обнаружения в крови младенца IgM-антител к вирусу краснухи, даже без наличия клинической симптоматики заболевания [9].

То есть, обнаружение IgM –антител в крови детенышей, родившихся от матерей, иммунизированных против краснухи во время беременности, было бы безусловным доказательством сохранения тератогенных свойств вакцинного вируса. И напротив, отсутствие таковых в условиях данного эксперимента – убедительное доказательство того, что вакцинные штаммы, использованные в настоящем исследовании, не вызывают внутриутробного инфицирования плода. Такое доказа-

тельство, полученное без умерщвления детенышей, является современным методом, отвечающим принципам гуманного обращения с лабораторными животными.

Заключение

В ходе доклинического изучения возможного тератогенного действия вакцинного штамма «Орлов-В» в опыте на обезьянах макака-резус, ни в одном случае не было получено каких-либо данных, свидетельствующих о внутриутробном инфицировании плода иммунизированных во время беременности самок. Полученные в эксперименте результаты доказывают отсутствие тератогенного действия вакцинных штаммов «Орлов-В» и Wistar RA27/3.

Литература

1. Best, J. M. Congenital Rubella Affecting in Infant Whose Mother Had Rubella Antibodies before Conception./ J. M. Best, G. Harcount, J. E. Banatlava // Brit. Med. J. – 1981. – V. 282. – P. 1235 – 1244.
2. Best J. M., Banatlava J.E. In: Principles and Practice of Clinical Virology. – 1990. – P. 337 – 374.
3. Horstmann, D. M. The use of primates in experimental viral infections- rubella and the rubella syndrome / D. M. Horsmann // Ann. N.Y. Asad. Sci. – 1969. – V. 162. – P. 594 – 597.
4. Лапин, Б.А. Некоторые актуальные направления медико-биологических исследований на приматах. / Б.А. Лапин // Перспективные направления использования лабораторных приматов в медико-биологических исследований: материалы всероссийской научной конференции 8-10 августа 2006 г. – Сочи-Адлер, 2006. – С.11 – 17.
5. Лапин, Б.А. Итоги и перспективы медико-биологических исследований на приматах / Б.А. Лапин // БЭБИМ. – 1996. – Т.122. – № 9. – С. 245 – 256.
6. Лаврентьева И.Н., Влияние иммунизации против краснухи на формирование специфических и неспецифических факторов иммунитета в опыте на обезьянах макака-резус /И.Н. Лаврентьева, А.Б. Жебрун, Л.П. Сухобаевская и др. // Материалы международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии в опытах на обезьянах. – Сочи-Адлер, 2007. – С. 86 – 94.

7. Санитарные правила: Государственные испытания и регистрация новых иммунобиологических препаратов / СП 3.3.2.561 – 96. М.: Минздрав России, 1998. – 127 с.
8. Miller, E. Consequences of Confirmed Maternal Rubella at Successive Stage of Pregnancy / E. Miller, J.E. Cradock – Watson, T.M. Pollok // Lancet. – 1982. – V. 2. – P. 781 – 784.
9. Руководство по организации эпидемиологического надзора за корью и врожденной краснушной инфекцией в Европейском регионе ВОЗ/ Женева. 2003. – 80 С.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Шахгильдян В.И.[1], Ядрихинская М. С.[2], Шипулина О.Ю.[1], Сафонова А.П.[1], Альварес Фигероа М.В[1], Домонова Э.А[1], Тишкевич О. А.[3]

[1]ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, [2]Московский городской Центр профилактики и борьбы со СПИДом ДЗ Москвы, [3]Инфекционная клиническая больница №2, г. Москва, Россия

vishakh@yandex.ru

Резюме

С целью определения диагностического значения выявления ДНК возбудителей вторичных заболеваний в биологических материалах у больных ВИЧ-инфекцией в 2007-2013 гг. обследовано 4133 стационарных взрослых пациентов (в стадии 4Б (СПИД) – 4В (СПИД) – 76%, количеством CD4-лимфоцитов в крови <200 кл/мкл – 75%). Исследовано 6847 биоматериалов (образцов крови, БАЛЖ, СМЖ и др.) на наличие и количественное определение ДНК M. tuberculosis, Cytomegalovirus, C. albicans, C. glabrata, C. cruzei, C. neoformins, T. gondii, H. SimplexI-II, HerpesVI, ВЭБ, JC-вируса, РНК ВИЧ молекулярными методами (ПЦР-тест-системы ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Установлено диагностическое значение качественного и

количественного содержания ДНК возбудителей основных оппортунистических заболеваний в биологических жидкостях и тканях; обоснована центральная роль молекулярных методов в своевременной постановке этиологического диагноза вторичных патологий у больных ВИЧ-инфекцией.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, ДНК микобактерий туберкулеза, ЦМВ-инфекция

THE CLINICAL ROLE OF MOLECULAR METHODS IN DIAGNOSIS OF INFECTION DISEASES

Shakhgildyan V.I., Yadrikhinskaya M.S., Shipulina O.Y., Safonova A.P., Alvares-Figueroa M.V., Domonova E.A, Tishkevich O.A.

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow AIDS Centre, Infections Clinical Hospital №2, Moscow, Russia

Abstract

Objective: to assess the diagnostic significance of opportunistic diseases pathogens detection in biological samples from HIV-infected patients . Methods: in 2007-2013, 4133 adult hospital patients were examined (76% had AIDS; CD4 blood count < 200 cells/mcL – 75%). 6847 biological samples (blood samples, BAL, CSF, etc.) were examined for M. tuberculosis, Cytomegalovirus, C. albicans, C. glabrata, C. cruzei, C. neoformins, T. gondii, H. Simplex I-II, HerpesVI, Epstein-Barr virus (EBV) and JC-virus DNAs, and HIV RNA presence and concentration (PCR-test in Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology» was used). Results: The role of the main opportunistic diseases pathogens DNA presence and concentrations in biological fluids and tissues in diagnosis was established; the central role of molecular methods in prompt diagnosis of opportunistic diseases in HIV-infected people was proven.

Key words: HIV-infection, DNA M. tuberculosis, CMV-infection

Введение. Лишь около 30% случаев поражения легких и 10% случаев энцефалитов поддается этиологической расшифровке. Все большее количество больных имеет той или иной природы иммуносупрессию, на фоне которой развивается различная инфекционная патология. Все чаще врач сталкивается с атипичным течением традиционных инфекционных болезней и нетрадиционной инфекционной природой поражения ряда органов. В острее стоит вопрос о роли инфекции в развитии соматического заболевания. Вторичные заболевания у больных ВИЧ-инфекцией являются некой моделью для изучения различных аспектов клинического течения, диагностики и лечения оппортунистических инфекций, в частности, роли современных диагностических методов в быстрой расшифровке природы поражения органов и своевременного назначения этиотропного лечения. В настоящее время в стране сохраняется рост общего количества ВИЧ-инфицированных лиц, числа больных на стадии СПИДа, увеличивается количество летальных исходов, связанных с ВИЧ-инфекцией [1]. По данным ФНМЦ ПБ СПИД число ВИЧ-инфицированных российских граждан на 03.07.2017 г. составило 1133390. Количество больных на стадии СПИДа в июле 2017 г. насчитывало 58860, большинство из них (48300 чел. (82,1%)) – погибли. В 2016 г. в России умерло 30550 больных ВИЧ-инфекцией (на 10,8% больше, чем в 2015 г.). Причем, у 25% причиной летального исхода явились вторичные заболевания [2].

Учитывая отсутствие патогномоничных клинических признаков, частой смешанной этиологией поражения внутренних органов, краеугольным является вопрос лабораторного подтверждения диагноза вторичного заболевания (туберкулеза, токсоплазмоза, ЦМВ-инфекции, пневмоцистной пневмонии, герпетических и грибковых поражений, многоочаговой лейкоэнцефалопатией, лимфомы головного мозга и др.), развивающегося на фоне иммуносупрессии. Наиболее распространенные методы серологической диагностики (определение специфических АТ различных классов) мало информативны для определения этиологической природы органных поражений. Выявление возбудителя заболевания путем проведения вирусологических и бактериологических методов обладает низкой чувствительностью и требует длительного времени для получения результата. Обнаружение

антигенов микроорганизмов уступает по чувствительности методам выявления ДНК возбудителей. Кроме того, выявление возбудителя без определения количественной оценки в том или ином биологическом материале не всегда свидетельствует о его этиологической роли и может быть не достаточным для установления природы органной патологии. Внедрение молекулярных методов, обладающих высокой аналитической чувствительностью, для диагностики инфекционных болезней затруднено в связи с не установленным клиническим значением (прежде всего клинической специфичности) получаемых результатов. Не известно диагностическое и прогностическое значение различных концентраций ДНК возбудителей вторичных заболеваний в биологических материалах.

Продолжается интенсивный поиск оптимальных подходов к предупреждению вторичных заболеваний у больных с иммуносупрессией, актуальны выработка лабораторных критериев начала упреждающей терапии для предотвращения манифестации оппортунистических инфекций, а также установление лабораторных критериев эффективности этиотропного лечения и длительности поддерживающей терапии для профилактики рецидивов оппортунистического заболевания.

Соответственно, проблема эффективной специфической лабораторной диагностики инфекционных болезней, в частности, у больных с иммуносупрессией, стоит по-прежнему остро.

Целью исследования явилось определение диагностического значения выявления ДНК возбудителей вторичных заболеваний в различных биологических материалах у больных ВИЧ-инфекцией.

Методы и объем исследования. В 2007-2010 гг. проводили клиническое и лабораторное обследование 3000 стационарных взрослых больных ВИЧ-инфекцией на стадии вторичных заболеваний (4А, 4Б, 4В), в 77% случаев имевших стадию 4В (СПИД), средний возраст: 32 $\pm$7,2 лет. У 80% больных количество CD4-лимфоцитов в крови составило <200 кл/мкл. Было исследовано 2000 образцов цельной крови, 777 образцов бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ), 777 биоптатов бронхов, 112 образцов плевральной жидкости, 14 образцов мокроты, 102 биоптатов пищевода, желудка, толстой кишки, 155 биоптатов лимфоузлов, 454 образцов СМЖ. Всего 4391 биоматериал.

В 2010-2013 гг. обследовали 1333 стационарных больных, из них на стадии 4В (СПИД) – 75,5%, 4Б (СПИД) – 7%, 4Б – 6%, 4А – 6%, 3 – 5,5%. Средний возраст пациентов составил 35 ± 5,3 лет. КоличествоCD4-лимфоцитов в крови <200 кл/мкл было у 70% больных, 200 -350 – 14%, 350-500 – 9%, >500 – 7%. Всего исследовано 1300 образцов цельной крови, 642 образца БАЛЖ, 13 биоптатов бронхов, 375 образцов ликвора, 26 биоптата ЖКТ, 45 биоптатов периферических лимфоузлов, 12 образцов мокроты, 28 плевральной жидкости, и ряд других биоматериалов. Всего: 2456 образцов.

Полученные биологические материалы исследовали на качественное и количественное определение ДНК M. tuberculosis, Cytomegalovirus, C. albicans, C. glabrata, C. cruzei, C. neoformins, T. gondii, H. Simplex I-II, Herpes VI, вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), JC-вируса с помощью молекулярных методов с использованием ПЦР-тест-систем производства ФБУН ЦНИИЭ.

Клиническое значение (диагностические чувствительность и специфичность) лабораторного маркера в биологическом материале определяли с использованием таблиц сопряженности (2 х 2). Согласно полученным результатам, обследуемые больные были распределены в одну из четырех возможных групп в зависимости от отрицательного или положительного значения лабораторного признака, а также наличия или отсутствия заболевания. Соответственно, по каждому лабораторному параметру были составлены следующие группы:

- с “истинно-положительным” (ИП) в отношении диагноза оппортунистического заболевания значением лабораторного маркера, когда у больного присутствовал лабораторный признак и было клинически выраженное заболевание;

- с “ложноположительным” значением (ЛП), когда определяли лабораторный маркер, но заболевание отсутствовало;

- с “истинно-отрицательным” значением (ИО), когда отсутствовали и лабораторный маркер, и заболевание;

- с “ложноотрицательным” значением (ЛО), когда не выявляли лабораторный маркер, но было клинически выраженное заболевание.

Клиническую чувствительность лабораторного признака определяли согласно формуле: ИП/(ИП+ЛО) х 100%; клиническую специфичность – по формуле: ИО/(ИО +ЛП) х 100%.

Пациенты получали этиотропную терапию вторичных заболеваний.

Результаты и обсуждение. Спектр и частота вторичных заболеваний у 666 больных на стадии 4В (СПИД) были следующими: туберкулез 269 случаев (40,4%), кандидоз пищевода/бронхов, легких 186/13 (28%/2%), манифестная ЦМВ-инфекция (ЦМВИ) 87 (13,1%), токсоплазмоз 55 (8,3%), пневмоцистная пневмония 63 (9,5%), саркома Капоши 6 (0,9%), ВИЧ-энцефалит 9 (1,4%), криптококковый менингит 7 (1%), атипичный микобактериоз 3 (0,5%), криптоспоридиоз кишечника 3 (0,5%), мультифокальная лейкоэнцефалопатия 3 (0,5%), ВПГ-бронхит, энцефалит 3 (0,5%), лимфома мозга первичная/ЛимфомаБеркита 1/6 (0,2/0,9%), пневмонии возвратные 48 (7,2%), генерализованный сальмонеллез 2 (0,3%), рак шейки матки 4 (0,6%) случаев.

Этиология вторичных заболеваний у 468 умерших больных ВИЧ-инфекцией была сходной: туберкулез 194 случаев (41,5%), ЦМВИ 58 (12,4%), пневмоцистная пневмония 54 (11,5%), пневмонии возвратные 44 (9,4%), токсоплазмоз 36 (7,7%), лимфомы 31 (6,6%), п/острый ВИЧ-энцефалит 12 (2,6%), криптококковый менингит 21 (4,5%), атипичный микобактериоз 16 (3,4%), генерализованные микозы 7 (1,5%), многоочаговая. лейкоэнцефалопатия 6 (1,3%), саркома Капоши 4 (0,8%), герпетический энцефалит 1(0,2%), рак шейки матки 1 (0,2%), астроцитома мозга 1 (0,2%).

В предыдущих исследованиях при изучении значения выявления ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови для диагностики манифестной ЦМВИ у больных ВИЧ-инфекцией нами было установлено низкое клиническое значение качественного обнаружения ДНК ЦМВ в клетках крови больных в связи с низкой клинической специфичностью (65,5%) (при 100% чувствительности) [3]. С целью оценки диагностического значения различных концентраций ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови ВИЧ-серопозитивных больных было обследовано 1698 пациентов, из которых у 293 (17,3%) в образцах крови была выявлена ДНК ЦМВ в количестве: <1.0 lg ДНК ЦМВ в 8,5% случаев, 1.0-1.9 lg 41.1%, 2.0-2.9 lg 26.4%, 3.0-3.9 lg 17.8%, 4.0-4.9 lg 5.4%, >5.0 lg ДНК ЦМВ в 0.8% случаев. ЦМВ-

болезнь диагностирована у 96 больных (наличие ретинита, ДНК ЦМВ и цитомегалоклеток в биоптате или аутоптате пораженного органа) при наличии ДНК ЦМВ в клетках крови в количестве: <2.0 lg ДНК ЦМВ в 1% случаев, 2-2.9 lg 50%, 3-3.9 lg 91.3%, >4 lg ДНК ЦМВ в 100%. Диагностическое значение было максимальным у показателя 3.0 lg ДНК ЦМВ и более в 10^5 лейкоцитах (клиническая чувствительность 72,9%, специфичность 99,7%) [3].

135 образцов плазмы исследовали на наличие ДНК ЦМВ. Количество ДНК ЦМВ составило от 100 до 10000000 коп/мл (100-1000 коп/мл 33%, 1000-10000 10,4%, >10000 коп/мл 3,7% случаев). Результаты показали корреляцию между количеством ДНК вируса в клетках и частотой выявления ДНК ЦМВ в плазме крови, но при наличии активной ЦМВИ ДНК ЦМВ в плазме определяли позднее по сравнению с лейкоцитами крови, у больных манифестной ЦМВИ показатели плазменной вирусной нагрузки находились в широких пределах. Наличие высокой концентрации ДНК ЦМВ в плазме крови (>10000 коп/мл), по-видимому, подтверждает ЦМВ-природу органных поражений.

Исследование биологических материалов у больных ВИЧ-инфекцией показало наличие ДНК ЦМВ в образцах БАЛЖ в 39.2% случаев, биоптатах бронхов 14.2%, образцах плевральной жидкости 2.7%, образцах мокроты 14.3%, биоптатах пищевода, желудка, толстой кишки 27.4%, биоптатах лимфоузлов 7.7%, образцах ликвора в 2.6% случаев. Для определения клинического значения присутствия ДНК ЦМВ в биологическом материале. были проанализированы результаты исследования БАЛЖ и биоптатов бронхов, полученных при проведении фибробронхоскопии у 744 больных ВИЧ-инфекцией (в 75% случаев количество CD4-лимфоциты <200 кл/мкл) [4]. ДНК ЦМВ была выявлена в БАЛЖ в 294 случаях (39.5%), биоптатах бронхов – 112 (15.1%). ЦМВ-пневмонией страдало 70 человек. Диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в БАЛЖ составила 90%, специфичность – лишь 66%, что свидетельствовало о низком клиническом значении качественного выявления ДНК вируса в БАЛЖ и необходимости определения концентрации возбудителя в лаважной жидкости [4]. Дальнейшее исследование 642 образцов БАЛЖ показали содержание ДНК ЦМВ в количестве от 100 до 79900700 коп/мл. В 61% случаев количество копий было

<1000/мл, 20% 1000-10000/мл, в 12% 10000-100000/мл, в 7% случаев >100000 коп/мл [2]. Диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в биоптате бронха составила 79%, специфичность 92%, что позволило считать наличие ДНК ЦМВ в биоптатах бронхов важным диагностическим критерием ЦМВ-поражения легких. Содержание ДНК ЦМВ в биоптатах бронхов составляло от 169 до 90972 копий (69,2% случаев 100-1000, 15,3% >1000 копий) [2,4].

В мокроте концентрация ДНК ЦМВ составляла от 100 до 1314600 коп/мл (<1000 коп/мл 64% случаев, 1000-10000 коп/мл 18%, 10000-100000 коп/мл 9%, >100000 коп/мл 9%). В плевральной жидкости содержание ДНК ЦМВ находилось в пределах 100 – 17900 коп/мл (в 21% случаев 100-1000 коп/мл, 14% 1000-10000 коп/мл, 7% >10000 коп/мл). В лимфоузлах ДНК ЦМВ была в количестве 264 – 120046 коп. (50% случаев 100-1000 коп, 25% 1000-10000 коп., 12,5% 10000-100000 коп. и 12,5% >100000 коп.). В биоптатах кишечника ДНК ЦМВ обнаруживали в количестве 99 – 444834 коп. (в 23% случаев <1000 коп. 7,7% 1000-10000 коп., 23% 10000-100000 коп., 11,5% >100000 коп.). Клиническое значение количественного содержания ДНК ЦМВ в указанных биологических материалах требует дальнейших исследований.

Факт обнаружения ДНК ЦМВ в ликворе не является достаточным основанием для постановки диагноза ЦМВ-энцефалита. Количественное содержание ДНК ЦМВ в СМЖ было в пределах от 100 до 850 600 коп/мл. В 8,8% случаев <1000 коп/мл, 2% 1000-10000 коп/мл, 0,8% 10000-100000 коп/мл, 0,26% >100000 коп/мл. У больных ЦМВ-энцефалитом (диагноз ставился на основании посмертных исследований и/или на основании характерных нейрокогнитивных проявлений (в ряде случаев в сочетании с ретинитом), данных МРТ, высокой концентрации ДНК ЦМВ в крови, отсутствия ДНК JC-вируса и низкой концентрации РНК ВИЧ в ликворе), содержание ДНК ЦМВ было не ниже 20000 коп/мл. По-видимому, у больных с иммуносупрессией, страдающих энцефалитом, наличие ДНК ЦМВ в спинномозговой жидкости в концентрации >10000 коп/мл указывает на цитомегаловирусную природу поражения головного мозга.

Следовательно, на ЦМВ-природу поражения органов указывает обнаружение ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови в количестве 3.0 lg ДНК виру-

са, в плазме крови, в БАЛЖ, СМЖ – в количестве не менее 10000 коп/мл, а также наличие ДНК ЦМВ в биоптатах бронхов и наличие цитомегалоклеток в биопсийном материале пораженного органа.

Исследование крови на наличие ДНК вируса у больных ЦМВИ, получающих этиотропную терапию ганцикловиром, продемонстрировало роль данного маркера, как критерия эффективности проводимого лечения. На фоне этиотропной терапии в 98% случаев отмечали снижении концентрации ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови до неопределяемого уровня [3].

Обнаружение ДНК ЦМВ в крови является критерием активности инфекционного процесса и имеет прогностическое значение в развитии манифестной ЦМВИ. В зависимости от наличия и количественного содержания ДНК ЦМВ в крови больных ВИЧ-инфекцией частота развития ЦМВ-болезни в течение года была различна. Клинически выраженная ЦМВИ имела место в 0.8% случаев при первоначальном отсутствии ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови, в 18,2% – при минимальной концентрации ДНК ЦМВ, 31,2% – низкой, 50% – средней, 92,9% – высокой [3]. На основании полученных данных была дана рекомендация о начале упреждающей терапии валганцикловиром (900 мг/сут) у больных ВИЧ-инфекцией при количестве в крови CD4-лимфоцитов <50-100 кл/мкл и наличии ДНК ЦМВ в цельной крови в концентрации 2.0 lg ген/мл или наличии ДНК ЦМВ в плазме с целью профилактики развития манифестных форм ЦМВИ. Терапию проводили под контролем ДНК ЦМВ в крови (1 раз в 2-4 недели) и осмотра офтальмолога (1 раз в мес.), длительность ее составляла не менее одного месяца. В результате проведения превентивной терапии у 120 больных ВИЧ-инфекцией с глубокой иммуносупрессией частота клинически выраженной ЦМВИ снизилась с 30% до 7,5% (время наблюдения 2,5 года) [3]. Результатом внедрения современных методов диагностики ЦМВ-инфекции, проведения на их основе превентивной и лечебной этиотропной терапии, а также своевременного начала АРВТ стало сокращение доли ВИЧ-инфицированных больных, погибших от клинически выраженной ЦМВИ с 41,2% в 2001 г. до 13,8% в 2015 г.

Обнаружение в содержимом везикул ДНК ВПГ или ДНК ВВЗ имеет важное значение при дифференциальной диагностике атипичного по-

ражения кожи. При обследовании 68 ВИЧ-инфицированных больных, страдающих распространенным поражениями кожи лица, вызванных ВПГ (37 человек) и опоясывающим лишаем (31 человек), ДНК ВПГ-1,2 или ВВЗ в содержимом везикулы обнаружили в 88.2% случаев, при этом в крови ДНК вирусов присутствовала лишь в 3 случаях (4.4%) [5]. Исследование ликвора, которое проводили в связи с наличием поражения ЦНС, показало наличие ДНК ВПГ-1,2 в 3%, ДНК ВВЗ – 1,3%, ДНК ВГЧ-6 – в 1,3% случаев (в количестве от 400 до 24100 коп/мл). В группах больных с поражением соответствующих органов, частота выявления ДНК ВПГ-1,2 в мокроте составила 33%, в биоптатах лимфоузлов 2,2%, биоптатах ЖКТ 3,8% случаев. ДНК ВГЧ-6 в мокроте была обнаружена в 17% случаев, в БАЛЖ 6,2% (в средней концентрации 147 коп/мл), плевральной жидкости 7,1%, биоптатах лимфоузлов 2,2%, биоптатах ЖКТ в 3,8% случаев. ДНК ВВЗ в указанных материалах отсутствовала. Значение качественного и количественного выявления ДНК ВПГ-1,2, ВВЗ, ВГЧ-6, ВГЧ-7 в различных биоматериалах для диагностики висцеральных форм герпесвирусных инфекций требует дальнейших исследований.

Согласно полученным данным, ВЭБ явился возбудителем, наиболее часто обнаруживаемом в любом биологическом материале: в крови в 25,6% случаев, мокроте 67%, БАЛЖ 44,5%, биоптатах бронхов 15,3%, плевральной жидкости 50%, ликворе 28,5%, биоптатах лимфоузлов 64%, кишечника 19,2% случаев. Количественное содержание ДНК ВЭБ в крови составило от 1,0 до 3,3 lg, мокроте 2400 – 49380000 коп/мл (50% сл. <10000 коп/мл, 12,5% 10000-00000 коп/мл, 37,5% >100000 коп/мл); в БАЛЖ 100 – 26385100 коп/мл (38% сл. 100-5000 коп/мл, 31% 5000-50000 коп/мл, 8,5% 50000-100000 коп/мл, 22,5% >100000 коп/мл); плевральной жидкости 400 – 1484500 коп/мл (14% сл. <1000 коп/мл, 21% 1000-10000 коп/мл, 3,5% 10000-100000 коп/мл, 11,5% сл. >100000 коп./мл), биоптатах лимфоузлов 100 – 1553247 коп. (21% сл. <1000 коп, 38% 1000-10000 коп, 38% 10000-100000, 7% >100000), в биоптатах ЖКТ 100 -19100 коп, СМЖ 100 – 1636500 коп/мл (83% сл. <1000 коп/мл, 11% 1000-10000 коп/мл, 4% 10000 – 100000 коп/мл, 2% >100000 коп/мл). У пациентов с лимфомой головного мозга концентрация ДНК ВЭБ в СМЖ составила: <1000 коп/мл в 20% случаев, 1000–10000 коп/

мл 47%, 10000-100000 коп/мл 20%, >100 000 коп/мл в 13% случаев. Представленные данные предполагают значительно более широкий, чем представлялось ранее, спектр органных поражений, обусловленных ВЭБ. Но диагностическое значение различных концентраций ДНК ВЭБ остается не известным. О первичной лимфоме головного мозга с наибольшей достоверностью свидетельствует концентрация ДНК ВЭБ в ликворе более 10000 коп/мл.

Важное значение для подтверждения наличия саркомы Капоши имеет обнаружение в местах кожного поражения генома ВГЧ-8 типа. Ранее нами было показано достоверно более частое обнаружение ДНК ВГЧ-8 в биоптатах саркомы Капоши по сравнению с биоптатами непораженной кожи той же части тела ВИЧ-инфицированного больного, а также наличие «половых цепочек» между больными ВИЧ-инфекцией с саркомой Капоши [6,7].

Проведенные нами исследования впервые в РФ показали высокую диагностическую роль выявления ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) у больных ВИЧ-инфекцией [4]. Была проведена диагностическая фибробронхоскопия у 744 больных ВИЧ-инфекцией с исследованием БАЛЖ и биоптатов бронхов на наличие ДНК МБТ. Больные туберкулезом легких (255 человека) в 181 случаев (71%) имели ДНК МБТ в БАЛЖ, в 156 (61,2%) – биоптатах бронхов. Среди 237 пациентов с наличием ДНК МБТ в БАЛЖ туберкулез легких был диагностирован у 187 (76,4%) человек, среди 166 пациентов с ДНК МБТ в биоптатах бронхов – у 156 (94%) человек. У остальных пациентов на момент обследования диагноз туберкулеза поставлен не был. Диагностическая чувствительность наличия ДНК МБТ в БАЛЖ составила 71%, специфичность – 88,5%. Диагностическая чувствительность наличия ДНК МБТ в биоптатах бронхов была на уровне 61,2%, специфичность – 98%. Из 139 ВИЧ-инфицированных пациентов с наличием ДНК МКБ как в БАЛЖ, так и в биоптате бронха, не страдали туберкулезом легких только 3 человека (2,2%). Туберкулез легких был диагностирован лишь у 14,1% больных, не имевших ДНК МКБ ни в БАЛЖ, ни в биоптатах бронхов [4].

Недавнее совместное исследование 304 больных ВИЧ-инфекцией, госпитализированных в инфекционную больницу и переведенных

впоследствии с диагнозом «туберкулез» в Туберкулезные клинические больницы, у 235 из которых туберкулез (ТБ) был подтвержден, продемонстрировало высокую чувствительность обнаружения ДНК МБТ мокроте (44,8%), БАЛЖ (58,3%), биоптатах бронхов (56%) у больных ТБ легких и внутригрудных лимфоузлов (ВГЛУ), плевральной жидкости (68,6%), ликворе (54%), биоптатах периферических лимфоузлов (93,7%) при соответствующем туберкулезном поражении [8]. Чувствительность метода ПЦР при выявлении ДНК МБТ у больных ТБ на поздних стадиях ВИЧ-инфекции (количество CD4-лимфоцитов в крови составляло от 0 до 235 кл/мкл; медиана – 103 кл/мкл) значительно превышала чувствительность микроскопии, люминисцентной микроскопии и культурального метода. Специфичность наличия ДНК МБТ в биологических материалах составила 100%. Применение метода ПЦР и выявление ДНК МБТ у больных ВИЧ-инфекцией с глубокой иммуносупрессией увеличивало частоту верификации заболевания, значительно сокращало срок пребывания больных ТБ в инфекционном стационаре перед переводом в специализированную больницу, уменьшало время постановки диагноза в туберкулезном стационаре и срок до начала специфической терапии. Особенно актуальным является применение ПЦР для анализа биологических материалов при развитии генерализованного ТБ (19% случаев) или микобактериальном поражении ЦНС (22,7% больных с патологией ЦНС) [8].

Из 458 больных ВИЧ-инфекцией с поражением ЦНС 156 страдали церебральным токсоплазмозом, диагноз которого был основан на клинической картине болезни, данных МРТ головного мозга, отчетливой положительной динамикой клинического состояния и результатов МРТ на фоне этиотропной терапии. ДНК токсоплазмы в СМЖ была выявлена у 67 больных (14,6%). Все они имели токсоплазменное поражение головного мозга. Не было ни одного случая обнаружения ДНК возбудителя в СМЖ при отсутствии церебрального токсоплазмоза. Частота обнаружения ДНК T.gondii в СМЖ среди больных токсоплазмозом составила 42,9%. Соответственно, диагностическая чувствительность наличия ДНК T.gondii в ликворе была равна 43% при 100% специфичности, что говорит о необходимости включения в алгоритм обследования больных с поражением ЦНС исследования ликвора на наличие

ДНК T.gondii [9]. У ряда больных токсоплазмозом удавалось выявить возбудитель в крови и БАЛЖ.

Среди больных ВИЧ-инфекцией с поражением легких частота встречаемости ДНК P. jiroveci (PCP) – возбудителя пневмоцистоза в мокроте составила 17%, БАЛЖ 11%, биоптатах лимфоузлов 6,6% случаев. Для определения клинического значения обнаружения ДНК PCP в БАЛЖ и биоптатах бронхов было ретроспективно протестировано 483 образца (290 БАЛЖ, 193 биоптатов бронхов), полученных при проведении диагностической бронхоскопии 360 больных ВИЧ-инфекцией и 63 пробы БАЛЖ, полученных от больных ТБ. Из 360 пациентов ДНК PCP была выявлена у 42 (11,7%). Клинические диагнозы до получения результатов лабораторного исследования были следующими: пневмоцистная пневмония (14 больных; 34%), пневмония неясной этиологии (7; 17%), ТБ ВГЛУ в сочетании с пневмонией неясной этиологии (12; 29%), ЦМВ-пневмония (8; 20%; в 4 случаях в сочетании с пневмоцистной пневмонией и ТБ ВГЛУ). ДНК PCP отсутствовала в биоматериалах 318 пациентов (88,3%). Ни в одном из этих случаев диагноз пневмоцистной пневмонии поставлен не был, и ни в одной из 63 проб БАЛЖ больных ТБ не была обнаружена ДНК PCP. Приведенные данные свидетельствуют о высоком значении отрицательного результата – отсутствия ДНК P. jiroveci в БАЛЖ или биоптатх бронхов – для исключения пневмоцистоза как причины поражения легких, но положительный результат – обнаружение ДНК PCP в БАЛЖ больных ВИЧ-инфекцией – не может служить достаточным основанием для постановки диагноза пневмоцистной пневмонии.

Согласно данным недавних зарубежных работ, обнаружение ДНК JC-вируса в СМЖ при поражении ЦНС является важным диагностическим критерием наличия прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии (клинические чувствительность 72-100%, специфичность 92-100%) [10]. Первые результаты наших исследований (обнаружение JC-вируса в СМЖ 11 больных) показывают, что до получения результатов обследования в 7 случаях пациентам ставили диагноз «мультифокальная лейкоэнцефалопатия» и в 4 случаях «многоочаговое поражение головного мозга неуточненной этиологии».

При обследовании больных ВИЧ-инфекцией, имеющих поражение дыхательной системы, частота обнаружения в мокроте C. albicans составила 8%, C. glabrata – 8%, C. krusei – 0%, биоптатах бронхов 0%, плевральной жидкости 0%, 3,6%, 0%, соответственно. В БАЛЖ C. albicans была выявлена в 20,2% случаев в количестве 5 – 4360818 коп/мл (в 95% случаев <1000 коп/мл, 3% 1000-10000 коп/мл; 2% >10000 коп/мл); C. glabrata в 10% случаев в количестве 5 – 552846 коп/мл (96% <1000 коп/мл, 3% 1000-10000 коп/мл, 1% >10000 коп/мл); C. krusei в 2,3% случаев в количестве 5 – 6938 коп/мл) (99% <1000 коп/мл, 1% >1000 коп/мл). Грибы рода Candida были также выявлены в лимфоузлах: C. albicansв 15,5% случаях (9 – 15953 коп), C. glabrata 6,6%, C. krusei 4,4%, в биоптатах ЖКТ в 15,3%, 11,5%, 3,8%, СМЖ 0,8%, 1%, 0% случаев, соответственно.

Частота обнаружения Cryptococcus neoformins у больных с поражением ЦНС (энцефалит, менингит) составила 4,2% в количестве от 255 до 1180400 коп/мл, в том числе в 1% случаев <1000 коп/мл, 1,3% 1000-10000 коп/мл, 0,5% 10000-100000 коп/мл, 1,3% >100000 коп/мл. Выявление ДНК Cr. neoformans в ликворе, БАЛЖ с количественной оценкой содержания возбудителя играло важную роль в постановке диагноза криптоккокоза и в оценке эффективности проводимой этиотропной терапии.

Следовательно, использование молекулярных методов для выявления возбудителей инфекционных заболеваний играет центральную роль в своевременной и точной постановке диагноза и раннем начале этиотропного лечения.

Литература

1. Покровский В.В., Ладная Н.Н., Тушина О.И, Буравцова Е.В., Юрин О.Г.ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень 2016; 41. 56 с.
2. Ядрихинская М.С., Шахгильдян В.И., Сафонова А.П., Шипулина О.Ю. и др. Значение молекулярных методов в диагностике вторичных заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией Уральский медицинский журнал, 2016 (142), №9, стр. 103-109.
3. Шахгильдян В.И. Герпесвирусные инфекции. В кн.: В.В. Покровский ред. ВИЧ-инфекция и СПИД. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013; 202–236.

4. Шахгильдян В.И., Литвинова Н.Г., Морозова С.В., Шипулина О.Ю. Тишкевич О.А. и др. Клиническое значение обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза, цитомегаловируса, токсоплазмы в бронхоальвеолярном лаваже и биоптатах бронхов у ВИЧ-инфицированных больных с легочной патологией Эпидем. и инф.. бол., 2006.- №6.- С. 50-54.
5. Хашиева Ф.Н., Потекаев Н.Н., Кравченко А.В., Шахгильдян В.И., Зудин А.Б. Клиника простого и опоясывающего герпеса у больных ВИЧ-инфекцией. Клиническая дерматология и венерология 2004; 4: 8–10.
6. Панкова Г.Ю., Кравченко А.В., Шахгильдян В.И., Груздев Б.М. Клинические проявления СПИДа у половых партнеров 4-я Междунар. конференц. «СПИД, рак и родственные проблемы, С.-Петербург, 1996.- С.146-147.
7. Галецкий С.А., Молочков А.В., Кадырова Е.Л., Шахгильдян В.И. ПЦР-диагностика последовательностей нового герпесвируса 8-го типа у больных саркомой Капоши в России Вопросы вирусологии 2000.- Т. 45. №4.- С.13-18.
8. Долгова Е.А., Альварес Фигероа М.В., Шахгильдян В.И., Флигель Д.М., Шипулин Г.А. Применение полимеразной цепной реакции для ранней диагностики туберкулеза у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции инфекционного стационара. Эпидем. и инф. бол. 2014.- Т.12, №4.- С.11-17.
9. Перегудова А.Б., Ермак Т.Н., Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю., Гончаров Д.Б. Церебральный токсоплазмоз в структуре поражения центральной нервной системы у больных ВИЧ-инфекцией Эпид. и инф. болезни. Актуал. вопр. 2013; 1: 26–30.
10. Бартлетт Дж., Галант Дж., Фам П. Клинические аспекты ВИЧ-инфекции, 2012. М.: Р. Валент, 2012. 528 с.

АНАЛИЗ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЗООНОЗОВ В МАЛОИЗУЧЕННЫХ РЕЗЕРВУАРАХ

Алексеев А.Ю., Адаменко Л.С., Гуляева М.А., Дерко А.А., Шестопалов А.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», Новосибирск, Россия.

Al-AlexOK@ngs.ru

Резюме

Причиной возникновения эпидемий и эпизоотий может явиться проникновение новых вариантов возбудителей инфекционных или инвазионных заболеваний из новых регионов или природных резервуаров, что обусловливает высокую потенциальную опасность для человека и сельскохозяйственных животных. Начиная с 2000 года, нами проведено исследование циркуляции некоторых патогенов (токсоплазма, морбилливирусы, бруцеллы, вирус гриппа и др.) в малоизученных резервуарах млекопитающих, таких как белые медведи, ондатра, тюлени, сивучи, афалины, белуха и некоторых других.

Ключевые слова. Малоизученные резервуары, инфекционные заболевания, инвазионные заболевания, диагностика, монитооринг.

STUDY OF THE CIRCULATING ZOONOTIC DISEASES PATHOGENS IN UNDERSTUDIED RESERVOIRS

Alekseev A.Yu., Adamenko L.S., Gulyaeva M.A., Derko A.A., Shestopalov A.M.

Scientific research Institute of experimental and clinical medicine, Novosibirsk, Russia.

Al-AlexOK@ngs.ru

Abstract

The cause of epidemics and epizootics may be the penetration of new variants of infectious or parasitic diseases from new regions or natural reservoirs, resulting in a high potential hazard to humans and farm animals. Since 2000, we have conducted a study of the circulation of some pathogens (Toxoplasma gondii, morbilliviruses, Brucella, influenza virus, etc.) in understudied reservoirs of mammals such as polar bears, Fox, seals, sea lions, bottlenose dolphins, Beluga whales and some others.

Key words. Understudied reservoirs, infectious diseases, parasitic diseases, diagnosis, monitoring.

Введение. По мере расселения людей по планете, а также с ростом численности и плотности населения наш вид стал раем для инфекции.

Со временем инфекционные заболевания перешли с их предыдущих хозяев на человека. Наши ближайшие соседи-животные стали для нас источником наибольшего количества болезней. Каждый год, по меньшей мере, одно новое инфекционное заболевание фиксируется у человека. Важную роль в этом играют – новые и вновь возникающие, или emerging-reemerging инфекции.

Известно, что причиной возникновения эпидемий и эпизоотий является проникновение новых вариантов возбудителей инфекционных заболеваний из новых регионов или природных резервуаров, что обусловливает высокую потенциальную опасность для человека и сельскохозяйственных животных. Большинство появившихся за последние годы инфекционных болезней вызваны патогенами, уже существовавшими в окружающей человека среде. Они получили преимущества перед другими патогенами в результате изменения природных условий и образования нового механизма проникновения в популяции новых хозяев (например, филовирусы). Только в очень редких случаях может возникнуть новый вариант микроорганизма, вызывающий новую инфекцию (например, птичий грипп).

Часто резервуар неизвестен или ошибочен (например, вируса Эбола, вируса бешенства). Исследования экологии возбудителей, для которых первичный резервуар казался еще 10—20 лет назад вполне очевидным (возбудители чумы, псевдотуберкулеза, холеры, полиомиелита, туберкулеза, лепры и др.), показали условность этого термина. То, что считалось первичным резервуаром, оказалось только промежуточным.

В последнее время все чаще наблюдаются случаи передачи новых субтипов вирусов от млекопитающих к человеку. Чаще всего они ограничены географически определенной территорией. Например, передача возбудителя лихорадки Ласса и некоторых других вирусных геморрагических лихорадок от грызунов *(Mastomys Natalensis*) к людям географически ограничена в Западной Африке.

В 2009 году Институт медицины и Национальный исследовательский комитет (США) определил пять основных проблем в отношении зоонозов: (I) постоянное увеличение частоты возникновения новых зоонозов; (II) высокий потенциал для быстрого глобального распростра-

нения в связи с активной международной торговлей, путешествиями и перемещениями животных; (III) низкая вероятность готовности здравоохранения стран к вспышкам известных и появлению новых зоонозов; (IV) непредсказуемое воздействие на здоровье человека и животных, и (V) вероятность тяжелых экономических последствий при распространении в человеческой популяции (дорогое медицинское обслуживание), а также при распространении у сельскохозяйственных животных.

Последние вспышки заболеваний, которые были глобальными или локальными и оказали большое влияние на животноводство и жизнедеятельность человека включают в себя эпидемию лихорадки долины Рифт в Южной Африке в 2010 году, эпидемия риккетсиоза в Нидерландах в 2007-2010 гг., пандемия гриппа A/H1N1 в 2009 году [9]. Хотя все три эпидемии имели значительные локальные последствия, пандемия гриппа наглядно продемонстрировали глобальные последствия передачи зоонозных заболеваний на популяцию человека. Несмотря на годы усиленного надзора за H5N1 и другими высоко патогенными вирусами гриппа птиц, быстрое распространение нового штамма H1N1 от первоначальной идентификации в апреле 2009 года в глобальную пандемию 6 недель спустя (11 июня) удивил многих чиновников органов здравоохранения стран [10].

Таким образом, хотя и существует система контроля за возбудителями зоонозных заболеваний, она ограничена санитарным контролем в медицине и ветеринарным контролем сельскохозяйственных животных и территории их содержания. Дикие животные (особенно редкие или имеющие редкий контакт с человеком) представляют собой малоизученный резервуар возбудителей зоонозных заболеваний. Если гибель промысловых видов диких животных в минимальной степени отслеживается и контролируется, то гибель непромысловых и занесенных в «Красную книгу» может обратить на себя внимание даже специалистов только случайно.

Целью работы явился анализ циркуляции возбудителей некоторых зоонозных инфекционных и инвазионных заболеваний в малоизученных резервуарах – популяциях диких млекопитающих.

Материалы и методы. Исследуемый материал представлял собою назальные мазки и сыворотки крови белого медведя (*Ursus maritimus*

Phipps, 1774) арктического побережья России (9 животных), ондатры (*Ondatra zibethicus* Linnaeus, 1766) Чановской озерной системы (юг Западной Сибири) (213 животных), каспийского тюленя (*Phoca caspica* Gmelin, 1788) (328 животных), завозимых в Россию обезьян (24 обезьян вида Зеленая мартышка (*Chlorocebus aethiops* Linnaeus, 1758*),* 120 обезьян вида Беличий саймири (*Saimiri sciureus* Linnaeus, 1758), 30 обезьян вида Краснорукий тамарин (*Saguinas midas* Linnaeus, 1758), 20 обезьян вида Бурый капуцин (*Cebus apelloa* Linnaeus, 1758), 20 обезьян вида яванских макак (*Macaca fascicularis* Raffles, 1821), 20 обезьян вида макака – лапундер (*Macaca leonina* Blyth, 1863); сыворотки крови 602 сивучей (*Eumetopias jubatus* Schreber, 1776) северо-западной части Тихого океана, 74 афалины Черного моря (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821), 307 белух Охотского моря (*Delphinapterus leucas* Pallas, 1776).

Сыворотки крови тестировали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Принцип метода заключается во взаимодействии имеющихся в анализируемом образце антител к возбудителям заболеваний с иммобилизованным на поверхности лунок планшета антигеном соответствующего возбудителя. Комплекс "антиген-антитело" выявляют с помощью коньюгата пероксидазы хрена с антигеном *Toxoplasma gondii* Nicolle et Manceaux, 1909 или с рекомбинантным белком А из *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884. Комплекс "антиген-антитело-конъюгат" выявляют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы и хромогена. Во всех тест-системах в качестве хромогена использовали тетраметилбензидин (ТМБ). Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации специфических антител в анализируемых образцах. Образец считался положительным, если все повторы в разведении 1 : 40 были положительны.

Для выявления антител к следующим патогенам: комплексу брucелл (Brucella abortus, B. melitensis, B. suis); комплексу микобактерий туберкулезного комплекса (Mycobacterium tuberculosis complex); микоплазмы (Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae); хламидии; иерсении; аспергилла; альфа- герпесвирусы (на примере вируса Варицелла-зостер), гамма- герпесвирусы (на примере вируса Эпштейн-Барр); описторхи, клонорхи; аскариды; возбудители анизакидоза, цистицеркоза, трихинеллёза использовали наборы для ИФА с коммерче-

ским антигеном (ЗАО «Вектор-БЕСТ», п. Кольцово, Россия) и конъюгатом (белок А, меченный пероксидазой) [2, 5]. Для выявления антител к токсоплазме (Toxoplasma gondii) использовали коммерческий набор для ИФА (ЗАО «Вектор-БЕСТ», п. Кольцово, Россия).

Результаты и обсуждение. Начиная с 2000 года, нами проводится мониторинг некоторых инфекционных и инвазионных зоонозов в малоизученных популяциях млекопитающих.

Проведена серологическая индикация с помощью иммуноферментного анализа возбудителей инфекционных и инвазионных заболеваний у белых медведей арктического побережья России. Материал (сыворотка крови) был предоставлен РОО Совет по морским млекопитающим, собран в 2016 году в рамках Программы изучения белого медведя в Российской Арктике. Было выявлено наличие антител к следующим патогенам: комплексу бруцелл (Brucella abortus, B. melitensis, B. suis); комплексу микобактерий туберкулезного комплекса (Mycobacterium tuberculosis complex); токсоплазме (Toxoplasma gondii); иерсении; аспергилла; альфа- герпесвирусы (на примере вируса Варицелла-зостер), гамма- герпесвирусы (на примере вируса Эпштейн-Барр); описторхи, клонорхи; аскариды; возбудители анизакидоза, цистицеркоза, трихинеллёза. Показано отсутствие антител к микоплазмам (Mycoplasma hominis, Mycoplasma pneumoniae); хламидии. Наибольшее количество положительных сывороток было к аскаридам (89%), возбудителям анизакидоза (89%), токсоплазме (78%), трихинеллам (67%), что несомненно говорит о значительной распространенности указанных патогенов среди белых медведей и подтверждает постулат, что возбудители инвазионных заболеваний чаще встречаются в популяциях хищников.

Инфекционные болезни-это один из многочисленных факторов, которые могут влиять на популяции ондатры. Ондатры находятся в очень тесном контакте с мигрирующими водно-болотными птицами, используя те же водоемы для кормления. Дикие водоплавающие и околоводные птицы являются основным природным резервуаром вирусов гриппа. Проводя анализ назальных мазков от ондатры Чановской озерной системы, мы выделили вирус гриппа А подтипа H2N2. H2N2 известен как подтип, который вызвал пандемию в 1957-1958 гг. Таким образом,

было важно оценить патогенный потенциал нового вируса. Филогенетический анализ показал, что вирус принадлежит к Евразийской группе птичьих вирусов гриппа. Результаты показывают, что вирус гриппа А/ондатра/Россия/63/2014 (H2N2) может размножаться в перевиваемых клетках млекопитающих без предварительной адаптации, но не вызывает заболевания при экспериментальном заражении у мышей. Дополнительно, мы показали наличие антигенов омской геморрагической лихорадки в материале.

В результате проведения мониторинга, у каспийских тюленей в 2000 – 2012 годах, было выявлено наличие антител к комплексу бруцелл (до 75% в 2000 году) и морбилливирусам (до 64% в 2001 году). Серопозитивных к токсоплазме сывороток не обнаружено [6]. Выделено и идентифицировано 2 штамма вируса гриппа типа А, относящихся к низкопатогенному субтипу H4N6. Показана циркуляция вируса гриппа типа А субтипа H4N6 на территории Каспийского моря среди тюленей в течение длительного времени (начиная как минимум с 2002 года). Выделенные штаммы вируса наиболее близки к вирусам гриппа, выделенным от птиц [7].

Обезьяны различных видов часто используются для экспериментального изучения важнейших проблем теоретической и практической медицины. Обезьяны подвержены бактериальным, вирусным и паразитарным заболеваниям, которые являются общими и для людей. Помимо этого, они являются естественными хозяевами некоторых инфекционных агентов, опасных для человека. Всего был проанализирован материал от 234 животных. Среди исследуемых обезьян присутствовали представители шести видов трех семейств обезьян: мартышковые, цепкохвостые, игрунковые. Обезьяны завозились из Западной Африки, Южной Америки, Южной Азии. Несмотря на то что было обследовано более двухсот животных нами не были обнаружены возбудители исследуемых инфекционных заболеваний или антитела к ним [1]. У нескольких представителей саймири фиксировались повышенные значения антител к микобактериям туберкулеза, но полученные значения не были статистически значимыми.

Был проанализирован материал (сыворотка или плазма крови) собранный в 2001-2006 гг. в северо-западной части Тихого океана от

602 щенков сивучей. Иммуноферментный анализ показал наличие антител к токсоплазме у 161 животного (27%), к морбилливирусам у 57 (9%) и к комплексу бруцелла у 39 (6%). Нами зарегистрированы чрезвычайно высокие показатели распространения специфических антител к токсоплазме. Так, в 2003 г. среди 197 отобранных проб серопозитивными оказались 90 (45,7%). Подобные высокие показатели распространения антител к токсоплазме свидетельствуют об активной и масштабной циркуляции данного паразита в популяциях морских млекопитающих различных акваторий [5]. При оценке наличия антител к герпесвирусам, были получены положительные значения в 13,5% сывороток к альфагерпесвирусам и 12,4% сывороток к гаммагерпесвирусам. Полученные данные подтверждают циркуляцию герпесвирусов в популяциях сивучей Большой гряды Курильских островов, а также острова Тюлений, однако это утверждение не поддаётся детализации до тех пор, пока эти вирусы не будут изолированы и охарактеризованы

Проведен анализ сывороток крови 74 афалин, отловленных в 2002-2007 гг. в акватории Черного моря. Чаще всего встречались животные с наличием антител к токсоплазме – 53%. Количество афалин с наличием антител к бруцеллам и морбилливирусам составило 23% и 20% соответственно [3, 5]. Наличие токсоплазмы в морских млекопитающих является экологическим показателем загрязнения океанской среды и прибрежных вод ооцистами этого протозойного паразита [8]. Таким образом, косвенно была установлена циркуляция токсоплазм, бруцелл и морбилливируса в популяции черноморской афалины. Учитывая, что морбилливирус вызывает массовую гибель, а токсоплазмы и бруцеллы фатально действуют на репродуктивную систему животных, мы считаем, что наряду с другими факторами, указанные патогены могут являться одной из причин, влияющих на численность черноморской афалины.

Была выполнена работа по серологическому мониторингу циркуляции патогенов у белух Охотского моря. Были проанализированы сыворотка или плазма крови, собранные в 2002-2014 гг. от 307 животных. Морбилливирус-специфичные антитела были обнаружены у 30 (10%) белух. Количество серопозитивных особей белух по отношению

к бруцеллам составило 65 (21%). Специфичные к токсоплазме антитела были выявлены у 16 (5%) белух [2, 4]. Также были выявлены антитела к микобактериям туберкулезного комплекса и комплексу описторхов (описторхи и клонорхи) у 10.6% и 11.3% животных соответственно. В 2011-2014 годах список возбудителей был расширен и дополнительно был проведен серологический мониторинг антител к герпесвирусам с разделением на антитела к альфа-герпесвирусам и гамма-герпесвирусам. Из проанализированной сыворотки крови от 97 животных у 11 были обнаружены антитела к альфа-герпесвирусам, у 17 были обнаружены антитела к гамма-герпесвирусам.

Заключение. Таким образом, начиная с 2000 года, нами проведено исследование циркуляции некоторых патогенов в малоизученных резервуарах млекопитающих, таких как белые медведи, ондатра, тюлени, сивучи, афалины, белуха и некоторых других. Постоянно оценивалось наличие антител в сыворотке крови к токсоплазме, морбилливирусам и комплексу бруцелл. К настоящему моменту изучаемый спектр возбудителей заболеваний расширился. Начаты исследования наличия антител к комплексу описторхов-клонорхов, микобактериям туберкулезного комплекса, микоплазмам, хламидиям, иерсениям, аспергиллам, альфа- герпесвирусам (на примере вируса Варицелла-зостер), гамма- герпесвирусам (на примере вируса Эпштейн-Барр), аскаридам; возбудителям анизакидоза, цистицеркоза, трихинеллёза. В случае возможности получения другого материала для анализа (мазки, патологический материал и пр.) проводится выделение и изучение свойств возбудителей вирусных заболеваний. Изучение циркуляции указанных выше возбудителей инфекционных и инвазионных заболеваний представляет несомненный интерес в связи с их потенциальной опасностью для человека и сельскохозяйственных животных. Циркулируя в малоизученных резервуарах, патоген может адаптироваться к другим млекопитающим, повысить свою вирулентность, изменить биологические свойства. Многолетнее изучение одного или однотипного резервуара позволяет делать оценки по динамике циркуляции зоонозных патогенов и проводить анализ не только вероятности опасности для человека и сельскохозяйственных животных, но и антропогенного влияния – влияния деятельности человека на популяцию животных.

Авторы благодарят за сотрудничество Болтунова А.Н., Семенову В.С. (Региональная общественная организация «Совет по морским млекопитающим», Москва, Россия), Розанову Е.И., Абрамова А.В., Мухаметова Л.М, Шпак О.В., Русскову О.В., Глазова Д.М., Рожнова В.В. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова» Российской академии наук, Москва, Россия), Бурканова В.Н. (Камчатский филиал ФГБУН Тихоокеанского института географии ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский, Россия), Кузнецова В.А., Шипулина С.В. (Федеральное государственное унитарное предприятие «Каспийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства», Астрахань, Россия).

Работы с материалом от каспийского тюленя были выполнены при поддержке РФФИ проект 17-04-01919 А.

Литература

1. Алексеев А.Ю., Баранов А.В., Рихтер В.А., Шестопалов А.М. Оценка наличия инфекционных заболеваний у обезьян, завозимых в Россию // Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии: Материалы третьей международной научной конференции. – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», 2016. – С. 168-176.
2. Алексеев А.Ю., Регузова А.Ю., Розанова Е.И., Абрамов А.В., Туманов Ю.В., Кувшинова И.Н., Шестопалов А.М. 2009. Выявление специфических антител к морбилливирусам, бруцелле и токсоплазме у черноморской афалины Tursiops truncatus ponticus и белухи Delphinapterus leucas из Охотского моря в 2002-2007 годах // Биология моря – 2009. – Т.35, №6. – С. 440-444.
3. Алексеев А.Ю., Розанова Е.И., Устинова Е.Н., Туманов Ю.В., Кувшинова И.Н., Шестопалов А.М. Антитела к морбилливирусам, бруцелле и токсоплазме у черноморских афалин Tursiops truncatus ponticus, содержащихся в неволе // Биология моря – 2007. – Т.33, №6. – С. 465-468.
4. Алексеев А.Ю., Сивай М.В., Русскова О.В., Глазов Д.М., Шпак О.В., Мухаметов Л.М., Рожнов В.В., Шестопалов А.М. Выявление специфических антител к морбилливирусам, бруцеллам, токсоплазме у белух (Delphinapterus leucas) Охотского моря в 2007-2009 гг. // Морские млекопитающие Голарктики: Материалы 6-й международной конференции (Калининград, Россия, 11-15 октября 2010 г.). – Калининград: Капрос, 2010. – С. 27–29.

5. Алексеев А.Ю., Устинова Е.Н., Туманов Ю.В., Засыпкин М.Ю., Бурканов В.Н., Кувшинова И.Н., Шестопалов А.М. Выявление специфических антител к морбилливирусам, токсоплазмам и бруцеллам у сивучей северо-запада Тихого океана // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии – 2008. – №1. – С. 63-65.
6. Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М. Риск-ориентированный мониторинг зоонозов у морских млекопитающих // Морские млекопитающие Голарктики: Сборник научных трудов по материалам IX международной конференции. – 2017. – С. 28-32.
7. Гуляева М.А., Алексеев А.Ю., Шаршов К.А., Сивай М.В., Шестопалов А.М., Шестопалова Л.В. Морфологические изменения в тканях легкого у мышей линии Balb/C при экспериментальном инфицировании вирусом гриппа птиц H4N6, выделенном от каспийского тюленя (Phoca caspica) // Ветеринарная патология – 2016. Т.57, №3. – С. 11-17.
8. Jardine J.E., Dubey J.P. Congenital toxoplasmosis in a Indo-Pacific bottlenose dolphin (Tursiops aduncus) // Journal of Parasitology – 2002. – V.88, N1. – P. 197–199.
9. Gibbs AJ, Armstrong JS, Downie JC. From where did the 2009 ‘swine-origin’ influenza A virus (H1N1) emerge // Virology Journal – 2009. – V.24, N6. – P. 207.
10. Woo TM. 2009 H1N1 influenza pandemic // Pediatric Health Care – 2010. – V.24, N.4. – P. 258-266.

ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В СУБТРОПИЧЕСКОЙ ЗОНЕ РОССИИ

Ткаченко Е.А.[1], Ишмухаметов А.А.[1], Дзагурова Т.К.[1], Курашова С.С.[1], Баловнева М.В.[1], Мутных Е.С.[1], Морозов В.Г.[2], Юничева Ю.В.[3], Пиликова О.М.[4], Завора Д.Л.[5], В.А.Бахтина[6], Городин В.Н.[6]

[1]ФГБНУ "Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова РАН", ФАНО России, Москва, Россия;

[2]ООО Медицинская компания "Гепатолог", Самара, Россия;

[3]Сочинское противочумное отделение ФКУЗ ППЧС Роспотребнадзора, Сочи, Россия;

[4] ФКУЗ "Причерноморская ПЧС" Роспотребнадзора, Новороссийск, Россия;

[5]ГУЗ «Инфекционная больница №2» ДЗ Краснодарского края, Сочи, Россия;

[6]ГБУЗ "Специализированная клиническая нфекционная больница"департамента здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Россия.

E-mail для контактов: evgeniytkach@mail.ru

Резюме

За период с 2000 по 2016 годы было выявлено 72 больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, этиологически обусловленной хантавирусом Сочи. Больные проживали в 36 населённых пунктах 10 административных районов Краснодарского края. Сравнительный анализ клинико-лабораторных и эпидемиологических данных больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, вызванной хантавирусами Сочи, Куркино и Пуумала позволил выявить отличия клинических (частота регистрации и выраженность ряда симптомов, тяжесть течения и летальность) и эпидемиологических (заболеваемость сельских и городских жителей, профессиональный состав, сезонность заболевания, условия заражения) проявлений.

Установлена этиологическая и эпидемиологическая значимость вируса Сочи, который вызывает ежегодную спорадическую заболеваемость геморрагической лихорадкой с почечным синдромом на территории субтропической зоны Краснодарского края. Случаи геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, обусловленной этим вирусом, отличаются более тяжелым течением болезни и высокой летальностью по сравнению с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, вызываемой вирусами Пуумала и Куркино на территории центральных областей Европейской части России.

Ключевые слова: хантавирус Сочи, хантавирус Куркино, хантавирус Пуумала, симптом.

HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN SUBTROPICAL ZONE OF RUSSIA

Tkachenko E.A.[1], Ishmukhametov A.A.[1], Dzagurova T.K.[1], Kurashova S.S.[1], Balovneva M.V.[1], Mutnih E.S.[1], Morozov V.G.[2], Yunicheva Yu.Yu.[3], Pilikova O.M.[4], Zavora D.L.[5], Bakhtina V.A.[6], Gorodin V.N.[6]

[1]Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences", Moscow, Russia;
[2]LLC Medical Company "Hepatolog", Samara, Russia; [3]Sochi Antiplague Department, Sochi, Russia;
[4] Plague Station, Novorossiysk, Russia;
[5] Hospital of Sochi city, Sochi, Russia;
[6]Infectious Disease Hospital, Krasnodar, Russia.

Abstract

During the period of 2000 – 2016 it was identified 72 patients with hemorrhagic fever with renal syndrome, caused by the Sochi hantavirus. The patients were residents of 36 settlements of 10 administrative districts of the Krasnodar area.

A comparative analysis of clinical, laboratory and epidemiological data of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome, caused by Sochi,

Kurkino and Puumala viruses revealed differences between the clinical and epidemiological manifestations.

Etiological and epidemiological importance Sochi virus was established. Sochi virus causes sporadic annual incidence of hemorrhagic fever with renal syndrome in the subtropical zone of Krasnodar area. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by the Sochi virus is more severe disease and high lethality in comparison with the other two forms of hemorrhagic fever with renal syndrome caused by Puumala and Kurkino viruses in the central regions of European part of Russia.

Key words: hantavirus Sochi, hantavirus Kurkino, hantavirus Puumala, symptom.

Введение. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острая вирусная, природноочаговая, зоонозная инфекция человека представляет серьезную проблему в связи с широким распространением, тяжестью болезни, отсутствием эффективных средств этиотропной терапии и специфической профилактики. Заболевание характеризуется цикличным течением, синдромом интоксикации, системным поражением мелких сосудов, своеобразным поражением почек (интерстициальный нефрит) с развитием острой почечной недостаточности (ОПН).

Источником заражения людей являются дикие грызуны – носители хантавирусов – возбудителей ГЛПС. Основным путем заражения людей является аэрогенный (воздушно-пылевой путь), при котором вирус, содержащийся в биологических выделениях грызунов, в виде аэрозоля попадает через верхние дыхательные пути в легкие человека, а затем с кровью переносится в другие органы и ткани. Заражение так же может происходить путем непосредственного контакта поврежденных кожных покровов или слизистых с экскрементами инфицированных грызунов или со слюной в случае покуса зверьком человека. Более 97% от общего числа случаев ГЛПС регистрируются в европейских и около 3% – в азиатских регионах России, главным образом, на Дальнем Востоке [1].

К настоящему времени существенно изменилось сложившиеся прежде представления об этиологической природе заболеваний ГЛПС на

Европейской части России, когда все случаи заражения ГЛПС связывали только с хантавирусом Пуумала. В последние годы было обнаружено существование нового для России хантавируса Добрава/Белград, который ранее ассоциировали лишь с заболеванием людей ГЛПС на территории бывшей Югославии [2,3].

Хантавирус Добрава/Белград объединяет 4 генотипа Добрав, Саарема, Куркино и Сочи, отличающихся по иммунологическим, молекулярно-генетическим и экологическим (принадлежность их резервуарных хозяев к разным видам грызунов) характеристикам [4].

Природные очаги ГЛПС, этиологически обусловленной ранее неизвестными в России вирусами генотипов Куркино и Сочи были выявлены в областях Центральной России [5] и в субтропической зоне Краснодарского края [6,7], соответственно. Резервуарными хозяевами вирусов генотипов Куркино и Сочи в природе и источниками заражения людей являются западный подвид полевой мыши, *Apodemus agrarius agrarius* и кавказская лесная мышь, *Apodemus ponticus*, соответственно.

В настоящем сообщении представлены результаты этиологических и клинико-эпидемиологических исследований ГЛПС, вызываемой генотипом Сочи, в основном, в субтропической зоне (Большой Сочи) и в некоторых других районах Краснодарском крае, а также сравнительный анализ полученных данных с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, обусловленной генотипом Куркино в областях Центрального Черноземья и вирусом Пуумала в областях Поволжья.

Целью работы было проведение сравнительного анализа этиологических и клинико-эпидемиологических особенностей ГЛПС, вызываемой вирусами Сочи, Куркино и Пуумала.

Материалы и методы исследований. За период с 2000 по 2016 гг. были собраны и исследованы на присутствие специфических антител к хантавирусам сыворотки крови от 867 больных с острой лихорадкой.

Серологические исследования. Первичный скрининг сывороток проводили непрямым методом иммунофлуоресценции (МФА) с использованием коммерческого диагностикума “Культуральный поливалентный диагностикум ГЛПС для непрямого МФА” производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П.Чумакова РАН» по стандартной методике

производителя. Для серотипирования положительных сывороток крови больных ГЛПС применяли МФА с моновалентными культральными антигенами вирусов Пуумала (ПУУ), Хантаан (ХТН), Сеул (СЕУ) и Добрава/Белград (ДОБ/БЕЛ) [8] и реакцию нейтрализации с вирусами Пуумала, Хантаан, Сеул и штаммами 3-х генотипов вируса Добрава/Белград: Сочи (штамм Ар1584/Сочи-01 изолирован от кавказской лесной мыши *A.ponticus)*, Куркино (штамм Аа1854/Липецк-02 изолирован от полевой мыши *A. agrarius*) и Добрава (штамм Bel-1 изолирован от больного ГЛПС в Словении). Вируснейтрализующие антитела определяли в соответствии с описанным ранее методом выявления фокус образующих единиц (ФОЕ) [9].

Клинические и эпидемиологические данные были собраны от 72 больных ГЛПС, инфицирование которых вирусом Сочи было подтверждено иммунологическими методами. Распределение больных по степени тяжести проводили на основе классификации [10], основанной на выраженности основных клинических синдромов болезни. К легкой форме относили пациентов с незначительной интоксикацией, температурой тела не выше 38°С, умеренным уменьшением диуреза, нормальными показателями мочевины, повышением креатинина крови до 130 мкмоль/л, нормоцитозом, незначительной протеинурией, микрогематурией. К группе со среднетяжелыми формами болезни относили пациентов с выраженной интоксикацией, температурой тела до 39,50С, умеренно выраженным геморрагическим синдромом, олигурией 300-900 мл в сутки, мочевиной 8,5-19 ммоль/л, креатинином 131-299 мкмоль/л, лейкоцитозом 8,0-14,0 х 10^9л, протеинурией, микрогематурией. Как тяжелое, заболевание расценивалось при значительно выраженной интоксикации, с температурой тела выше 39,5С, геморрагическим синдромом, уремией, суточным диурезом менее 300 мл, мочевиной выше 19 ммоль/л, креатинином выше 300 мкмоль/л, лейкоцитозом выше 14,0 х 109л, выраженной протеинурией, микро- и макрогематурией.

Выраженность и длительность клинико-лабораторных проявлений инфекции оценивалась в зависимости от степени тяжести и периода болезни, а так же этиологической обусловленности заболевания хантавирусами Добрава/Белград и Пуумала. Статистическую обработку клинико-лабораторных данных проводили с помощью методов пара-

метрической статистики. Достоверность различий выборочных совокупностей оценивались по критериям Стьюдента- Фишера и Вилкоксона. Достоверность их корреляции определялась по коэффициенту корреляции.

Результаты и их обсуждение. Первый серологически подтверждённый случай заболевания ГЛПС в Краснодарском крае был выявлен нами весной 2000 г. Больная С. 58 лет поступила в БИТ нефроцентра из АРО КМЛДО г. Краснодара на 8 день болезни с диагнозом: Системная вирусная инфекция. Сепсис? Вторичный гипотиреоз. В связи с наличием болей в животе и сомнительных перитонеальных симптомов была выполнена диагностическая лапароскопия, которая сопровождалась значительной кровопотерей (около 2 *л*), при этом острой хирургической патологии выявлено не было. Тяжесть заболевания определялась выраженным геморрагическим синдромом (обширные подкожные гематомы, кровотечение в местах инъекций, массивное кровотечение из эрозии задней стенки трахеи после экстубации), респираторным дистресс-синдромом, ОПН с последующим развитием отёка головного мозга и мозговой комы. После обнаружения в крови больной хантавирусных антител и их идентификации с помощью иммунологических методов клинический диагноз был изменён на ГЛПС. Больная за 2 недели до заболевания находилась в санатории, расположенном в окрестности посёлка Горячий Ключ, в 100 км южнее города Краснодара, где вероятнее всего и произошло инфицирование.

В результате исследования образцов суспензий лёгочной ткани от 6 кавказских лесных мышей (*Apodemus ponticus*), отловленных на территории, прилегающей к санаторию в пос. Горячий ключ, методом прямого иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческой тест- систем «Хантагност» производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П.Чумакова РАН», у одной из 6 особей был обнаружен хантавирусный антиген.

Молекулярно-генетические исследования (ПЦР и секвенирование) крови больной на 12-й день от начала заболевания и антиген положительного образца лёгочной ткани кавказской лесной мыши позволили идентифицировать новый, ранее не известный в России вирус, который впоследствии, после выделения штаммов этого вируса в клетках Vero-E6, был типирован как генотип Сочи хантавируса Добрава/Белград [10].

За период с 2000 по 2016 годы в результате первичного скрининга сывороток крови 867 больных с острой лихорадкой и последующего серотипирования сывороток с хантавирусными антителами, было выявлено 72 больных ГЛПС, этиологически обусловленной вирусом Сочи (ГЛПС-Сочи). Больные проживали в 36 населённых пунктах 10 административных районов Краснодарского края: Адлерский р-н – 5, Хостинский р-н – 2, Центральный р-н – 5, Лазаревский р-н – 29, Геленджикский р-н – 20 больных, Анапский р-н – 1, Крымский р-н – 3; Горячий ключ – 1, Мостовской р-н – 2, город Новороссийск – 4. Более чем за месяц до заболевания никто из больных ГЛПС-Сочи за пределы Краснодарского края не выезжал. Таким образом, была установлена спорадическая заболеваемость ГЛПС на территории, которая ранее не считалась эндемичной по этой инфекции.

Сравнительный анализ клинико-лабораторных данных больных ГЛПС-Сочи из Краснодарского края, ГЛПС-Куркино из областей Центрального Черноземья и ГЛПС-Пуумала из Самарской области позволил выявить ряд отличий клинического течения инфекции, касающихся частоты регистрации и выраженности ряда синдромов и симптомов болезни. В анализ было включено 42 пациента ГЛПС- Сочи, информацию о клиническом течении болезни которых удалось собрать достаточно подробно. В качестве предварительных диагнозов выступали различные заболевания почек (острый нефрит, острый гломерулонфрит, мочекаменная болезнь, острая почечная недостаточность), заболевания брюшной полости (гастроэнтерит, язвенная болезнь желудка, панкреатит, аппендицит), заболевания легких (бронхит, пневмония), гинекологические заболевания (аднексит), различные отравления (отравление грибами, солями тяжелых металлов), другие инфекционные заболевания (ОРВИ, острая кишечная инфекция, лептоспироз, ККГЛ, ангина), иногда ставился диагноз лихорадка неясной этиологии. Окончательное установление диагноза ГЛПС оказывалось возможным лишь после специфической диагностики, иногда посмертно.

В большинстве случаев больные ГЛПС-Сочи поступали в стационары уже в тяжелом состоянии и окончательный анализ распределения по степеням тяжести показал двукратное преобладанием тяжёлых форм при ГЛПС-Сочи по сравнению с ГЛПС-Пуумала и ГЛПС-Куркино, 59,7 %,

24,0 % и 26,9 % соответственно. При ГЛПС-Пуумала и ГЛПС-Куркино заболевание протекало преимущественно в среднетяжелой (52,0 % и 38,5 %) и легкой (24,0 % и 34,6 %) формах. При ГЛПС-Сочи только у одного пациента болезнь имела легкое течение (1,6%).

Такие клинические признаки ГЛПС, как острое начало с повышением температуры тела, головная боль, общая слабость, тошнота, рвота, появление на 3-4 день от начала заболевания болей в пояснице и животе, присутствовали во всех трёх группах. При этом у больных с ГЛПС-Сочи и ГЛПС-Куркино значительно реже по сравнению с ГЛПС-Пуумала регистрировались такие патогномоничные для ГЛПС симптомы, как нарушение зрения и жажда. Обращает на себя внимание, что у большинства больных ГЛПС-Сочи отмечали признаки поражения желудочно-кишечного тракта в виде болей в животе, тошноты, рвоты и диареи. У больных ГЛПС-Сочи значительно чаще, чем у больных ГЛПС-Куркино и ГЛПС-Пуумала фиксировалось увеличение печени, у 3 пациентов наблюдалась желтуха. Особенно обращает на себя внимание тот факт, что у больных ГЛПС- Сочи значительно чаще регистрировались геморрагические проявления. Почти у половины пациентов наблюдались субсклеральные кровоизлияния, у 8 больных развился ДВС-синдром с признаками желудочно-кишечного кровотечения у 3 пациентов. Достаточно редко у больных ГЛПС-Сочи фиксировалась полиурия, которая наблюдается у большинства больных со среднетяжелым и тяжелым течением ГЛПС-Пуумала. При исключении причин, обусловленных недостаточным мониторингом, возможно это обстоятельство можно отнести к особенностям течения ГЛПС, вызываемой хантавирусным типом Сочи.

При сравнительном анализе лабораторных показателей крови и мочи обращает на себя внимание разница в частоте развития лейкопении: ГЛПС- Сочи у 33% пациентов, ГЛПС-Куркино – 12% и ГЛПС-Пуумала – 0%. Кроме того у больных ГЛПС-Сочи редко развивалась изогипостенурия (5% больных), о этого считавшаяся патогномоничным признаком ГЛПС.

Достоверных отличий в частоте развития осложнений и показателей летальности в группах пациентов ГЛПС-Пуумала и ГЛПС-Куркино обнаружено не было. Отличительной особенностью случаев ГЛПС-Сочи

былатяжесть клинического течения и высокая летальность. Всего в период с 2000 по 2016 гг. зарегистрировано 9 летальных случаев ГЛПС, где этиологическим агентом болезни был хантавирус Сочи. В шести из семи летальных случаев дебют болезни сопровождался желудочно-кишечными расстройствами, маскировавшими другие симптомы ГЛПС. Несмотря на проводимое лечение, в основном симптоматическое, состояние больных прогрессивно ухудшалось. Больные умирали на фоне полиорганной недостаточности (почечная, кардиоваскулярная, дыхательная недостаточность, ДВС-синдром, отек легких, отек мозга). На вскрытии определяли множественные геморрагии внутренних органов, явления геморрагического гатроэнтероколита (в 5 случаях), отек легких, отек мозга, двусторонний гидроторакс (в 2-х случаях), кровоизлияние в гипофиз, кортикальный некронефроз.

Возможные ошибки врачей на этапах ранней и дифференциальной диагностики ГЛПС, а так же при ведении данных пациентов могли быть обусловлены отсутствие должного опыта у местных клиницистов в отношении редко встречавшейся прежде болезни. Вместе с тем столь высокая доля тяжелых форм с развитием угрожающих жизни осложнений, вероятно, является особенностью клинического течения ГЛПС, вызываемой вирусом Сочи.

Сравнительный эпидемиологический анализ заболеваемости ГЛПС-Сочи, ГЛПС-Пуумала и ГЛПС-Куркино выявил ряд различий принципиального характера. Так, сельские жители от общего числа больных ГЛПС-Пуумала составляли – 31%, ГЛПС-Куркино 93,4%. Больные ГЛПС-Сочи в подавляющем большинстве проживали в сельской местности или в одно-двух этажных домах частной застройки.

Заболеваемость ГЛПС-Пуумала характеризовалась постепенным нарастанием с апреля по октябрь, затем снижением до конца ноября. Напротив, все больные ГЛПС-Куркино регистрировались в промежутке между ноябрем и мартом с наивысшим подъемом заболеваемости в декабре (47,6%) и январе (44,9%). В районах Большого Сочи, как и в целом по Краснодарскому краю, наибольшее количество случаев ГЛПС-Сочи было выявлено в октябре-ноябре. Остальные случаи, практически, равномерно, распределялись по другим месяцам. Среди больных всех трёх типов чаще заболевали мужчины: ГЛПС- Куркино – 79,5%,

ГЛПС-Сочи – 77,4% и ГЛПС-Пуумала – 68,3%; преобладали лица наиболее трудоспособного возраста – от 20 до 40 лет. Довольно высокий процент среди заболевших ГЛПС-Сочи составляли дети в возрасте до 17 лет (11,3%), включая 2-х больных в возрасте 7 лет и по 1 больному в возрасте 10, 13, 15, 16 и 17 лет). В то же время среди больных ГЛПС-Пуумала и ГЛПС- Куркино дети составляли 5,1% и 5,4%, соответственно. Причины существенной зависимости заболеваемости ГЛПС от пола остаётся не выясненной, как и преимущественная регистрация тяжёлых форм ГЛПС-Сочи у мужчин (66,7%) по сравнению с женщинами (35,7%).

Анализ результатов зоологических и эпизоотологических исследований, полученных в очагах ГЛПС-Пуумала, ГЛПС-Куркино и ГЛПС-Сочи, показал, что эпидемическому неблагополучию предшествовало увеличение численности основных хозяев – рыжей полёвки, полевой мыши и кавказской лесной мыши, соответственно.

Заключение. Установлены клинико-эпидемиологические различия ГЛПС, этиологически обусловленной разными видами хантавирусов. Для большинства случаев ГЛПС-Сочи было характерным наличие симптомов поражения желудочно-кишечного тракта, что во многом определяло сложности дифференциальной диагностики болезни и позднее назначение специалистами серологических исследований, направленных на раннюю специфическую диагностику ГЛПС.

Более тяжелое клиническое течение заболевания ГЛПС-Сочи, обусловлено, вероятно, более высокой вирулентностью вируса, циркулирующего в Причерноморье. Вместе с тем, отсутствие должного опыта у местных клиницистов в отношении редко встречавшейся прежде болезни вызывало значительные трудности дифференциальной диагностики ГЛПС и могло послужить причиной ошибок в ведении таких пациентов.

Таким образом, в настоящее время можно говорить о существовании натерритории Европейской части России, по крайней мере, трёх этиологически, эпидемиологически и клинически различающихся нозологических форм хантавирусной инфекции. Возбудители этих трёх нозологических форм ГЛПС – вирусы Пуумала, Куркино и Сочи, иммунологически и генетически значительно отличающиеся друг от друга,

поддерживают своё существование в природе посредством трёх разных видов мышевидных грызунов – рыжей полёвки, полевой мыши и кавказской лесной мыши, соответственно, являющихся источниками инфекции для людей.

Литература

1. Е.А.Ткаченко, А.Д.Бернштейн, Т.К.Дзагурова, В.Г.Морозов, Р.А.Слонова, Л.И. Иванов и др. Актуальные проблемы современного этапа изучения геморрагической лихорадки с почечным синдромом в России // ЖМЭИ – 2013. – № 1. – С. 51-58.
2. Avsic-Zupanc,T., Toney A., Anderson K. et al. Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the Hantavirus genus, family Bunyaviridae // J.Gen.Virol. – 1995. – 76. P. 2801-2808.
3. Gligic A., Dimkovic N., Xiao S.Y., Buckle G.J., Jovanovic D., Velimirovic D., et al. // J Infect Dis. – 1992. – 166, 1. – P. 113-120.
4. Klempa B., T.Avsic-Zupanc, J.Clement, T.K. Dzagurova, H.Henttonen, F.Jakab et al. Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: definition of genotypes and their characteristics // Arch Virol. – 2013. – 158. P. 521-529.
5. Е.А. Ткаченко, А.Д.Бернштейн, Т.К.Дзагурова, В.Н.Башкирцев и др. Сравнительный анализ эпидемических вспышек геморрагической лихорадки с почечным синдромом, вызванных вирусами Пуумала и Добрава/Белград. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2005; 4: 28-34.
6. Ткаченко Е.А., Н.М. Окулова, Ю.В. Юничева, С.П.Морзунов, С.Ф.Хайбулина, Т.Е. Рябова, и др. Эпизоотологические и вирусологические особенности природного очага хантавирусной инфекции в субтропической зоне Краснодарского края. Вопр. вирусол. 2005; 3: 14-19.
7. T.K. Dzagurova, P.T. Wilkowski, E.A. Tkachenko, B. Klempa, V.G. Morozov, B. Auste et al. Isolation of Sochi virus from a fatal case of hantavirus disease with fulminant clinical course. Clin Infect Dis. 2012; 54 (1) : 1-4.
8. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Юничева Ю.В., Морозов В.Г., Брюханов А.Ф., Башкирцев В.Н. и др. Обнаружение и клинико-этиологическая характеристика ГЛПС в субтропической зоне Краснодарского края. ЖМЭИ, 2008; 1: 12-16.
9. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Башкирцев В.Н. Окулова Н.М., Апекина Н.С., Бернштейн А.Д. и др. Выделение и идентификация штаммов хантавирусов-возбудителей ГЛПС в европейской части России. Медицинская вирусология. 2008; (XXV): 142-150.
10. Рощупкин В.И., Суздальцев А.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. – Саратов: Изд-во Саратовского университета. 1990. – 102 с.

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОТ-ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ КАРИДИОВИРУСОВ ГРУППЫ А

Калайджян А.А., Агумава А.А., Вышемирский О.И., Лапин Б.А.
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт медицинской приматологии", Сочи, Россия
aslan39@yandex.ru

Резюме

Коммерческие ПЦР тест системы для детекции вируса энцефаломиокардита у обезьян отсутствуют. ПЦР с использованием структур праймеров взятых из ряда статей при детекции вируса энцефаломиокардита в биоматериалах, взятых от погибших обезьян во время вспышки острого миокардита вирусной этиологии не дали положительного результата (видимо по причине вариабельности вирусных штаммов). Для достоверной диагностики вируса энцефаломиокардита была разработана ОТ-ПЦР тест-система с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени. Путём сравнительного выравнивания полногеномных нуклеотидных последовательностей вирусов энцефаломиокардита группы А найден консервативный регион. К данному региону были разработаны олигонуклеотиды-праймеры и олигонуклеотидный зонд. Подобраны все условия проведения ОТ-ПЦР реального времени, включая температурный профиль и концентрации компонентов реакции. Показана специфичность тест-системы.

Ключевые слова: полногеномные сиквенсы, вирус энцефаломиокардита, полимеразно-цепная реакция, гибридизационно-флюоресцентная детекция, выравнивание сиквенсов, консервативный участок, олигонуклеотидные зонды.

DEVELOPMENT OF THE EXPERIMENTAL REAL-TIME PCR TEST SYSTEM FOR DETECTION OF THE VIRUSES OF THE CARDIOVIRUS-A SPECIES

Kalaydzhyan A. A., Agumava A. A., Vyshemirskii, O. I., Lapin B.A.
Federal state budgetary scientific institution "Scientific-research Institute of medical Primatology", Sochi, Russia
aslan39@yandex.ru

Abstract

Commercial PCR test systems for the detection of the virus of encephalomyocarditis in monkeys are not available. PCR using primers from a number of articles did not give a positive result in the detection of the virus of encephalomyocarditis in bioprobes taken from monkeys in the outbreak of acute myocarditis of viral etiology (apparently due to variability viral strains). For validation of diagnosis of the encephalomyocarditis virus infection, an RT-PCR test system with fluorescence detection was developed. By alignment of the full-length nucleotide sequences of the encephalomyocarditis-A a conservative region was found. Oligonucleotide primers and oligonucleotide probes were developed for this region. All conditions for RT-PCR, including the temperature profile and concentrations of the reaction components, were matched. The specificity of the test system was shown.

Key words: whole genome sequence, Encephalomyocarditis virus, polymerase chain reaction, hybridization fluorescence detection, the alignment of the sequences, conservative region, oligonucleotide probes

Введение Вирус энцефаломиокардита (ВЭМК) – одноцепочечный РНК+ вирус, относится к семейству Пикорнавирусов, роду Кардиовирус, виду – Кардиовирус группы А, включает в себя наряду с диабетогенным и недиабетогенным штаммами вируса энцефаломиокардита, вирус Мауса-Эльберфельда, вирус Менго и вирус энцефаломиокардита свиней. ВЭМК был впервые выделен в 1945 году от самца гиббона, живущего в неволе, который внезапно погиб от отека легких и миокардита. У мышей, привитых внутривенно, интраперитонеаль-

но, подкожно, интракраниально, а также интраназально капельно фильтратом отековой жидкости от погибшего гиббона развивались параличи задних конечностей и миокардиты с летальным исходом в течение недели. **[7,9]**

В 1948 году впервые изолировали вирус Менго (названый в честь местности) в районе города Энтеббе, Уганда. Вирус был выделен от живущей в неволе макаки резус, пораженной параличем задних конечностей. В 1949 году в результате перекрестных серологических исследований не было установлено четких отличий между вирусами Менго и ВЭМК, что означало их принадлежность к одному виду. Кроме того, было установлено их родство с вирусом Тейлеровского мышиного энцефаломиелита (ТМЭВ). **[5,10]** Таксономия вируса энцефаломиокардита представлена **на рис. 1.**

ВЭМК представляет большую проблему для зоопарков, питомников и приматологических центров так как вирусная вспышка способна вызвать тяжелые миокардиты с летальным исходом. В 2007 году в одной из вольер с павианами гамадрилами содержащимися в питомнике НИИ медицинской приматологии РАМН имела место вспышка с массовой гибелью обезьян. На аутопсии была выявлена картина острого миокардита. Вирусологические исследования подтвердили вирусную этиологию вспышки. 10% суспензия гомогената тканей миокарда от погибшего павиана прошедшая стерилизующую фильтрацию через микропоры диаметром 0,2 мкм после инокуляции мышам сосункам вызывала у них на вторые сутки характерный паралич. [1,2]

Отсутствие коммерческих диагностических ПЦР тест систем для детекции вируса энцефаломиокардита явилось инициацией настоящей работы.

Целью работы являлась разработка ОТ-ПЦР тест-системы с гибридизационно-флюоресцентным методом детекции в режиме реального времени для диагностики вирусов энцефаломиокардита группы А.

Для решения поставленной цели, были определены следующие задачи:

- поиск и выбор полногеномных нуклеотидных последовательностей энцефаломиокардита группы А;

- выравнивание и поиск консервативных участков нуклеотидной последовательности;

Lineage (full): root; Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Picornavirales; Picornaviridae

- Cardiovirus
  - Cardiovirus A
    - Encephalomyocarditis virus
      - ECM virus
      - Encephalomyocarditis virus 83GR
      - Encephalomyocarditis virus strain emc-b nondiabetogenic
      - Encephalomyocarditis virus strain emc-d diabetogenic
      - Encephalomyocarditis virus strain Rueckert
      - Maus-Elberfeld virus
      - Mengo virus
      - Porcine encephalomyocarditis virus
  - Cardiovirus B
    - Theilovirus
      - Human TMEV-like cardiovirus
      - Rat theilovirus 1
      - Saffold virus
      - Saffold virus 2
      - Sikhote-Alin virus
      - Theiler's encephalomyelitis virus
      - Theiler's-like virus of rats
      - Vilyuisk human encephalomyelitis virus
  - unclassified Cardiovirus
    - Boone cardiovirus
    - Cardiovirus 05VZ
    - Cardiovirus 83GR
    - Cardiovirus BCH133A
    - Cardiovirus BCH350A
    - Cardiovirus BCH533A
    - Cardiovirus Hu/1873/Yamagata/2013
    - Cardiovirus Hu/1881/Yamagata/2012
    - Encephalomyocarditis virus type 2
    - Genet fecal theilovirus
    - Saffold virus 3

Рисунок 1. *Таксономия вирусов группы энцефаломиокардита (обведены штаммы, к которым разрабатывалась ОТ-ПЦР тест-система)*

- разработка праймеров и зондов (меченых красителем FAM и гасителем флюоресценции RTQ1) к выбранной консервативной консенсусной нуклеотидной последовательности;

- подбор температурных параметров и концентраций компонентов ПЦР смеси для проведения реакции.

Методы исследования. Сравнительный анализ, выравнивание нуклеотидных последовательностей, поиск консервативных регионов в

консенсусной последовательности были проведены с использованием пакета программы: BioEdit Sequense Alignment Editor (version 7.0.5.2 Copy-right ©1997-2005) находящейся по адресу http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit в свободном доступе.

Подбор олигонуклеотидов-праймеров и зондов проводился интерактивно по адресу http://primer3.ut.ee/ с помощью программы Premier3web (version 4.0.0)

Экстракцию РНК из биоматериалов (культуральная жидкость, перикардиальная жидкость, и т.д.) проводили модифицированным гуанидинтиоционатным методом с использованием положительно заряженных частиц сорбента для электростатического связывания нуклеиновых кислот (НК). Был применен следующий протокол: 100 мкл биоматериала из которого выделяли РНК переносили в пробирку, содержащую 300 мкл 5М GuSCN, 1% тритон Х100, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ трис-HCl (pH 6,4), добавляли 10 мкл 50% взвеси SiO_2, инкубировали 30 мин. периодически встряхивая на вортексе. **[6]** После инкубации пробирки центрифугировали 30 сек. при 12000 об/мин затем отмывали осадок трехкратно 500 мкл промывочного раствора, содержащего 10 мМ Трис- HCl (pH 7.3), 50 мМ NaCl, 50% этанола. Далее осадок высушивали при 60^0С в течении 5 мин. Затем к осадку добавляли 50 мкл буфера для элюации РНК (pH 8,3) содержащего 0,1 М Трис- ЕДТА (ТЕ), пробирки встряхивали на вортексе и центрифугировали 15 сек. для осаждения сорбента. Для ОТ-ПЦР амплификации использовали 5 мкл надосадочной жидкости содержащей РНК, остаток хранили при -70^0С.

Качество экстракции НК из биоматериалов анализировали электрофоретически в 2% агарозном геле с 0.5 мкг/мл этидиум бромида. Электрофорез проводили 25 мин., при 50 мА и напряженности поля 10 В/см. НК визуализировали на трансиллюминаторе при длине волны УФ 330 нм. Количество НК анализировали по наличию четкой тонкой полосы, расположенной в 2-х мм справа от лунки.

ОТ-ПЦР реального времени проводили на аппарате RotorGeneQ имеющем 6 каналов детекции. Версия программного обеспечения RotorGene 1.8.17.5. Для ОТ-ПЦР использовали стрипованые оптически прозрачные пластиковые пробирки объемом 0.1 мл с плотно закрывающимися крышками. Объем смеси составлял 25 мкл. Состав ОТ-ПЦР смеси:

5 мкл образца экстрагированной РНК, 0,1 мкл 100 пкМоль/мкл прямого праймера, 0.1 мкл 100 пкМоль/мкл обратного праймера, 0,03 мкл 100 пкМоль/мкл Probe (ПЦР-зонда), 0,5 мкл TaqF полимеразы (активность 5 ЕД/мл), 2,5 мкл 10х буфера (состав 25 мМ $MgCl_2$), 0,2 мкл смеси в равных долях 100 мМ dATP, 100 мМ dTTP, 100 мМ dCTP, 100 мМ dGTP, 5 мкл смеси для обратной транскрипции (Reverta L). Синтез праймеров и зонда был произведен в ООО «Синтол», Москва. Зонд с 5' стороны метили красителем FAM, с 3' стороны – гасителем флюоресценции RTQ1. В качестве положительного контроля использовали РНК, выделенную из культуральной жидкости линии клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ), заражённых лабораторным штаммом вируса энцефалита мышей (ВЭМ). Отрицательным контролем служила дистиллированная вода.

Полногеномное секвенирование РНК вируса, выделенного из перикардиальной жидкости, проводили на приборе MiSeq, Illumina, США.

Результаты и их обсуждение. На начальном этапе работы для верификации и подтверждения вспышки вирусного энцефаломиокардита обезьян адлерского питомника были использованы полимеразно-цепные реакции (ПЦР) с электрофоретическим методом детекции. Праймеры к ВЭМК и условия ПЦР реакции были взяты из статей: прямой праймер №1 CCCTACCTCACGGAATGGGGCAAAG, обратный праймер №1 GGTGAGAGCAAGCCTCGCAAAGACAG, длина ампликона 285 п.о., прямой праймер №2 CGAACTCAGTGATACTGACCCCTG, обратный праймер №2 CCAGCTCTCGGGGTCATATCAATC, длина ампликона 618 п.о. **[4,8]**

ОТ-ПЦР проводили с РНК, выделенной из биоматериалов, взятых от погибших в ходе вспышки острого миокардита обезьян, в частности из перикардиальной жидкости, взятой от павиана гамадрила №3761. Во всех сериях реакций ОТ-ПЦР с вышеуказанными праймерами был получен отрицательный результат. В ходе анализа было высказано предположение, что данные праймеры весьма видоспецифичны и могут не вступать в гибридизацию с некоторыми штаммами и изолятами ВЭМК. Это предположение в частности подтверждалось тем, что в реакциях ОТ-ПЦР с РНК, выделенной из культуральной жидкости содержащей лабораторный штамм вирус энцефалита мышей (ВЭМ), который так же относится к кардиовирусам группы А, аналогично, был получен отрицательный результат.

Для детальной проверки, к каким штаммам энцефаломиокардита специфичны данные праймеры, в базе данных GenBank были найдены и загружены для анализа все полногеномные сиквенсы вирусов энцефаломиокардита группы А, в общей сложности 34 полногеномных последовательностей.

Интерактивно, по адресу https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi с помощью инструмента поиска локального выравнивания (*Basic Local Alignment Search Tool*) данные праймеры были протестированы на нуклеотидную гомологию.

Была показана специфичность данных праймеров только к 15 штаммам и изолятам вируса энцефаломиокардита в том числе к одному из штаммов свиного энцефаломиокардита, в частности к сиквенсам под идентификационными номерами: KF598860, KF598864, KF598863, KF598862, KF598861, KF293299, KF709977, KC762214, JQ864080, HM641897, FJ897755, AF356822, FJ604852, FJ604853, EU780149. К оставшимся сиквенсам которые включаю в себя изоляты вируса Мэнго, свиного энцефаломиокардита 2-го типа, диабетогенные энцефаломиокардиты, изоляты Sing и т.д. под номерами: AY296731, DQ294633, DQ835185, JX257003, KC310737, KC310738, L22089, M22457, M22458, M37588, X87335, DQ464062, DQ464063, DQ517424, EU780148, DQ288856, M81861, X00463, X74312 данные праймеры не были специфичны.

Таким образом видно, что праймеры, взятые из статей не могут достоверно выявлять от-ПЦР около половины штаммов вируса энцефаломиокардита.

Для разработки собственной тест системы был применен классический распространённый подход. **[3]**

Было проведено сравнительное выравнивание всех полногеномных сиквенсов, которое показало гомологию между штаммами и изолятами вируса на уровне 70-90%.

В результате поиска консервативных регионов по всей длине консенсусной последовательности, был найден регион содержащий гомологичный на 95% со всеми сиквенсами участок. К этому участку консенсусной нуклеотидной последовательности были разработаны праймеры и зонд для детекции в ПЦР реального времени. **(рис. 2)**. Разработанные праймеры и зонд с помощью инструмента поиска локального

выравнивания были протестированы на нуклеотидную гомологию, которая показала 100% гомологию ко всем найденным полногеномным сиквенсам кардиовируса группы А.

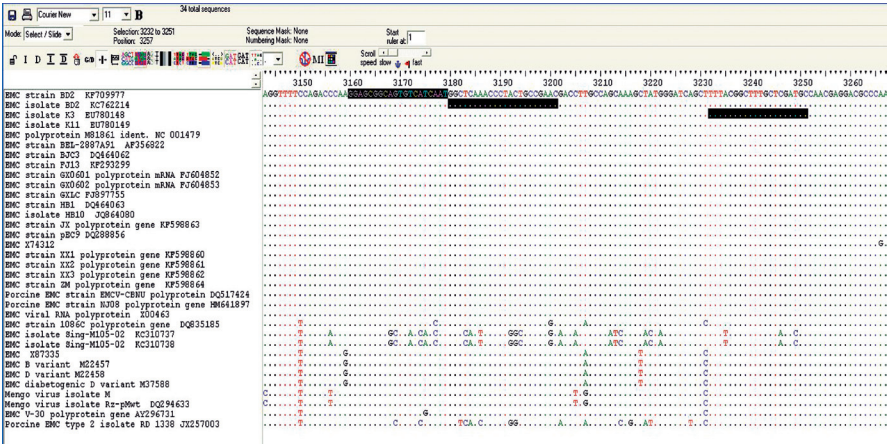


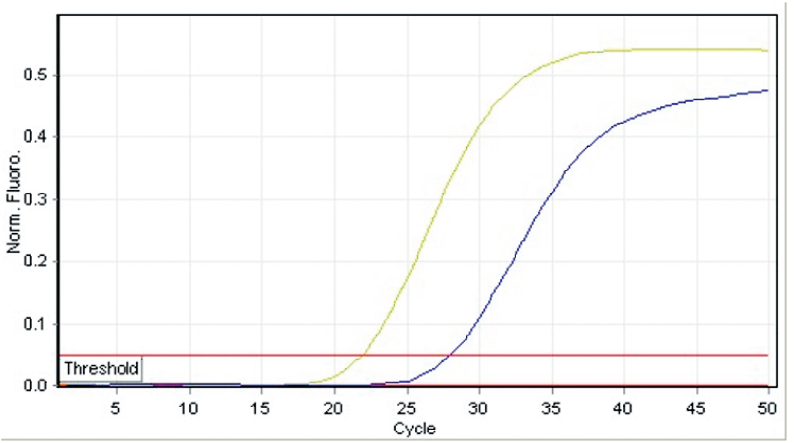
Рисунок 2. *Участок сравнительного выравнивания всех полногеномных сиквенсов вирусов энцефаломиокардита группы А (выделены разработанные праймеры и зонд)*

ОТ-ПЦР реакции в режиме реального времени с разработанными праймерами и зондом оптимизировали по концентрациям каждого из компонентов ОТ-ПЦР смеси (параметры после оптимизации описаны выше в методах исследования) и температурным параметрам. Температурный профиль реакции после оптимизации был выбран следующий: 45°С – 15 мин., 95°С –5 мин., 50 циклов: 94°С – 10 сек., 60°С – 25 сек., детекция по зелёному каналу (FAM). Выбран порог фона 0,05 оптимизация уровня сигнала активна, и для данной тест системы составила 9,33 так же выбрана нормализация реакции с 1 цикла, динамичный фон активен, корректировка уклона активна, выброс на уровне10%.

Заключение В ходе ОТ-ПЦР реакций в режиме реального времени с РНК выделенной из культуральной жидкости линии СПЭВ, заражённых лабораторным штаммом ВЭМ и РНК выделенной из перикардиальной жидкости погибшего павиана №3761 в обоих случаях были получены достоверные положительные результаты. **(рис 3).** Кривые флюорес-

ценции пересекали порог в циклах 22 и 28, что примерно соответствует количеству: 10^9 и 10^7 вирусных копий в мл. соответственно. Наличие вируса так же подтвердилось полногеномным секвенированием штамма вируса, впоследствии названного 3761 IMP, полногеномная нуклеотидная последовательность которого длиной 7714 п.о., депонирована под идентификационным номером KX231802.1 в международную базу данных сиквенсов GenBank.

Quantitation data for Cycling A.Green



Standard Curve

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		к-	Unknown	NEG (NTC)			
2		вэм	Unknown	21.88			
3		3761 п.г.	Unknown	28.05			

™ This report generated by Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 (Build 87)
Copyright ©2000-2006 Corbett Research, a Division of Corbett Life Science. All rights reserved.
ISO 9001:2000 (Reg. No. QEC21313)

Рисунок 3. *Краткий отчет количественной ОТ-ПЦР в реакции с разработанными праймерами и зондом*

Таким образом, можно достоверно утверждать, что в ходе работы была разработана действующая, экспериментальная ОТ-ПЦР тест-система реального времени с гибридизационно-флюоресцентным методом детекции для диагностики вирусов энцефаломиокардита группы А.

Литература

1. Калайджян А.А., Агумава А.А., Альховский С.В., Щетенин А.М., Вишневская Т.В., Лапин Б.А., Вышемирский О.И. Расшифровка вспышки острого инфекционного миокардита среди павианов гамадрилов адлерского питомника обезьян // Материалы сочинской третьей международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии», том 1, 8-10 августа 2016, стр.243-250.
2. Крылова Р.И., Джикидзе Э.К.. Энцефаломиокардит у обезьян // БЭБиМ, 2005, т.139, №3, с.337-341.
3. Agumava AA, Chikobava MG, Lapin BA. Development of the PCR-test system for detection primate betaherpesvirinae // Mol Gen Mikrobiol Virusol. 2010;(3):36-9.
4. Dawn Su-Yin Yeo, Jing Er Lian, Charlene J Fernandez, Yueh-Nuo Lin, Jasper Chin-Wen Liaw, Moi-Lien Soh, Elizabeth Ai-Sim Lim, Kwai-Peng Chan et all A highly divergent Encephalomyocarditis virus isolated from nonhuman primates in Singapore // Virology Journal 201310:248 DOI: 10.1186/1743-422X-10-248
5. Dick GWA, Smithburn KC, Haddow AJ. Mengo Encephalomyelitis Virus. Isolation and Immunological Properties. // Br J Exp Pathol. 1948; 29:547.
6. Harwood AJ. Basic DNA and RNA protocols. Introduction. // Methods Mol Biol. 1996; 58:v-vi
7. Helwig FC, Schmidt CH. A filter-passing agent producing interstitial myocarditis in anthropoid apes and small animals. // Science. 1945; 102:31–3. doi: 10.1126/science.102.2637.31.
8. Laurie A. Brewer, Humphrey C. M. Lwamba, Michael P. Murtaugh,1 Ann C. Palmenberg, et all. Porcine Encephalomyocarditis Virus Persists in Pig Myocardium and Infects Human Myocardial Cells // J Virol. 2001 Dec; 75(23): 11621–11629
9. Margot Carocci, Labib Bakkali-Kassim. The encephalomyocarditis virus. // Virulence. 2012 Jul 1;3(4):351-67. Epub 2012 Jun 22.
10. Roos RP. Pathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced disease. // Clinical and Experimental Neuroimmunology. 2010;1:70–78.

SPECIFIC PROBIOTICS MODULATE GUT MICROFLORA IN CHRONICALLY HIV-INFECTED ADULTS

Dyachenko A.G., Horobchenko E.N.
Sumy State University School of medicine,
Sumy, Ukraine
agdyak@gmail.com

Abstract

Close interaction between the microbiota and mucosal is a critical imperative for intestinal homeostasis. Not so long ago it was found that changes in the microbiota (dysbiosis) accompany various intestinal disorders, but also associated with a wide spectrum of multi-organ pathology, including HIV infection. HIV-infection results in damage and dysfunction of the gastrointestinal system. HIV enteropathy includes pronounced CD4+ T-cell loss, increased intestinal permeability, and microbial translocation that promotes systemic immune activation, which is implicated in disease progression. A synbiotic is the combination of probiotics and prebiotics that could improve gut barrier function. Our study goal was to determine whether the use of a synbiotic, probiotics or a prebiotic can recover immunological parameters in HIV-infected subjects through of a reduction of microbial translocation and pro-inflammatory cytokine production.

Key words: HIV-infection, dysbiosis, probiotic.

Introduction. It is known that the total number of microorganisms that inhabit the human gut (10^{14}), on two orders exceeds total number of cells. Besides, a large number of exogenous xenobiotic including patobionts and food antigens passes through the intestine daily. It's not a surprise that in the intestinal area there is concentrated up to 80 % of the lymphoid tissue.

Indigenous intestinal microbiota is a symbiotic relationship with the intestinal mucosa and is an integral part of the gastrointestinal tract (GIT). Close interaction between the microbiota and mucosa is a major imperative of intestinal homeostasis [6, 12]. It has been found out recently that changes in the microbiota (dysbiosis) accompany not only various

intestinal disorders, but are also associated with a wide range of multi-organ pathologies, including HIV infection [5, 19].

HIV has been established to infect and destroy vast amount of CD4 + T-cells and dendritic cells, as well as affect directly enterocytes: *tat* protein of HIV inhibits glucose uptake by enterocytes, impairing their function, *gp120* protein increases the amount of calcium in the cells, which causes depolymerization of tubulin and, consequently, dysfunction of cytoskeleton. This leads to disruption of intercellular interaction and increased permeability of the intestinal barrier. At the same time the expression of genes that control the integrity of epithelium is suppressed [9].

Enteropathy accompanied by HIV is characterized by villous atrophy, crypt hyperplasia, malabsorption of several important nutrients, apoptosis of enterocytes, and increased permeability of epithelium. Mass deaths of the effector cells of the immune system in the lamina propria, the destruction of Peyer's patches, and a sharp reduction in the production of secretory IgA and defensins create favorable conditions for the breeding of excessive microflora including pathogenic microflora in the intestinal lumen [17].

These factors lead to the penetration of LPS and other bacterial components through the intestinal barrier into the blood circulation although bacteremia is not observed. Translocation of LPS and chronic exposure to peripheral lymphocytes result in persistent systemic immune response accompanied by high level of proinflammatory cytokines, which fairly soon leads to the depletion of the immune system. It is believed that translocations or chronic immune activation play a key role in the development and progress of opportunistic complications [1,11].

This opens up the prospect of influence on the infectious process by correcting dysbiotic changes in the intestine of HIV-infected patients. In this regard, **the aim** of the present study was to evaluate changes in microflora of the large intestine in chronic HIV infection and the possibility of correction by means of bacterial preparations (probiotics).

Materials and methods. The study involved 40 dispensary patients of the regional center of prevention and control of AIDS in Kharkov. All the

patients were informed about the purpose and plan of study and gave their written agreement to participate in the study. All the patients had been diagnosed according to the criteria of WHO with the III-IV stage of HIV infection. During the month before the survey the patients did not take any antibiotics. Dysbiosis correction circuit was designed for 1 month taking of probiotic preparations. One and half month later the follow-up study was conducted to investigate microbiocenosis of 20 HIV-infected patients. The drugs contained such strains of microorganisms as:

1. Lactobacillus casei, L. rhamnosus, L. acidophylus, L. bulgaricus, Streptococcus thermophylus, Bifidobacterium breve, B. longum,
2. Bifidobacterium bifidum, Escherichia coli, stain M-17
3. Saccharomyces boulardii

Bacteriological methods. The condition of intestinal microbiome was assessed according to the guidelines for the study of fecal bacteria overgrowth and modern methods of correction of intestinal dysbiosis. Microbiological testing of stool samples was carried out by plating on nutrient media of HiMedia Laboratories Pvt Ltd (India) company. Identification of microorganisms was carried out according to standard procedures. Normative data of microbiocenosis structure of healthy donors were taken from OST "Treatment Protocol. Intestinal dysbiosis "-91500.11.0004. 2003 [14-16].

Statistical methods. The results are presented in the form of averages, standard deviation and median assuming a normal distribution of data. Normal distribution of quantitative traits was verified by the Shapiro-Wilk test. The research results are processed using "STATISTICA 10.0" (StatSoft Inc., USA, version 10.0.1011.6) and spreadsheet editor Microsoft Excel 2013.

Results and discussion. Of 40 HIV-infected patients who participated in the study, there were 27 (67.5%) female and 13 (32.5%) male. The average age of patients was 35,6 ± 8,2 years. The average number of (M ± m) CD4 + T cells in 1 mcl of blood of patients before the study was 426 ± 264 cells / mcl (Table 1).

Table 2.

Microbiota of HIV-infected

Fecal flora	Количество микроорганизмов в норме	Количество м/о до коррекции пробиотическими препаратами			Количество м/о после коррекции пробиотическими препаратами		
		Кол-во м/о в 1 г фекалий	Кол-во больных (n=40)		Кол-во м/о, г фекалий	Кол-во больных (n=20)	
			n	M±m		n	M±m
Bifidobacterium spp.	109-1010	<106 107	36 4	90%±4,74* 10%±4,74	106 108	19 1	95%±4,87 5%±4,87
Lactobacillus spp.	107-8	<105 106-107	35 5	87,5%±5,2* 12,5%±5,2	105 106-108	12 8	60%±10,95 40%±10,95
E. coli (lac+)	108	<106 107-109	24 16	60%±7,7 40%±7,7	107-109	20	100%
E. faecalis	107-8	<105 106-108	25 15	62,5±7,6 37,5%±7,6	105 106-8	6 14	30%±10,25 70%±10,25
E. faecium	107-8	<105 >106	34 6	85%±5,6 15%±5,6	≤105	20	100%
E. coli с гемолит. активностью	–	0 <105	2 38	5% ±3,4* 95% ±3,4	0 105	19 1	95%±4,87 5%±4,87
S.aureus	–	0 >104	33 7	82,5%±6 17,5%±6	0	20	100%
S. epidermidis	<104	<104 >105	27 13	67,5 ± 7,4 32,5±7,4	0	20	100%
Candida spp.	<104	<104 >104	32 8	80 ± 6,3* 20±6,3	0	20	100%
Cl. perfringens	<103	<103 >103	38 2	95%±3,4* 5%±3,4	<103 >103	16 4	80%±4,81 20%±8,94

** p<0,05 versus normal*

Table 1

Main clinical and demographic characteristics of HIV-infected patients

Character-istics	Sex n/%		Age (years, M ± m; Median)	CD4+T (cells / mcl) M ± m; median		
	Male	Fe-male		All (n=40)	<350 cells/mcl (n=28)	>350 cells/mcl (n=16)
HIV-infect-ed (n=40)	13/ 32,5	27/ 67,5	35,65±8,2 34	426±264 416	223±99 220	462±280 424

As it can be seen from Table 2, the quantitative and qualitative composition of the normal microflora of the large intestine has been broken in all patients. Changes are identified among anaerobic and facultative anaerobic bacteria. It should be noted that violations of microbiota were observed without presence of opportunistic microorganisms. Reduced number of organisms concerned primarily bifidobacteria, which dominated in the anaerobic flora and accounted for about 95% of the intestinal microbiome. According to our data, 90% ± 4.74 % of cases showed that the number of bifidobacteria appeared to be less than 10^6 CFU/g and in 10% ± 4.74% of cases it was about 10^7 CFU / g. As for lactobacilli which are very important, the number of them in HIV-infected patients was significantly reduced compared to healthy controls (10^7-10^8 CFU / g [17]) and was less than 10^5 CFU / g in 87.5% ± 5.2% and 10^6-10^7 CFU / g in 12.5% ± 5.2% of patients ($p<0.05$).

The group of anaerobic bacteria Bacteroides wasn't detected in patients. The leading representative of the facultative anaerobic bacteria belonging to the obligate microflora is E. coli. The number of bacteria of this type in about half of virus carriers remained constant while the other was reduced by 1-2 orders of magnitude. Hemolytic E. coli strains in small concentrations detected in only 5% ± 3.4% investigated.

The same trend is observed in relation to other pathobionts: *S. aureus*, *S. epidermidis,* and *C. albicans* in low titers are found in only a minority of

infected patients ($p < 0.05$). Only in one patient *Clostridia* were isolated in very low concentrations. In addition, a case of a serious intestinal dysbiosis of microbiome in HIV-infected patients was accompanied supplements by fall of 1-2 orders of the count of obligate commensal *E. faecalis*, and *E. faecium*, which are present in large numbers in the faeces of a healthy man.

Thus, HIV infection, regardless of the duration of the course, the clinical stage of the disease and the use of antiviral therapy manifests a profound violation of the microbial homeostasis of the colon, accompanied by a simultaneous decrease in quantitative anaerobic (bifidobacteria and lactobacilli) and facultative anaerobic flora (*E. coli*).

Serious changes of the microflora of intestine in chronic HIV infection have been identified by other researchers, too. Deep changes of intestinal microbiota is accompanied by the appearance of communities of enteropathogenic bacteria capable of converting tryptophan to kynurenine immunomodulatory derivatives, which correlates with the progression of the disease and contributes to the violation of mucosal immunity. At the same time ART-naïve patients increases the levels of some genera**,** and the suppression of 45 genera. The most significant enrichment was mentioned for *Erysipelotrichaceae*, which often accompanies obesity and is associated with increased incidence of cardiovascular system disorders. Such types as *Proteobacteria* are part of the most enriched genera of ART-naïve patients. Among them is the species included in the genera of *Salmonella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Shigella* and *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae* family, known as pro-inflammatory pathobionts. The mucus of ART-naive HIV-carriers increased the levels of *Staphylococcus, Pseudomonas*, *Campylobacter spp*., *Candida albicans*, which often cause opportunistic infections and bacteremia, with a significant decrease in the content of bifidobacteria and lactobacilli, *Clostridia* and *Bacteroides* with particularly strong suppression of *Bacteroides* and *Alistipes* genera [2,8].

At the same time Saxena et al. concluded that HIV infection might be more diversity of microbes in the intestinal level of the genus, but had only limited quantitative and qualitative impact on the overall microbiome [5].

In our study, the use of probiotic bacterial drugs on the background of the microbiome dysbiosis in HIV-infected patients resulted in a significant mitigation of these violations, but the return to normal was not observed (Table 2).

Recently, it has been found that the balance between the two regular subpopulations CD4 + T cells, Th17 and CD25 + FoxP3 + (Treg), underlies immune protective mechanism against infections and autoimmune disorders.

Treg-cells express toll-receptor 4 (TLR-4) and are activated by LPS. Some *Lactobacillus* species (*L. reuteri and L. casei*, but not *L. plantarum*) also activate these cells [18].

Number of HIV-specific Treg-cell increases in patients responding to antiretroviral therapy. While deep-depletion of Th17 cells and decreased CD4 + CD161- cells are associated with progressive loss of Treg-cells, increased immune activation and disease progression [13].

The combination of probiotics in the model system can increase the level of Treg-cells, and suppress the development of the disease [10].

Thus activity had only a mixture of several species of lactobacilli. Suppressive activity was accompanied by increased secretion of IL-10 Treg-cells, which led to a weakening of the secretion of pro-inflammatory cytokines by cells Th1 and Th17.

The model system also proved that the administration of *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri, Bifidobacterium bifidium* and *Streptococcus thermophilus* induced a low response of T and B cells, reduced the secretion of Th1, Th2, and Th17 cytokines, inhibited apoptosis and caused migration of Treg cells in the inflammatory focus [3].

Probiotics have also a beneficial effect on the HIV-infection. [4]. This is accompanied by a simultaneous increase of the levels of bifidobacteria and decrease levels of *Clostridium coccoides*, *Eubacterium rectale*, *Clostridium lituseburense* and *Clostridium histolyticum* [7].

These findings thus suggest that the modulation of the mucosa can have desirable effects in the restoration of intestinal function and repair. Thus, the mechanism of adverse effect of probiotic bacteria on the immune status and HIV infection may include effects on the translocation and activation of the immune balance of regulatory T-lymphocyte subpopulations.

Referances

1. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat Med. – 2006. – № 12. – P.1365–71.

2. Das JK, Mishra D, Ray P, Tripathy P, Beuria TK, et al. (2013) In vitro evaluation of anti-infective activity of a Lactobacillus plantarum strain against Salmonella enterica serovar Enteritidis. Gut Pathog 5: 11. doi: 10.1186/1757-4749-5-11.
3. De Roock, S.; van Elk, M.; van Dijk, M.E.; Timmerman, H.M.; Rijkers, G.T.; Prakken, B.J.; Hoekstra, M.O.; de Kleer, I.M. Lactic acid bacteria differ in their ability to induce functional regulatory T cells in humans. Clin. Exp. Allergy 2010, 40, 103–110
4. Hemsworth, J.; Hekmat, S.; Reid, G. The development of micronutrient supplemented probiotic yogurt for people living with HIV: Laboratory testing and sensory evaluation. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. – 2011. – № 12. – P. 79–84.
5. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. Nature (2012) 482:179–85. doi:10.1038/nature10809nature10809.
6. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat Rev Immunol (2010) 10:159–69. doi:10.1038/nri2710.
7. Gori, A.; Rizzardini, G.; Van'T Land, B.; Amor, K.B.; van Schaik, J.; Torti, C.; Bandera, A.; Knol, J.; Benlhassan-Chahour, K.; Trabattoni, D.; et al. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: Results of the "COPA" pilot randomized trial. Mucosal Immunol. – 2011. – № 4. – P. 554–563.
8. Gori, A.; Tincati, C.; Rizzardini, G.; Torti, C.; Quirino, T.; Haarman, M.; Ben Amor, K.; van Schaik, J.; Vriesema, A.; Knol, J.; et al. Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. J. Clin. Microbiol. – 2008. – № 46. – P. 757–758.
9. Guadalupe M, Sankaran S, George MD, Reay E, Verhoeven D, Shacklett BL, et al: Viral suppression and immune restoration in the gastrointestinal mucosa of human immunodeficiency virus type 1-infected patients initiating therapy during primary or chronic infection. J Virol. – 2006. – №.80 (16). – P. 8236–8247.
10. Lavasani, S.; Dzhambazov, B.; Nouri, M.; Fak, F.; Buske, S.; Molin, G.; Thorlacius, H.; Alenfall, J.; Jeppsson, B.; Westrom, B. A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. PLoS One 2010, 5, doi:10.1371/journal.pone.0009009
11. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, et al. Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol. – 2007. – №81. – P. 599–612.

12. Pabst R, Russell MW, Brandtzaeg P. Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut. Trends Immunol (2008) 29:206–8. doi:10.1016/j.it.2008.02.006.
13. Prendergast, A.; Prado, J.G.; Kang, Y.H.; Chen, F.; Riddell, L.A.; Luzzi, G.; Goulder, P.; Klenerman, P. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. Aids 2010, 24, 491–502
14. The disorder of intestinal byocenosis of the children and the adolescents: methodic recommendations / Lugansk State Medical University. – Lugansk, 2004. – 27 p.
15. The principles of correction of disorder of microecology of intestine: methodic recommendations / Moscow Research Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery. – Moscow, 2004. – 38 p.
16. The current approaches of the correction of intestinal dysbiosis: methodic recommendations / Ukrainian Centre for Scientific Medical Information and patent-license work. – Kyiv, 2000. – 27 p.
17. Saxena D., Li Y., Yang L. et al. Human Microbiome and HIV/AIDS // Curr HIV/AIDS Rep. 2012 March; 9(1): 44–51. doi:10.1007/s11904-011-0103-7
18. Smits, H.H.; Engering, A.; van der Kleij, D.; de Jong, E.C.; Schipper, K.; van Capel, T.M.; Zaat, B.A.; Yazdanbakhsh, M.; Wierenga, E.A.; van Kooyk, Y.; et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. J. Allergy Clin. Immunol. 2005, 115, 1260–1267
19. Vujkovic-Cvijin, I.; Dunham, R.M.; Iwai, S.; Maher, M.C.; Albright, R.G.; Broadhurst, M.J.; Hernandez, R.D.; Lederman, M.M.; Huang, Y.; Somsouk, M.; et al. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. Sci. Transl. Med. – 2013. – № 5. – doi:10.1126/scitranslmed.3006438.

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ПОДБОР ДИАГНОСТИКУМОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРОФИЛЯ МАКАК РЕЗУСОВ

Рубальский Е.О.[1,2], Алешкин В.А[2], Афанасьев С.С.[2], Орлов С.В.[4], Караулов А.В.[5], Теплый Д.Л.[3], Лапин Б.А.[4], Джикидзе Э.К.[4], Алешкин А.В.[2], Рубальский О.В.[1], Рубальская Е.Е.[1], Аршба И.М.[4], Бочкарева С.С.[2], Даудова А.Д.[1], Афанасьев М.С.[5], Ахминеева А.Х.[1], Рубальский М.О.[1], Зулькарнеев Э.Р.[1,2], Смирнова К.Н.[3]

[1]ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия

[2]ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

[3]ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет», Астрахань, Россия

[4]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», Сочи, Россия

[5]ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

e.o.rubalsky@gmail.com

Резюме

Макаки резусы являются одной из наиболее релевантных моделей организма человека для изучения изменений иммуноглобулинового профиля. При этом соответствующие диагностикумы должны подбираться в зависимости от степени внутривидовой и межвидовой вариабельности классов и подклассов иммуноглобулинов. Для исследования физиологических изменений концентрации IgG целесообразно с использовать диагностикумы на основе антител против иммуноглобулинов обезьян Старого Света. Для оценки изменений уровней IgA и IgM возможно использование тест-систем, основанных на антителах против иммуноглобулинов человека.

Ключевые слова: иммуноглобулины, физиологическая норма, человек, макаки резусы, родоспецифические диагностикумы

RATIONAL SELECTION OF THE KITS FOR EVALUATION OF THE MACAQUE RHESUS IMMUNOGLOBULIN PROFILE

Rubalskii E.O.[1,2], Aleshkin V.A.[2], Afanasiev S.S.[2], Orlov S.V.[4], Karaulov A.V.[5], Tepliy D.L.[3], Lapin B.A.[4], Dzhikidze E.K.[4], Aleshkin A.V.[2], Rubalsky O.V.[1], Rubalskaya E.E.[1], Arshba I.M.[4], Bochkareva S.S.[2], Daudova A.D.[1], Afanasiev M.S.[5], Akhmineeva A.Kh.[1], Rubalsky M.O.[1], Zulkarneev E.R.[1,2], Smirnova K.N.[3]

[1]Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia
[2]G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia
[3]Astrakhan State University, Astrakhan, Russia
[4]Research Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia
[5]First Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia
e.o.rubalsky@gmail.com

Abstract

Rhesus macaques are one of the most relevant models of the human organism for the immunoglobulin profile changes investigation. In this case, the appropriate kits must be selected depending on the degree of intraspecies and interspecies variability of classes and subclasses of immunoglobulins. It is appropriate to use the kits based on antibodies against the immunoglobulins of the Old World monkeys for investigation of the physiological changes of IgG concentration. It is possible to use the kits based on antibodies against human immunoglobulins to evaluate changes of IgA and IgM levels.

Key words: immunoglobulins, physiological norm, people, rhesus macaques, genera-specific kits.

Введение. Иммуноглобулиновое звено является одним из важнейших компонентов гуморального иммунитета. Поэтому исследование концентрации в крови классов и подклассов иммуноглобулинов является неотъемлемой частью многих клинических и доклинических испытаний. В том числе при проведении исследований на обезьянах, являющихся наиболее релевантной моделью организма человека.

Наибольшее количество исследований, включающих оценку иммуноглобулинового профиля, было проведено на макаках резусах – Macaca mulatta.

Для исследования концентрации общих IgG, IgA, IgM и их подклассов используются диагностикумы как на основе антител к иммуноглобулинам человека, так и родоспецифические на основе антител к иммуноглобулинам обезьян Старого Света. Использование тест-систем на основе антител к основным классам Ig человека вероятно оправдано при оценке грубых изменений иммуноглобулинового профиля макак за счет определенной степени гомологии и перекрестной реактивности этих диагностикумов [4].

Однако, несмотря на почти полувековой опыт проведения таких исследований, до на стоящего времени не были достаточно точно определены диагностические возможности иммунохимических наборов на основе различных антител и их возможные ограничения при оценке изменений в физиологических пределах концентрации иммуноглобулинов у животных [4]. В качестве одного из факторов, обеспечивающих физиологичное изменение уровней вышеуказанных основных классов иммуноглобулинов и при этом не вызывающих негативных последствий для макроорганизма, является энтеральное введение пробиотических композиций на основе штаммов бактерий рода *Lactobacillus* [5, 6, 8].

Цель настоящей работы – оценить возможности и выявить ограничения диагностикумов на основе антител к иммуноглобулинам человека и на основе антител к иммуноглобулинам обезьян Старого Света, используемых для изучения изменений иммуноглобулинового профиля Macaca mulatta.

Методы исследования. В качестве средства для физиологичного изменения уровней основных классов иммуноглобулинов были использованы композиции на основе консорциума пробиотических штаммов лактобацилл *Lactobacillus helveticus* NKJC, *L. helveticus* JCH, *L. casei* KAA. В качестве питательной среды для получения пробиотических композиций использовали потенциально иммуногенную гидролизатно-молочную среду (ГМС) [2] и гипоаллергенную молочную лимоннокислотную казеиновую сыворотку (ЛКМС) [1].

Испытания были проведены на половозрелых самцах Macaca mulatta (возраст 5,1-8,4 лет), весом 7200-10500 г. Для эксперимента были подобраны особи здоровые по клиническим, гематологическим, биохимическим и микробиологическим показателям. Образцы композиций вводились обезьянам *per os* в оптимальной дозе – по 10 мл за один час до еды 1 раз в день в течение 7 суток.

В качестве диагностикума на основе антител к иммуноглобулинам человека использовали диагностические моноспецифические сыворотки против IgG(H+L), IgA(H), IgM(H) человека (Филиал «МЕДГАМАЛ» ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Российская Федерация). Исследование концентрации иммуноглобулинов сыворотки крови обезьян проводили при помощи метода радиальной иммунодиффузии в геле (РИД) согласно инструкции производителя.

В качестве родоспецифических диагностикумов, специализированных для оценки концентрации общих сывороточных IgG, IgA, и IgM обезьян Старого Света, были использованы ИФА тест-системы фирмы Life Diagnostics Inc. (США) Monkey IgG ELISA Kit, Monkey IgA ELISA Ki и Monkey IgM ELISA Kit соответственно.

Измерения уровней иммуноглобулинов в сыворотке крови проводились у контрольных животных однократно (20 особей), а в экспериментальных группах животных (по 6 особей в группе) в трех контрольных точках: перед дачей композиций, на 7 и 14 сутки после начала дачи композиций.

Результаты и их обсуждение. Концентрация сывороточных IgG, IgA и IgM обследованных интактных макак резусов (контрольная группа) по данным РИД составляла 26,69±1,34 г/л, 3,46±0,18 г/л и 1,39±0,13 г/л соответственно. Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови у животных контрольной группы по данным ИФА составляла: IgG – 13,92±2,2 г/л, IgA – 2,6±0,5 г/л, IgM – 1,37±0,3 г/л. Полученные значения уровней иммуноглобулинов соответствовали физиологической норме этих животных, ранее описанной Miller C.J. с соавторами и Матуа А.З. [3, 7].

По данным метода РИД с использованием антител против иммуноглобулинов человека средние концентрации IgG в сыворотке крови макак резусов из опытных групп не имели статистически значимых

изменений как на фоне приема, так и после отмены пробиотиков (P>0,05). Однако при использовании набора для ИФА на основе антител против иммуноглобулинов обезьян Старого Света было выявлено статистически достоверное повышение содержания IgG у животных, получавших пробиотические композиции на основе ГМС, через 14 суток после начала эксперимента (P<0,05). Средний уровень IgG в группе макак, получавших композиции на основе ЛКМС, не имел статистически достоверных изменений (P>0,05) как на фоне дачи пробиотиков, так и после их отмены (табл. 1).

Таблица 1.

Средние показатели уровня IgG в сыворотке крови обезьян

Контрольная точка	Средняя концентрация IgG в крови Macaca mulatta, г/л (M±m)			
	по данным РИД		по данным ИФА	
	получавших композицию на основе ГМС	получавших композицию на основе ЛКМС	получавших композицию на основе ГМС	получавших композицию на основе ЛКМС
До введения	25,02±2,23	26,49±2,9	11,58±0,65	14,43±1,86
После 7 суток	26,27±2,04*	27,75±3,07*	14,06±1,09*	14,52±1,47*
После 14 суток	26,44±2,32*	25,21±2,78*	15,34±1,48**	15,14±1,02*

** – уровень значимости различий с животными до введения пробиотических композиций и достоверность влияния этого фактора по Фишеру – P>0,05*
*** – уровень значимости различий с животными до введения пробиотических композиций и достоверность влияния этого фактора по Фишеру – P<0,05*

Концентрация сывороточных IgA и IgM у макак резусов опытных групп не имела статистически достоверных изменений на 7 и 14 сутки после начала эксперимента по сравнению с этими показателями до введения пробиотических композиций (P>0,05). Данные показатели были установлены как с использованием РИД к иммуноглобулинам человека, так и ИФА к иммуноглобулинам обезьян (табл. 2 и 3).

Таблица 2.

Средние показатели уровня IgA в сыворотке крови обезьян

Контрольная точка	Средняя концентрация IgA в крови Macaca mulatta, г/л (M±m)			
	по данным РИД		по данным ИФА	
	получавших композицию на основе ГМС	получавших композицию на основе ЛКМС	получавших композицию на основе ГМС	получавших композицию на основе ЛКМС
До введения	3,08±0,24	3,84±0,42	2,91±0,15	2,48±0,21
После 7 суток	3,36±0,27*	4,41±0,54*	2,88±0,2*	2,81±0,17*
После 14 суток	3,33±0,31*	4,2±0,4*	2,8±0,27*	2,72±0,18*

** – уровень значимости различий с животными до введения пробиотических композиций и достоверность влияния этого фактора по Фишеру – P>0,05*

Таблица 3.

Средние показатели уровня IgM в сыворотке крови обезьян

Контрольная точка	Средняя концентрация IgM в крови Macaca mulatta, г/л (M±m)			
	по данным РИД			
	получавших композицию на основе ГМС	получавших композицию на основе ЛКМС	получавших композицию на основе ГМС	получавших композицию на основе ЛКМС
До введения	1,67±0,24	1,33±0,3	1,33±0,16	1,45±0,16
После 7 суток	1,65±0,18*	1,38±0,3*	1,22±0,14*	1,46±0,13*
После 14 суток	1,64±0,21*	1,35±0,32*	1,24±0,2*	1,34±0,22*

** – уровень значимости различий с животными до введения пробиотических композиций и достоверность влияния этого фактора по Фишеру – P>0,05*

В ходе проведенного исследования уровней сывороточных иммуноглобулинов макак резусов было выявлено, что использование набора для количественного ИФА IgG обезьян Старого Света позволяет вы-

явить физиологические изменения этого звена гуморального иммунитета, что не было возможно установить при использовании диагностикума для РИД на основе антител к IgG человека. Однако применение обоих типов наборов (ИФА и РИД) одинаково показывает отсутствие достоверных различий в концентрации сывороточных IgA и IgM у животных при введении пробиотиков.

Данный феномен объясняется тем, что Fc фрагменты IgA и IgM человека и макак резусов, – основные мишени обоих диагностикумов – обладают высокой внутривидовой вариабельностью, которая сопоставима с межвидовыми различиями. Однако, в отношении IgG1 – подкласса, составляющего 2/3 суммарного IgG, данное утверждение неприменимо, так как иммуноглобулины этого подкласса обладают гораздо меньшей внутривидовой вариабельностью при выраженной межвидовой генетической дистанции.

Выводы. Для исследования физиологических изменений концентрации сывороточных IgG и его подклассов целесообразно с использовать родоспецифических диагностикумов на основе антител против иммуноглобулинов обезьян Старого Света. Тем не менее для оценки изменений IgA и IgM возможно использование тест-систем, обладающих более широкой специфичностью, например, основанных на антителах против иммуноглобулинов человека.

Литература

1. Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Рубальский Е.О., Амерханова А.М., Алешкин А.В., Ахминеева А.Х., Сайгушева Л.А., Куяров А.А., Афанасьев М.С., Афанасьев Д.С., Рубальский М.О. Основа питательной среды для селекционирования штаммов лактобацилл по признаку снижения уровня гистамина в среде культивирования // Патент РФ на изобретение № 2441066. Опубликовано 27.01.2012. Бюллетень № 3.
2. Гончарова Г.И., Семенова Л.П., Лянная А.М., Козлова Э.П. Инструкция по приготовлению кисломолочного бифидум-бактерина на молочных кухнях. – М.: Министерство здравоохранения РСФСР, 1987. – 11 с.
3. Матуа А.З. Сравнительно-возрастные аспекты иммунного статуса низших обезьян (макак резусов и павианов гамадрилов) // Диссертация на соис-

кание ученой степени кандидата биологических наук. – Санкт-Петербург, 2010. – 148 с.
4. Рубальский Е.О., Смирнова К.Н., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Орлов С.В., Караулов А.В., Лапин Б.А., Алешкин А.В., Рубальский О.В., Рубальская Е.Е., Даудова А.Д., Афанасьев М.С., Усков В.В. Сравнительная характеристика особенностей иммуноглобулинового профиля человека и макак резусов // Астраханский медицинский журнал. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 38-48.
5. Bosch M., Méndez M., Pérez M., Farran A., Fuentes M.C., Cuñé J. Lactobacillus plantarum CECT7315 and CECT7316 stimulate immunoglobulin production after influenza vaccination in elderly // Nutr. Hosp. – 2012. – V. 27, № 2. – P. 504-509. – doi: 10.1590/S0212-16112012000200023.
6. Maassen C.B., Boersma W.J., van Holten-Neelen C., Claassen E., Laman J.D. Growth phase of orally administered Lactobacillus strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development // Vaccine. – 2003. – V.21. – P. 2751-2757.
7. Miller C.J., Kang D.W., Marthas M., Moldoveanu Z., Kiyono H., Marx P., Eldridge J.H., Mestecky J., McGhee J.R. Genital secretory immune response to chronic simian immunodeficien-cy virus (SIV) infection: a comparison between intravenously and genitally inoculated rhesus macaques // Clin. Exp. Immunol. – 1992. – V. 88, № 3. – P. 520-526.
8. Perdigón G., Maldonado Galdeano C., Valdez J.C., Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system // Eur. J. Clin. Nutr. – 2002. – V. 56, Suppl. 4. – P. S21-S26.

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НА ПРИМАТАХ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА

[1]Волков А.В., [1]Новикова Л.И., [1]Алёшкин В.А., [1]Зуева М.М., [1]Матвеевская Н.С., [1]Синчугова Т.В., [1]Панурина Р.Л., [2]Аршба И.М., [2]Вышемирский О.И., [2]Джикидзе Э.К., [2]Чугуева И.И.

[1]ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

[2]ФГБУ «НИИ МП» РАМН, Сочи, Россия

Резюме

В статье представлены данные по испытанию на обезьяньей модели переносимости (безвредности) нового иммуноглобулинового препарата «КИП назальный», находящегося на стадии разработки. Отмечена хорошая переносимость препарата. Бактериологический анализ показал возможность санации носовой полости от представителей патогенной микрофлоры.

Ключевые слова: иммуноглобулиновыей препарат «КИП назальный», переносимость, интраназальная лекарственная форма, доклиническое изучение.

A PRECLINICAL STUDY OF INTRANASAL FORM OF THE COMPLEX IMMUNOGLOBULIN PREPARATION IN PRIMATES

[1]Volkov A.V., [1]Novikova L.I, [1]Aloyshkin V.A., [1]Zueva M.M., [1]Matveevskaya N.S., [1]Sinchugova T.V., [1]Panurina R. L., [2]Arshba I.M., [2]Vyshemirsky O. I., [2]Dzhikidze E.K., [2]Chugueva I.I.

[1]G.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

[2]Research Institute of Medical Primatology of RAMS, Sochi, Russia

Abstract

The article presents the monkey model for testing tolerability (safety) of a new immunoglobulin preparation «KIP nasal», which is under development.

The good tolerability (safety) was determined. Bacteriological analysis showed the possibility of clearing of the nasal cavity from pathogenic microflora.

Key words: immunoglobulin preparation preparation “KIP nasal”, tolerability, intranasal dosage form , preclinical study.

Введение. В XX столетии были достигнуты значительные успехи в борьбе с инфекционными заболеваниями, приведшие к выраженному снижению показателей заболеваемости и летальности при большинстве инфекций, в том числе и в России. Однако социально-экономическая нестабильность последних десятилетий привела к неблагополучной эпидемиологической ситуации в отношении как контролируемых, так и неконтролируемых инфекций, в связи с чем повышение эффективности средств борьбы с бактериальными и вирусными инфекциями продолжает оставаться актуальной задачей для практического здравоохранения России. Известно, что используемые в настоящее время средства этиотропной терапии и профилактики инфекционных заболеваний различной этиологии не всегда эффективны, часто вызывают побочные отрицательные реакции. Так, хотя к антибиотикам и другим химиопрепаратам предъявляются жесткие требования в отношении их безвредности для человека, их применение имеет ряд существенных недостатков: патогенные микроорганизмы приобретают к ним устойчивость (резистентность), растет число резистентных штаммов и степень их резистентности, возникает нарушение биоценоза кишечника. Как следствие развивается дисбактериоз, могут быть аллергические и токсические реакции.

Альтернативой антибиотикам и химиопрепаратам выступают иммунобиологические средства, в том числе, иммуноглобулины как основные факторы гуморального иммунитета человека.

Гамма-глобулин (иммуноглобулин) впервые был выделен из плазмы крови человека в 40-х годах XX века, после того как Edvin Cohn (США) разработал холодно-этанольный метод фракционирования плазмы крови (1,2). В МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского первый препарат иммуноглобулина человека (противокоревой гамма-глобулин), предназначенный

для внутримышечного введения, был получен в 1946 г., а в 1948 г. был начат его производственный выпуск (3). В последние десятилетия институт занимается разработкой иммуноглобулиновых препаратов местного применения. В 1991 г. был внедрён в практику российского здравоохранения «Комплексный иммуноглобулиновый препарат» (КИП), содержащий иммуноглобулины трех основных классов – IgG, IgM и IgA, обладающий широким спектром антибактериальной и антивирусной активности и предназначенный для перорального введения (4), а в 2000 г. – комбинированный иммунобиологический препарат «Кипферон», сочетающий в одной лекарственной форме КИП и рекомбинантный α2-интерферон человека и предназначенный для местного применения в виде ректальных и вагинальных суппозиториев (5).

На стадии разработки находится новый препарат местного применения – «КИП назальный» (капли в нос). Препарат будет предназначен для профилактики и терапии вирусных и бактериальных инфекций верхних дыхательных путей. Перспективность назальной формы комплексного иммуноглобулинового препарата основывается, главным образом, на двух обстоятельствах – наличии в препарате кроме основного иммуноглобулина сыворотки крови IgG также и IgA, являющегося главным иммуноглобулином слизистых секретов, и специфической активности (IgG- и IgA-антитела) в отношении широкого спектра респираторных патогенов вирусной и бактериальной природы.

Был разработан первый вариант технологии, на основе которого получены три экспериментально-производственные серии препарата «КИП назальный» (№1, №2, №3). Серии препарата проконтролированы на стерильность, токсичность (мышиная модель), содержание иммуноглобулинов трех изотипов (G, A и M) методом радиальной иммунодиффузии по Манчини и вирусную безопасность (отсутствие поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg), антител к вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 типов и к вирусу гепатита С) согласно ФСП 42-0194695405 на «Иммуноглобулиновый комплексный препарат (КИП)». В препаратах были определены pH, концентрация белка биуретовым методом, а также они были проанализированы методом ИФА на содержание специфических антител IgG-, IgA- изотипов к респираторным патогенам вирусной (вирусы гриппа А+В и респираторно-син-

цитиальный вирус (РСВ)) и бактериальной (*Mycoplasma pneumoniae или Staphylococcus aureus*) природы.

Доклиническое изучение препарата включало в себя иммунохимический анализ серий по ряду параметров, исследование фармакокинетики при интраназальном введении человеку и испытания безвредности (переносимости) новой лекарственной формы КИП на животной модели, а именно, на приматах. Испытания проведены на базе ФГБУ «НИИ медицинской приматологии» РАМН.

Известно, что приматы, в том числе и низшие, являются самой подходящей живой моделью для изучения инфекционной патологии человека. Они чувствительны к целому ряду бактериальных и вирусных агентов, вызывающих инфекционные заболевания у человека: вирусам полиомиелита, гепатита А и В, кори, паротита, краснухи, оспы, ВИЧ, дизентерийным бактериям и многим другим. В связи с этим, исследования на приматах в ряде случаев являются необходимым этапом при разработке новых иммунобиологических средств, обеспечивающим безопасность перехода к клиническим испытаниям. Экспериментальное использование обезьян дает возможность получать данные, которые невозможно получить на других лабораторных животных.

Целью работы было проведение испытаний на обезьяньей модели переносимости (безвредности) нового иммуноглобулинового препарата «КИП назальный», находящегося на стадии разработки.

Материалы и методы. Экспериментально-производственные серии препарата «КИП назальный» (№1, №2, №3) представляют собой жидкую лекарственную форму (раствор во флаконах, по 5 мл), предназначенную для закапывания в нос. Действующее начало препарата – иммуноглобулины, вспомогательные вещества – глицин и глицерин.

Испытания были проведены в два этапа. В опытах по испытанию серии №1 было задействовано 12 здоровых макаков резусов в возрасте от 2,5 до 3,5 лет (все самцы). Восемь животных (опытная группа) получали КИП капельно по 300 мкл (150 мкл в каждый носовой ход) 2 раза в день, т.е. суммарная суточная доза препарата на каждую обезьяну составила 600 мкл. Препарат вводился 5 дней подряд. Четыре контрольные обезьяны (контрольная группа) вместо КИП получали в течение 5 дней интраназально равные объемы стерильного физио-

логического раствора. Кратность введения КИП уменьшили с 3-х раз в день до 2-х с целью снижения стрессовой нагрузки, вызванной иммобилизацией животного. КИП вводили без наркоза.

В испытаниях экспериментально-производственных серий №2 и №3 препарата «КИП назальный» было использовано 15 здоровых макаков резусов обоего пола – 5 особей в контрольной группе и по 5 в двух опытных группах. Обезьяны опытных групп получали КИП также 2 раза в день капельно по 240-300 мкл (120-150 мкл в каждый носовой ход) в течение 5 дней (каждая группа получала свою серию препарата). Таким образом, суточная доза препарата составила – 480-600 мкл. Контрольные животные в течение 5 дней получали соответствующее количество стерильного физиологического раствора с той же кратностью введения.

При испытаниях препаратов серий №1, №2 и №3 в течение 5-и дней проводили наблюдение за поведением животных, отмечали наличие катаральных или диспептических явлений, симптомов интоксикации. В первый день опыта обезьян наркотизировали, делали ректальное измерение температуры, взвешивали, производили забор крови из паховой вены (только при испытании серии №1). Второй раз животных наркотизировали на 7-ой день от начала опыта и повторяли процедуры, как и при первом введении наркоза. В остальные дни наблюдения (2-,3- и 4-й дни опыта) измерение температуры и веса тела не производили, т.к. не вводили наркоз в целях уменьшения стрессового воздействия на животных. Кровь использовали для выполнения клинического анализа и получения сыворотки. В образцах сыворотки крови методом радиальной иммунодиффузии по Манчини определяли концентрацию основных классов иммуноглобулинов (G, A, M).

Бактериологические исследования материала из носовых ходов опытных и контрольных обезьян производили до введения препарата «КИП назальный» и спустя 19 дней после окончания курса. Материал из носовой полости забирали сухим стерильным ватным тампоном, который вводили вглубь носа, предварительно очистив поверхность носа обезьян стерильной ватой, смоченной физиологическим раствором.

Для бактериологического исследования были использованы следующие дифференциально-диагностические среды: 5%-ный кровяной

агар, желточно-солевой агар, мясопептонный агар, среда Эндо и среда Сабуро (для выделения грибов).

Посевы исследуемого материала просматривали после 18-24- и 48-часовой инкубации при (+370С). Учитывали количество выросших колоний, соотношение отдельных ассоциантов, описывали характер колоний, гемолитические и лецитиназно-активные свойства. Отмечали их морфологические и тинкториальные свойства (кокки, палочки, отношение к окраске по Граму). Рост микроорганизмов на питательных средах оценивали по 4-х- бальной системе от единичных колоний до обильного роста колоний по всей поверхности исследуемых чашек.

Результаты и их обсуждение. При испытании препарата «КИП назальный» серий №1, №2 и №3 наблюдение за испытуемыми обезьянами в течение 5 дней при ежедневном интраназальном введении КИП не выявило каких-либо негативных изменений в поведении животных в сравнении с особями контрольных групп. Лишь один самец опытной группы, получавшей препарат серии №1, проявлял признаки возбудимости на 1-, 2- и 4-й дни наблюдения, что, вероятнее всего, связано не с введением препарата, т.к. происходило не каждый день, а с взаимоотношением этой особи с окружающими обезьянами.

Не наблюдалось существенных изменений массы и температуры тела у обезьян всех опытных и всех контрольных групп. Интраназальное введение препарата не сопровождалось появлением симптомов интоксикации, а также катаральных и диспептических явлений.

Применение препарата «КИП назальный» в течение 5 дней не вызвало никаких характерных изменений в составе крови подопытных животных. Лишь у одного самца из опытной группы по окончании срока наблюдения зафиксирована эозинофилия, что, вероятнее всего, связано с глистной инвазией.

Интраназальное введение КИП не вызвало существенных изменений количества эритроцитов, гемоглобина и СОЭ. Показатели красной крови у всех использованных для эксперимента подопытных животных, независимо от группы, находились на нижней границе нормы или были несколько ниже нормы.

В целом, результаты общего анализа крови свидетельствуют о чрезвычайной лабильности некоторых показателей у обезьян обеих групп,

что согласуется с данными литературы. Известно, что на фоне стресса, который вызывают любые манипуляции с животными (в данном случае фиксация обезьян и введение препаратов), у макак резус регистрируется высокий разброс показателей лейкоцитов и лимфоцитов – от 4 до 87 %. В наших испытаниях животные обеих групп оказались очень чувствительными даже к разовому забору крови.

Концентрация основных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови подопытных животных в процессе испытаний не претерпела существенных изменений. В целом, содержание IgG, IgA и IgM в крови находилось в пределах 15-50 мг/мл, 4-10 мг/мл и 0,5-1,7 мг/мл, соответственно.

В отделяемом из носовой полости обезьян в норме обнаруживаются следующие грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы: *Staphylococcus epidermidis, Streptococcus viridans,* некоторые представители родов *Neisseria, Corynebacterium, Lactobacillus* и др., а также грибы рода *Candida*.

Смешанный характер роста с грамотрицательными бактериями, в частности, кишечной палочкой (E.coli), в количестве 1-8 колоний (при испытаниях препарата серии №1) или 1-10 колоний (при испытаниях препарата серий №2 и №3) был отмечен у каждой обезьяны, что свидетельствует о банальной загрязненности полости носа у такого рода животных. Чаще выделялись грамположительные кокки *Staphylococcus spp.*, а именно, *S.aureus* (у двух животных опытной группы до введения препарата серии №1 и в двух случаях – как в опытной, так и в контрольной группе, причем данный микроорганизм отличался обильным ростом – при введении препарата серий №2 и №3), грамположительные микрококки, диплококки, сарцины, грамотрицательные кокки *Neisseria spp.*, неферментирующие грамотрицательные палочки, грамположительные палочки. Грибы рода *Candida* у животных, задействованных для испытания препарата серии №1, обнаружены не были, а у животных, задействованных для испытания препарата серий №2 и №3 – были (единичные колонии). Отмечено также, что после введения препаратов серий №2 и №3 рост единичных микроорганизмов с лецитиназной активностью отсутствовал.

В испытаниях участвовали здоровые животные, поэтому каких-либо характерных изменений количественного и качественного состава

микрофлоры носа во время испытания трех серий препарата «КИП назальный» выявлено не было. Исследование возможного санирующего эффекта препарата не входило в задачу данных исследований на безвредность, тем более что срок повторного посева составлял более двух недель от момента окончания введения КИП. Тем не менее, необходимо отметить, что у двух опытных макаков до введения КИП серии №1 обнаруживался S.aureus, тогда как после введения препарата он из мазков слизистой носа не выделялся. Подобное наблюдение можно связать с наличием в препарате выявленных нами специфических антител разных изотипов к комплексному антигену стафилококка. В препарате серий №2 и №3 антистафилококковые антитела не определялись. При испытании этих серий у двух особей (одной опытной и одной контрольной) в мазке из носовой полости обнаруживался золотистый стафилококк, не исчезнувший при повторном обследовании. Таким образом, по результатам двух этапов испытаний у двух из трех обезьян опытных групп с высевавшимся из носовой полости S.aureus произошла санация от этого возбудителя.

Выводы. Таким образом, испытания на обезьяньей модели продемонстрировали хорошую переносимость нового иммунобиологического препарата «КИП назальный». Не было отмечено негативного влияния на поведение и общее состояние животных. Не зафиксировано повышение температуры, изменение массы тела, наличие каких-либо катаральных, диспептических явлений или симптомов интоксикации. Препарат не оказывал существенного влияния на показатели общего анализа крови.

Поскольку в опытах участвовали здоровые животные, во время испытаний не выявлено каких-либо характерных изменений количественного и качественного состава микрофлоры носа обезьян. Тем не менее, бактериологический анализ показал возможность санации носовой полости от представителей патогенной микрофлоры при использовании интраназальной лекарственной формы КИП.

Литература

1. В.М.Русанов, Л.И.Скобелев. Фракционирование белков плазмы крови в производстве препаратов крови. М., «Медицина», 1983. – 224 с.

2. Оприщенко С.А., Захаров В.В., Русанов В.М. Лечебные препараты крови в современной медицине. М. ИД «Медпрактика-М», 2011. – 328 с.
3. Руководство по вакцинному и сывороточному делу /Под редакцией П.Н.Бургасова. – М., «Медицина», 1978. – 440 с.
4. В.А.Алешкин, И.В.Борисова, Л.И.Новикова и др. Разработка новых лечебных препаратов для профилактики и терапии инфекционных заболеваний /Проблемы медицинской биотехнологии и иммунологии инфекционных болезней. – Сб. научных трудов МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского. – М, 1996. – С.7-20.
5. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии /Под ред. Г.Г.Онищенко, В.А.Алешкина, С.С.Афанасьева, В.В.Поспеловой. – М.:ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. – 608 с.

ИТОГИ ИЗУЧЕНИЯ ЛИМФОИДНЫХ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИМАТОВ. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Агрба В.З.[1], Лапин Б.А.[1], Яковлева Л.А.[1], Тимановская В.В.[2], Инджия Л.В.[1], Деменкова Н.П.[1], Порханов В.А.[4], Коноплянников А.Г.[3], Кальсина С.Ш.[3], Сангулия И.А.[2], Кове Э.М.[2], Карал-оглы Д.Д.[1], Гвоздик Т.Е.[1], Мухаметзянова Е.И.[1], Аравиашвили Д.Э.[1], Чугуев Ю.П.[1], Клоц И.Н.[1], Чувиров Г.Н.[2], Миквабия З.Я.[2]

[1].ФГБНУ « НИИ медицинской приматологии», г. Сочи-А, Россия
[2].НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, г.Сухум, Абхазия
[3].ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» имени А.Ф.Цыба, филиал «НМИРЦ» МЗ РФ. Обнинск, Калужской обл., Россия
[4].ГБУЗ «НИИ - Краевая клиническая больница № 1 им. профессора С.В. Очаповского» министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия
E-mail: agrba_vz@mail.ru

Резюме

Описаны итоги изучения лимфоидных суспензионных клеточных культур приматов. Суммированы результаты изучения морфо-биоло-

гических, иммунологических характеристик, определены онкогенные потенции клеток выведенных культур. Установлена антигенная мозаика культивированных клеток и показано, что в них с разной степенью экспрессии представлены клетки как В- , так и Т-клеточной принадлежности. Онкогенность клеток обезьяньих культур выявлена в 25-100 % случаев. Сделано заключение, что установленные культуры клеток приматов могут быть использованы в лабораторной практике в качестве тест-систем и в научных целях. Ведутся поиски перспективных путей внедрения в медицинскую практику клеточной терапии, в частности, мезенхимальных стволовых клеток приматов. Описаны биологические характеристики клеток и определены критерии их «стволовости». В качестве биомоделей для изучения были использованы экспериментальный инфаркт миокарда и медикаментозно (с помощью антибиотика доксорубицина) индуцированная интоксикация. Показано, что трансплантация мезенхимальных стволовых клеток вызывает неоваскуляризацию и капилляризацию ишемизированного участка миокарда, а также уменьшает повреждения внутренних органов, вызванные доксорубицином.

Ключевые слова: стволовые клетки, доксорубицин, обезьяны

RESULTS OF STUDY OF LABORATORY PRIMATE LYMPHOID SUSPENSION CELL CULTURES. APPLICATION OF CELL TECHNOLOGIES IN REGENERATIVE MEDICINE

Agrba V.Z.[1], Lapin B.A.[1], Yakovleva L.A.[1], Timanovskaya V.V.[2], Indzhia L.V.[2], Demenkova N.P.[1], Porkhanov V.A.[4], Konopliannikov A.G.[3], Kalsina S.Sh.[3], Sangulia I.A.[2], Kove E.M.[2], Karal-ogly D.D.[1], Gvozdik T.E.[1], Mukhametzianova E.I.[1], Araviashvili D.E.[1], Chuguev Yu.P.[1], Klots I.N.[1], Chuvirov G.N.[2], Mikvabia Z.Ya.[2]

[1]FSBSI «RIMP», Sochi (Adler), Russia
[2]RI EPaT AAS, Sukhum, Abkhazia
[3]FSBI «A. Tsyb MRSC», Obninsk, Russia
[4]The regional clinical hospital №1, Krasnodar, Russia
E-mail: agrba_vz@mail.ru

Abstract

In this article, results of study of primate lymphoid suspension cell cultures are described. Results of research of morphobiological and immunological characteristics are summarized, oncological potency of obtained cultures is determined. Antigenic mosaic of cultured cells was found, and it was shown that B- and T-cells differing in antigen expression were present in cultures. Oncogenity of primate cells was found in 25 – 100 % of cases. It was concluded, that obtained cell cultures can be used in laboratory practice as test-systems and for research. In our laboratory, promising ways of cell therapy application in medical practice are studied, in particular, mesenchymal stem cells of primates. Biological characteristics of mesenchymal stem cells were described by us and criteria of their «stemness» were determined. Experimental myocardial infarction and medically induced intoxication (with help of antibiotic doxorubicin) were used as biomodels. In our work, it is shown that mesenchymal stem cells transplantation causes neovascularisation and capillarization of the ischemic part of myocardium and also decreases damages of internal organs caused by doxorubicin.

Key words: stem cells, doxorubicin, primates

Введение.

Настоящее сообщение является результатом совместных исследований научных коллективов России и Абхазии. Представлены итоги долгосрочных исследований злокачественных лимфом в отряде приматов, выполненных под руководством академика Лапина Б.А. К началу исследований вируспродуцирующих лимфоидных суспензионных культур клеток приматов в нашей стране не существовало, однако, к тому времени в лимфоидной суспензионной культуре, полученной Эпстайном от больного лимфомой Беркитта человека в Уганде, уже была выведена первая в мире лимфоидная линия, продуцирующая лимфотропный онкогенный вирус, названный вирусом Эпстайна-Барр (ВЭБ).

Вспышка злокачественной лимфомы в Сухумском стаде павианов, равно как и воспроизведение заболевания у обезьян 2 видов (павианов и макаков) инокуляцией лейкемической кровью людей и обезьян,

предполагали наличие вектора, выделение которого стало возможным лишь после культивирования опухолевых клеток in vitro. В процессе культивирования опухолевых клеток обезьян была выведена серия лимфоидных суспензионных культур клеток павианов гамадрилов, макаков бурых, зеленых мартышек, в клетках которых были обнаружены опухолевые вирусы. В настоящем сообщении суммированы результаты изучения морфо-биологических и иммунологических характеристик этих культур.

Мезенхимальная стволовая клетка (МСК) рассматривается как один из основных компонентов физиологической регенерации поврежденных клеток и тканей, а также «аварийной» репарации при различных заболеваниях и травмах [6,8]. Развитие этих исследований может служить научным обоснованием для разработки и совершенствования оптимальных стратегий клеточной терапии, основанной на локальной или системной трансплантации МСК [1,2,5]. В последние годы установлены многие физиологические закономерности, которые сделали выбор обезьян в качестве объекта для экспериментальной деятельности наиболее рациональным. Анализ многочисленных данных позволял прийти к заключению, что экспериментальное использование обезьян дает результаты, которые с минимальной коррекцией можно переносить на людей. Представлялось важным испытание трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для восстановления поврежденных тканей [1,2,5].

Целью исследований на лабораторных приматах явились поиск и определение спектра новых возможностей использования обезьян для медико-биологических целей, включая моделирование на них социально опасных заболеваний человека и разработку методов их терапии, в том числе использование клеточных технологий.

Методы исследования. Были использованы культуральные методы. Лимфоидные суспензионные культуры обезьян выводили из клеток лимфоидных опухолей лимфоматозных обезьян и клеток крови ранее описанным методом [1]. Культуры МСК выводили из клеток костного мозга обезьян, аспирацию которого осуществляли у транквилизированных обезьян с помощью игл для миелоаспирации Mielo-CAN («Sterylab») из головки плечевой кости и подвергали дальнейшему культивированию стандартным методом [2].

Инфаркт миокарда воспроизводили путем передней торакотомии и вскрытия перикарда. Были визуализированы, прошиты и перевязаны на границе средней и верхней трети коронарная и передняя нисходящая артерии. Макроскопически определялась зона ишемии миокарда дистальнее перевязанных сосудов. Определялась активность фермента креатинкиназы (КК) и её мышечной фракции (КК – МВ) на биохимическом анализаторе. Ранний маркер повреждения миокарда белок тропонин-1 также исследовали иммуноферментным методом [6].

Для воспроизведения медикаментозной патологии был использован Доксорубицин-ЛЭНС. 0,1% раствор препарата, разведенный на воде для инъекций, вводили внутривенно, капельно в течение 30 минут. Мониторинг состояния физиологических систем организма обезьян после введения ДРЦ включал: оценку общего клинического состояния обезьян, изучение гематологических параметров, биохимических показателей, содержание в крови клеток, несущих В-клеточный маркер, концентрацию провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α, а также содержание С-реактивного протеина (СРП).

Гематологический анализ крови обезьян проводили на гематологическом анализаторе «Beckman AcT 5 diff CP» фирмы «Beckman Coulter», USA.

Биохимический анализ сывороток крови обезьян проводили на полуавтоматическом биоанализаторе «BioChem SA» (High Technology, Inc.,USA) с набором реактивов этой же фирмы.

Иммунофенотипический анализ клеток проводили с помощью проточной цитофлюориметрии на проточном цитометре («Beckman Coulter Epics XL-MCL»). Для иммунофенотипирования клеток использовали меченные флюорохромами моноклональные антитела (МоАТ) («Becton Dickinson»), специфичные к антигенам клеток обезьян.

Результаты и их обсуждение. Культивируя опухолевые клетки обезьян и людей, равно как и клетки гемопоэтических органов клинически здоровых обезьян, но из стада повышенного по лимфоме риска, мы вывели серию лимфоидных суспензионных культур клеток павианов гамадрилов, макаков бурых, зеленых мартышек. В лимфоидных клетках культур обезьян электронно-микроскопически определяли 3 типа вирусов:

1) авирус с морфологической структурой вируса герпеса, отнесенный к ВЭБ-подобным онкогенным вирусам, позже (в силу своей биологической уникальности) названный ГПВ;

2) вирус с морфологической структурой ретровируса типа С, отнесенный к семейству HTLV-1, позже верифицированный как STLV-1;

3) пенящий вирус обезьян I-III типов, в высоком проценте естественно инфицирующий обезьян, обладающий выраженным цитопатическим действием и наносящий серьезный ущерб индустрии культивирования клеток приматов.

Прослежены этапы становления лимфоидных культур обезьян. Изучены их морфоструктурные и биологические свойства. Основным структурным элементом всех без исключения лимфоидных культур приматов является лимфобластоидная клетка, имеющая размеры 12-15 мкм, но иногда достигающая гигантских размеров – 32 мкм. Выражен полиморфизм клеток, основную часть которых составляло ядро с 1-3 нуклеолами (рис. 1). Часто во всех культурах определялись клетки в состоянии митотического деления. Отдельные митозы были уродливыми, асимметричными (трех-четырехполюсными). При ультраструктурном исследовании по характеру ядра клетки культур можно было разделить на два типа: на клетки, имеющие округлое неразделенное ядро и клетки, ядра которых имели глубокое вдавление, часто разделяющее его на фрагменты. Кроме элементов, имеющих структуру лимфобластов, в культурах встречались немногочисленные плазматические клетки, плазмобласты и макрофаги. Цитохимическое исследование установило сходство клеток человеческого и обезьяньего происхождения. Из биологических свойств лимфоидных культур обезьян особое место занимает изучение их онкогенных потенций. Клетки указанных культур в 25-100% случаев способны индуцировать смертельную злокачественную лимфому у беспородных кроликов. Особое место в этом плане занимают лимфоидные культуры, выведенные от макаков бурых (Macaca arctoides). При введении кроликам как клеток, так и бесклеточной культуральной жидкости этих культур, продуцирующих 2 типа онкогенных вирусов (ВЭБ-подобный и STLV-1), у них в 100% случаев возникали злокачественные лимфомы. Что касается павианьих культур, то введение этих клеток 6-дневным павианам приводило к развитию у них волнообразно протекающего лимфопролифера-

тивного состояния, характеризующегося увеличением селезенки, лимфатических узлов всех групп, лимфоцитозом в периферической крови. Указанное лимфопролиферативное состояние не развивалось в злокачественную лимфому в течение длительного периода наблюдения за инокулированными животными и определялось как предлимфома.

В ходе изучения иммунофенотипических характеристик клеток культур, которое стало возможным в связи с появлением широкой панели МоАТ к дифференцировочным антигенам В- и Т-клеток человека с использованием иммуноферментных методов и проточной цитофлюориметрии, была установлена выраженная антигенная мозаика культивируемых in vitro клеток обезьян, независимо от их происхождения, сроков культивирования и длительности криоконсервации. Практически все обезьяньи культуры в той или иной степени содержали элементы как В-, так и Т- клеточной специфичности, в то время как широко распространенные в мировой лабораторной практике опухолевые культуры человека Raji и P3HR-1 состояли исключительно из В-клеток, но с различной степенью экспрессии В-клеточных маркеров. Например, В-клеточный маркер кластера CD19 в культуре Raji содержался в 74,4% клеток, а в культуре P3HR-1 – в 1,1%, CD20 – в Raji был представлен в 34,5%, а в P3HR-1 – 0,5%.

Одновременное наличие клеток различной иммунологической принадлежности в одних и тех же культурах павианов, макаков и зеленых мартышек свидетельствует не только о смешанноклеточном характере культур обезьян, но и позволяет предположить экспрессию маркеров различной иммунологической принадлежности на одних и тех же клетках, как это уже было показано при иммунологическом тестировании клеток злокачественных лимфом павианов с помощью трехцветной цитофлюориметрии, когда на Т-клетках экспрессировались маркеры В-клеток CD40 и Bgp95.

Используя указанный иммунологический критерий, мы смогли выведенные нами культуры разделить на 4 типа:

1) строго В-клеточные,
2) преимущественно В-клеточные,
3) смешанно В- и Т-клеточные,
4) преимущественно Т-клеточные.

Выведенные и охарактеризованные обезьяньи лимфоидные куль-

туры клеток можно использовать в качестве тест-модели для испытания новых появляющихся на рынке медикаментов МоАТ (учитывая тот факт, что при испытании на клетках наших культур МоАТ широко известной фармацевтической фирмы DAKO и отечественного производителя фирмы «Сорбент» получены практически однозначные результаты). Выведенные нами культуры незаменимы при изучении клеточной биологии, в экспериментальной онкологии при моделировании опухолевых состояний и в других целях.

Используя опыт, полученный нами при выведении, культивировании и криоконсервации клеток лимфоидных культур приматов, мы начали исследования по выведению, поддержанию в культуре и изучению мезенхимальных стволовых клеток (МСК) приматов в рамках Государственной программы «Новые клеточные технологии – медицине (стволовая клетка)» и «Регенеративная медицина»[15].

В настоящее время одним из перспективных путей внедрения в медицинскую практику достижений клеточной биологии является трансплантация стволовых клеток с целью замещения в организме поврежденных клеток и тканей. Эти методы широко разрабатываются в эксперименте на лабораторных животных, но на обезьянах они ведутся весьма ограниченно. Концепция стволовой клетки принадлежит русскому ученому Александру Максимову, исследовавшему процессы кроветворения. Термин «стволовая клетка» впервые был употреблен им в 1908 году на съезде гематологического общества в Берлине. Так он назвал клетку-родоначальницу и предположил, что она специализируется (дифференцируется) в различные типы клеток крови под действием сигналов из крови или организма.

В 1960-1970 гг. советский ученый Александр Яковлевич Фриденштейн обнаружил в костном мозге не только кроветворные, но и мезенхимальные (стромальные) стволовые клетки и впервые получил культуры этих клеток.

В 1999 г. журнал Science признал открытие стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии XX века после расшифровки двойной спирали ДНК и программы «Геном человека».

На основании изучения иерархии стволовой клетки было сформулировано определение стволовой клетки соматических тканей:

тканевая стволовая клетка – это клетка, способная дифференциро-

ваться во все типы клеток данной ткани и обеспечивать ее восстановление в ответ на внешние сигналы (повреждение, воспаление и т.д.).

Успехи в изучении стволовых клеток привели к созданию новых клеточных технологий в медицине. В экспериментах на животных и в ряде клинических исследований в нашей стране и за рубежом показано, что инъекция стволовых клеток может восстанавливать морфологию и усиливать функцию ряда тканей.

Выдающиеся успехи в изучении стволовых клеток и клеточной терапии привели к появлению нового направления, называемого «регенеративная медицина». Клеточная терапия должна применяться, прежде всего, для борьбы с фатальными, неизлечимыми болезнями, такими, например, как сахарный диабет, нейродегенеративные расстройства, сердечная недостаточность, хроническая почечная недостаточность и др.[7,8,10]. Т.к. методы клеточной терапии начали использоваться относительно недавно и отсутствуют сведения об отдаленных результатах этой терапии, едва ли стоит применять эти подходы для лечения тех болезней, которые не представляют опасности для жизни и могут быть излечены традиционными фармакологическими препаратами [14, 15].

Клеточная терапия проводится путем выделения клеток из костного мозга, жировой ткани, кожи, крови и др. Затем осуществляется выращивание этих клеток в специальных питательных средах, что позволяет увеличивать число стволовых клеток без изменения их дифференцировочного потенциала или фенотипа [13].

В наших экспериментах прикрепление клеток костного мозга обезьян после эксплантации в культуру наблюдалось через 3-4 дня в виде единичных клеток и их скоплений на поверхности твердого субстрата. К 7-м суткам культивирования формировалась сеть вытянутых фибробластоподобных клеток, а к 10-14 суткам культивирования формировался плотный монослой мононуклеарных фибробластоподобных клеток. Клетки упаковывались параллельно друг другу, не изменяя размера и морфологии, оставаясь мононуклеарными на протяжении всего периода культивирования (рис. 2),[3].

В 2006 г. международное общество клеточной терапии предложило минимальный набор критериев для определения «стволовости» [17]. Среди них:

1) клетки, способны к адгезии на пластик в стандартных условиях культивирования;

2) под действием дифференцирующих агентов клетки способны дифференцироваться в клетки мезодермального происхождения;

3) клетки позитивны по таким антигенам, как CD90+, CD105+ и негативны по таким антигенам, как $CD34^-$, $CD45^-$ и HLA-DR.

Показано, что установленные нами культуры соответствуют критериям, определяющим их «стволовость», т.е. в них отсутствуют маркеры гемопоэтических клеток $CD34^-$, $CD45^-$, HLA-DR -. Вместе с тем CD90+ и CD105+ антигены экспрессировались на культивируемых клетках на уровне 94-97% [14]. Полученный клеточный материал биобезопасен [4, 11].

Учитывая активное применение клеточных технологий в регенеративной терапии, мы также проводили эксперименты по использованию МСК в качестве заместительной клеточной терапии при экспериментально индуцированном инфаркте миокарда у павианов гамадрилов (рис. 3, 4). После наложения лигатуры на переднюю коронарную артерию обезьяне трансплантировали МСК внутривенно в количестве 2 млн клеток на 1 кг веса тела. Содержание раннего маркера повреждения миокарда тропонина-1 в сыворотке крови обезьян уже через 2 часа после наложения лигатуры на коронарные сосуды повышалось в 23-30 раз и продолжало нарастать, достигая максимальных значений через 6-24 часа, а затем постепенно снижалось. Такая же картина наблюдалась при исследовании ферментов креатинкиназы (КК) и ее мышечной фракции (КК-МВ). Экспериментально воспроизведенный инфаркт миокарда был подтвержден и на ЭКГ. При гистологическом исследовании препаратов сердца, приготовленных из взятых на аутопсии органов, наблюдалась васкуляризация и капилляризация миокарда у опытной обезьяны как следствие трансплантации МСК.

Т.о., полученные результаты свидетельствуют об ангиогенезе, основанном на процессах неоваскуляризации и капилляризации ишемизированного участка миокарда, вызванных трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток у павиана гамадрила, у которого был воспроизведен экспериментальный инфаркт миокарда [6].

Лабораторные приматы оказались также адекватной моделью для осуществления попыток снижения токсического действия используемого в онкологической практике антибиотика антрациклинового ряда Док-

сорубицина (ДРЦ). Клиническая картина интоксикации после введения ДРЦ обезьянам оказалась сходной с таковой у людей [16]. Через 24 часа после введения ДРЦ число $CD20^{+}$ позитивных клеток, как и следовало ожидать, существенно снижается относительно нормативных показателей [9], а в некоторых случаях они исчезают вовсе. После окончания курса введения ДРЦ по данным патолого-анатомического вскрытия у обезьян определяется дистрофия внутренних органов. Обезвоживание, анемия, кахексия являлись ведущими клиническими симптомами. МСК, трансплантированные через 24 часа после введения ДРЦ, удлиняют срок жизни животных до 120 дней. Срок жизни обезьян, получивших трансплантацию МСК за 24 часа до введения ДРЦ, составлял 50-74 дня. Одна контрольная обезьяна, получившая физиологический раствор после введения ДРЦ, прожила 24 дня, а другая – 1 год 8 месяцев. В этом случае, возможно, имела место лекарственная устойчивость к противоопухолевым препаратам – явление, возникающее у людей почти в 50% клинических случаев и связанное с гликопротеином Pgp 170, обеспечивающим экскрецию из организма токсинов и др. [12,18].

Исследования на животных проводили в соответствии с требованиями комитета по биоэтике и положениями следующих документов: Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.); Директивы 2010/63EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г.; Федерального закона РФ о защите животных от жестокого обращения от 01 декабря 1999. (ст.4 «Основные принципы обращения с животными»).

Выводы. 1. Изучены, охарактеризованы, классифицированы и сохранены в криобанке полученные от лабораторных приматов лимфоидные клеточные культуры, имеющие большое научно-практическое значение.

2. Получены и охарактеризованы культуры мезенхимальных стволовых клеток (МСК) лабораторных приматов.

3. Показана роль МСК в восстановительной терапии при экспериментальном инфаркте миокарда.

4. На лабораторных приматах получена модель ДРЦ-индуцированной патологии, сходной с таковой у человека.

5. Показана в ряде случаев способность МСК экранировать органы-мишени от токсического воздействия ДРЦ.

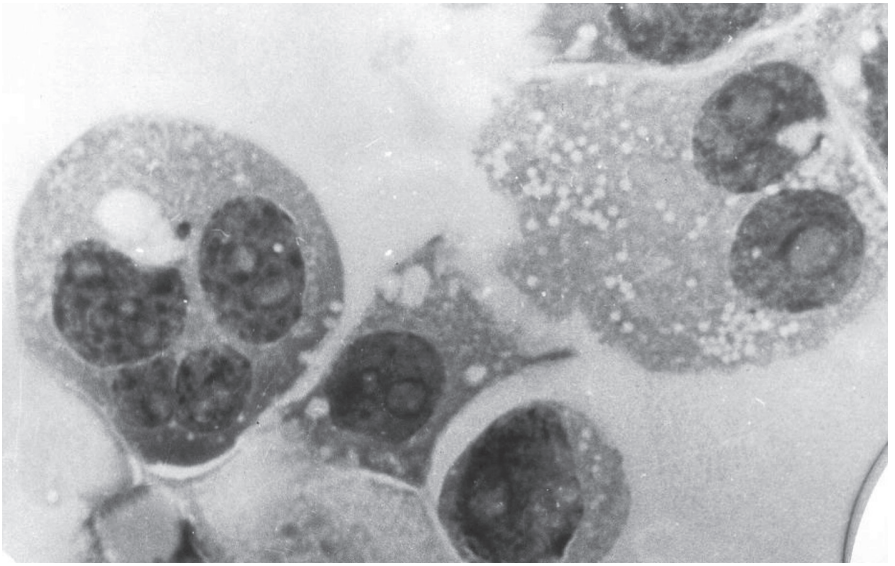


Рис. 1. *Полиморфизм клеток в лимфоидной культуре. Х 1200*

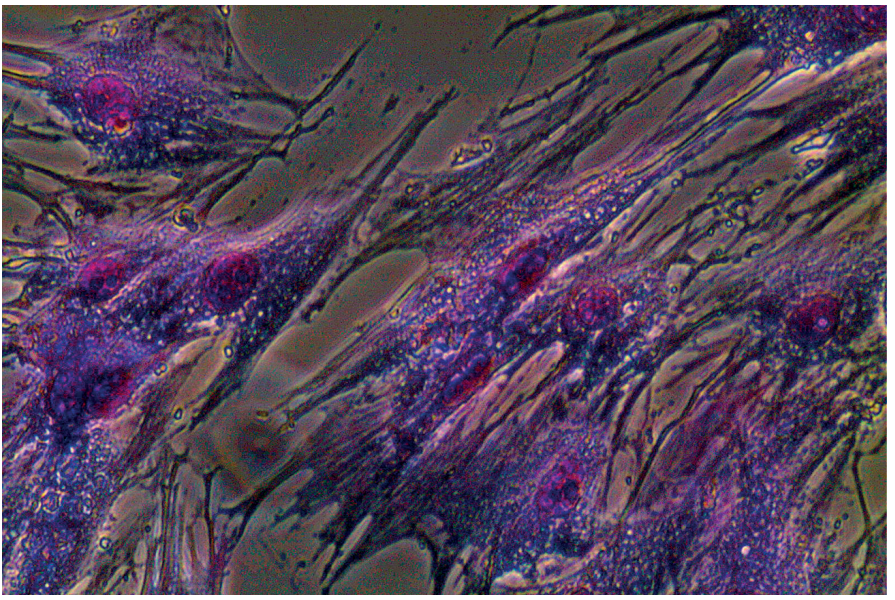


Рис. 2. *Мезенхимальные стволовые клетки павиана гамадрила. Окраска гематоксилин-эозин, х 500*

Рис. 3. *Рабочий процесс воспроизведения экспериментального инфаркта миокарда*

Рис. 4. *Павианы гамадрилы с экспериментальным инфарктом миокарда*

Литература

1. Агрба В.З., Лапин Б.А, Порханов В.А., Яковлева Л.А., Коноплянников А.Г., Тимановскя В.В., Гвоздик Т.Е., Кальсина С.Ш., Карал-оглы Д.Д., Агумава А.А., Чугуев Ю.П., Леонтюк А.В., Гварамия И.А., Игнатова И.Е. Культуры лимфоидных стволовых клеток приматов и их использование в медико-биологических исследованиях // Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии: Материалы второй международной научной конференции. – Сочи-Адлер, 2011. – Т. 2. – С. 191 – 200.
2. Агрба В.З., Порханов В.А., Коноплянников А.Г., Кальсина С.Ш. , Карал-оглы Д.Д., Игнатова И.Е., Гвоздик Т.Е., Агумава А.А., Леонтюк А.В., Лапин Б.А. Возможные аспекты использования культур стволовых клеток лабораторных приматов в экспериментальной медицине // Клеточные технологии в биологии и медицине – 2012. – № 3. – С.139-142.
3. Агрба В.З., Лапин Б.А., Порханов В.А., Коноплянников А.Г., Кальсина С.Ш., Карал-оглы Д.Д., Агумава А.А., Леонтюк А.В., Игнатова И.Е. Культуры мезенхимальных стволовых клеток лабораторных приматов и перспективы их использования в экспериментальной медицине // Стволовые клетки и регенеративная медицина / Под редакцией В.А. Ткачука. – Москва: МАКС Пресс, 2012. – С. 23 – 29.
4. Агрба В.З., Лубяко А.А., Аравиашвили Д.Э., Карал-оглы Д.Д., Чугуев Ю.П., Игнатова И.Е., Сергеева Н.В., Гварамия И.А., Русия А.Г., Буданов Р.В. Исследование биологической безопасности инкрета жизненно важных паренхиматозных органов, полученного в результате изолированной экстракорпоральной перфузии ксеногенного материала // Биозащита и биобезопасность / Москва: ВЕЛТ, 2013. – Т. 5, № 1. – С. 44 – 58.
5. Агрба В.З., Лубяко А.А., Аравиашвили Д.Э., Карал-оглы Д.Д., Чугуев Ю.П., Игнатова И.Е., Сергеева Н.В., Гварамия И.А., Русия А.Г., Петрова Е.С. Доклинические исследования параметров биологической безопасности методов клеточной, тканевой и органной терапии (тезисы) // Актуальные проблемы диагностики, профилактики и лечения профессионально обусловленных заболеваний: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Сочи, 2013. – С. 143 – 145.
6. Агрба В.З., Порханов В.А., Карал-оглы Д.Д., Леонтюк А.В., Коваленко А.Л., Шолин И.Ю., Гвоздик Т.Е., Игнатова И.Е., Агумава А.А., Чугуев Ю.П., Гварамия И.А., Лапин Б.А. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток приматов обезьянам с экспериментально индуцированным инфарктом миокарда // Клеточные технологии в биологии и медицине – 2015. – № 4. – С. 286 – 288.

7. Агрба В.З., Аравиашвили Д.Э., Башлыков Д.В., Башлыкова А.Н., Буданов Р.В., Гайдова О.С., Гварамия И.А. и др. Усовершенствованные способы клеточной, тканевой и органной восстановительной терапии. – СПб.: НАУКА, 2015. – 361 с.
8. Агрба В.З., Карал-оглы Д.Д., Кальсина С.Ш., Гвоздик Т.Е., Капланян П.А., Гварамия И.А., Мухаметзянова Е.И., Чугуев Ю.П., Шамсутдинова О.А., Клоц И.Н., Порханов В.А., Аравиашвили Д.Э., Лапин Б.А., Орлов С.В. Показатели функционирования физиологических систем организма обезьян после введения ДРЦ (доксорубицина) и трансплантации стволовых клеток // Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии: Материалы Сочинской третьей международной научной конференции. – Сочи-Адлер, 2016. – Т. 1. – С. 260 – 271.
9. Игнатова И.Е, Агрба В.З., Карал-оглы Д.Д. Нормативные показатели клеточного звена иммунитета у макаков яванских (Macaca fascicularis) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2014. – Т.157, №2. – С. 231 – 234.
10. Романов Ю.А., Смирнов В.Н. Мезенхимальные стволовые клетки: биология и перспективы клинического применения // Биология стволовых клеток и клеточные технологии / Москва: «Медицина», «Шико», 2009. – С. 193 – 205.
11. Русия А.Г., Петрова Е.С., Карал-оглы Д.Д., Аравиашвили Д.Э., Игнатова И.Е., Сергеева Н.В., Гварамия И.А., Агрба В.З. Биологическая безопасность методов клеточной, тканевой и органной восстановительной терапии // Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии: Материалы Сочинской третьей международной научной конференции. – Сочи-Адлер, 2016. – Т. 1. – С. 295 – 304.
12. Ставровская А.А., Генс Г.П. Новое в изучении множественной лекарственной устойчивости клеток рака молочной железы // Успехи молекулярной онкологии – 2015. – Т.2, № 1. – С. 39-51.
13. Цыб Ф.Ф., Коноплянников А.Г., Колесникова А.И. и др. Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека // Вестник РАМН – 2004. – №9. – С. 71 – 76.
14. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Крашенинникова М.Е. и др. Экспериментальное обоснование эффективности применения стволовых и прогениторных клеток костного мозга для регуляции восстановительных прцессов в органах при остром и хроническом повреждениях // Вестник РАМН – 2004. – № 9. – С. 44 – 47.
15. Agrba V.Z., Porkhanov V.A., Konoplyannykov A.G., Kal'sina S.Sh., Karal-ogly D.D., Inatova I.E., Gvozdik T.E., Agumava A.A., Leontiuk A.V., Lapin B.A. Possible

aspects of using cultured stem cell of laboratory primates in experimental medicine // Bulletin of Experimental Biology and Medicine – 2012. – V.154, № 1. – P. 133 – 135.
16. Cruet-Hennequart S., Prendergast M., Shaw. G, Barry F.P., Carty M.P. Doxorubicin induces the DNA damage response in cultured human mesenchymal stem cells // International Journal of Hematology – 2012. – V. 96, № 5. – P. 649 – 656.
17. Dominici M., Le Blank K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The Internationalal Society for cellular Therapy position statement // Cytotherapy – 2006. – V. 8, № 4. – P. 315 – 317.
18. Gillet J.P., Gottesman M.M. Mechanisms of multidrug resistance in cancer // Methods in Molecular Biology – 2010. – V. 596. – P. 47-76.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА ВИРУСИНДУЦИРОВАННЫЙ ОПУХОЛЕВЫЙ ПРОЦЕСС У КРОЛИКОВ

Тимановская В.В.[1], Агрба В.З.[2], Миквабия З.Я.[2], Саджая Е.Н.[2], Киласония Э.Ф.[2], Аргун Э.Н[2].

[1]Научно-исследовательский Институт экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия

[2]ФГБНУ Научно-исследовательский институт медицинской приматологии ФАН России, г. Сочи, Россия.

Резюме

В эксперименте исследовали действие антибиотика доксорубицина на опухолевый процесс – злокачественную лимфому у кроликов, вызванную введением двух вирусов макак бурых: В-лимфотропного вируса герпеса и Т-лимфотропногоретровирусаSTLV-1. После однократного введения кроликам доксорубицина внутривенно и четырехкратного в подколенные опухолевые лимфатические узлы, прослежен локальный противоопухолевый эффект. Значительно увеличенные подколенные узлы не пальпировались. В биоптатах, взятых из опухолевых узлов, в

динамике обнаружены изменения клеточного состава, элиминация опухолевых клеток и замещение лимфоцитами и жировой тканью.

Ключевые слова: лимфома, доксорубицин, В-и Т-лимфотропные вирусы обезьян.

THE EFFECT OF DOXORUBICIN ON THE VIRUS-INDUCED TUMOR PROCESS IN RABBITS

Timanovskaya V. V.[1], Agrba, V. Z.[2], Mikvabia Z. J.[2], Sajaia E. N.[2], Kilasonia E. F.[2], Argun, E. N[2].

[1]Scientific research Institute of experimental pathology and therapy ANA, Sukhum, Abkhazia

[2]FEDERAL state scientific institution research Institute of medical Primatology FAN of Russia, Sochi, Russia.

Abstract

The effect of antibiotic doxorubicin on tumor processes like malignant lymphoma in rabbits caused by the introduction of two viruses in macaques brown: B-lymphotropic herpes virus and T-lymphotropic retrovirus STLV-1were researched in the experiment. A local antitumor effect was tracked after a single intravenously injection of doxorubicin to rabbits and four-time injection in tumor popliteal lymph nodes. Significantly, increased popliteal nodes were not palpated. In the bioptates taken from the tumor nodes in the dynamics were detected changes in the cellular composition, elimination of tumor cells and their replacement by lymphocytes and adipose tissue.

Key words: lymphoma, doxorubicin, B – and T-lymphotropic viruses of monkeys.

Среди множества клеточных линий, полученных в НИИЭПиТ от различных видов приматов, особый интерес представляет линия клеток МАЛ-1, полученная при культивировании лимфоцитов макаки бурой (Macaca arctoideslymphozites) (1). Клетки культуры МАЛ-1 продуцируют два вируса, В-лимфотропный вирус герпеса и Т-лимфотропныйретровирус STLV-1. Введение этих вирусовлинейным

кроликам, вызывает у них развитие опухолевого процесса – генерализованную злокачественную лимфому в 100% случаев. Процессулимфомообразования подвергаются все группы лимфотических узлов, а также печень, селезенка, почки. Срок жизникроликов после введения вируса составляет 1,5-2,5 месяца[4,9].Вирусиндуцированнаялимфома у кроликов стала экспериментальной моделью на которой проводились исследования противовирусного и противоопухолевого действия рядапрепаратов (ацикловир,наномагнетит,оксидмарганца и др.) как учеными НИИЭПиТ, так и совместно с учеными других институтов. Результаты этих исследований показали, что некоторые из испытуемых препаратов, вызывают локальный противоопухолевой эффект [2,7,8,6].

Настоящее сообщение посвящено результатам исследования действия антибиотика доксорубицина на вирусиндуцированный опухолевой процесс у кроликов.

Доксорубицин применяется в медицине для лечения широкого спектра онкологических заболеваний, оказывает антимитотическое и антипролиферативное действие, как на лимфоциты, так и на миелоциты. Механизм действия доксорубицина заключается во взаимодействии с ДНК, образованием свободных радикалов и прямом воздействий на мембраны клеток с подавлением синтеза нуклеиновых кислот. Клетки чувствительны к препарату в S- и G2-фазах. Эти свойства препарата выгодно отличают его от других, которые воздействуют на клетку только в S-фазе.

Материалы и методы.

В эксперименте применяли доксорубицин «ЛЭНС ФАРМ». Вирусным материалом являлась культуральная жидкость, на которой выращивались клетки культуры МАЛ-1.

Нелинейные кролики весом ~ 1 кг и возрастом 2 месяца в количестве 10.

Кролики были поделены на 3 группы, в каждой из которых выполнялся определенный фрагмент исследования, схема эксперимента отображена в Табл.1. как видно из таблицы, первая группа из 4-х кроликов, на них исследовалась токсичность доксорубицина.

Таблица 1.

№ группы	Количество кроликов	Вводимый материал доксорубицин		Срок наблюдения (месяцы)	Результат
		Доза (мг)	Место введения		
1	2 2	2 4	(по 0,5 в/в,0,5 в/м) (1,0 в/в, 1,0 в/м)	1	Отсутствие клинических проявлений
2	2	Безвирусная ростовая среда (мл)		1	Отсутствие клинических проявлений
		3	в/м		
3	4	Вируссодержащая ростовая среда(мл)		1	Увеличение подколенных лимфатических узлов
		3	в/м		

Схема эксперимента

Вторая группа, состоящая их 2-х кроликов являлось отрицательным контролем для вируса.

На 4-х кроликах третьей группы проверяли онкогенность вируса.

Результаты.

Наблюдение за экспериментальными кроликами течение 1 месяца не выявило клинических проявлений у животных первой и второй групп. В третьей группе у кроликов увеличились подколенные лимфатические узлы регионарные к месту введения вируса. Размер узлов варьировал: 2,5 на 2,5 см; 2,0-1,5 см; 1,0-1,0 см; 0,8-0,5 см. у всех кроликов из увеличенных подколенных лимфатических узлов был взят биоптат для цитологического исследования. При микроскопии во всех биоптатах, наряду с нормальными лимфацитами присутствовали опухолевые клетки. Но найболее выраженный опухолевой процесс, характеризующийся наличием большого количества молодых бластных клеток с нуклеолами со множеством митозов, обнаруживался в биоптатах значительно увеличенных лимфатических узлов (рис. 1.)

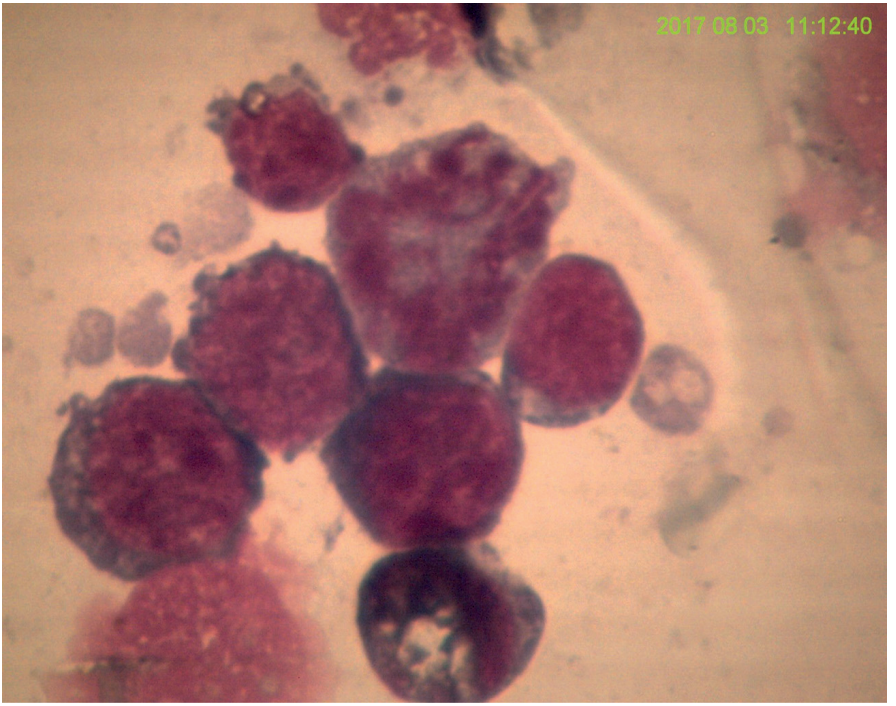


Рис.1. *Опухолевые клетки до введения доксорубицина х 2600*

Двух кроликов из третьей группы с незначительно увеличенными лимфатическими узлами оставили в качестве контроля к действию доксорубицина (обо эти кролика погибли через 1,5 – 2 месяца после заражения от генерализованной злокачественной лимфомы). Кроликов с большими лимфатическими узлами мы подвергли воздействию доксорубицином, дозами препарата, которые не были токсичны для кроликов третьей группы в течении одного месяца наблюдения. Таб.2.

Как видно из Таб.2, внутривенно доксорубицин был введен кроликам однократно, а в опухолевые узлы четырехкратно. Между 1 и 2 введением препарата интервал 3 недели, а последующие ведения – 2, 3, 4 осуществляли 1 раз в неделю.

Таблица 2.

Схема воздействия доксорубицином на опухолевые лимфатические узлы (о/у).

№ кролика	Величина о/у (см)	Вводимый материал – доксорубицин				Результат
		Доза (мг)	Место введения	Кратность (разы)	Интервал между введениями (недели)	
1	2,5 ×2,5	1,0 0,5	в/в о/у	1 4	3 – 1 – 1	о/у не пальпируются
2	2,0 ×1,5	1,0 0,5	в/в о/у	1 4	3 – 1 – 1	о/у не пальпируются

Первое введения препарата мы осуществили через месяц после заражения. Через 3 недели наблюдения, после первого введения доксорубицина, опухолевые узлы кроликов значительно уменьшились. Из узлов был взят биоптат на исследование. При микроскопии препаратов, приготовленных из биоптатов, было обнаружено большое количество опухолевых клеток с дегенеративными изменениями, клетки сохраняли оболочку, но содержимое ядер рыхлое, находящееся в состоянии распада, отдельные разрозненные глыбки хроматина смещены к цитоплазме, митозов не обнаружено. (Рис.2)

Перед каждым введением препарата у кроликов брали биоптат. Сравнения клеточного состава биоптатов из опухолевых узлов в динамике показало, что после третьего введения доксорубицина опухолевые клетки не обнаруживались (рис.3). В препаратах присутствовало большое количество лимфоцитов и жировой ткани.

Опухолевые подколенные лимфатические узлы после третьего введения препарата не пальпировались.

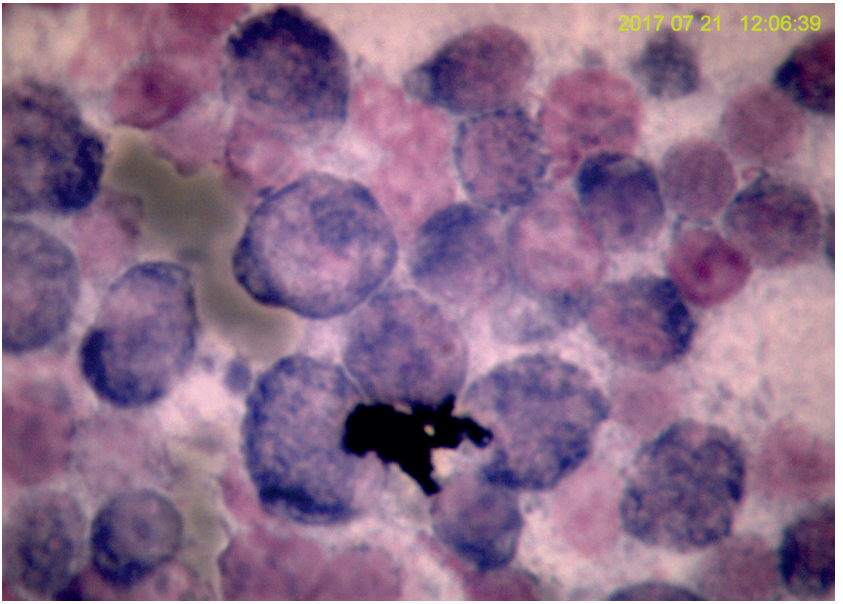


Рис.2. *Опухолевые клетки после первого введения доксорубицинах2600*

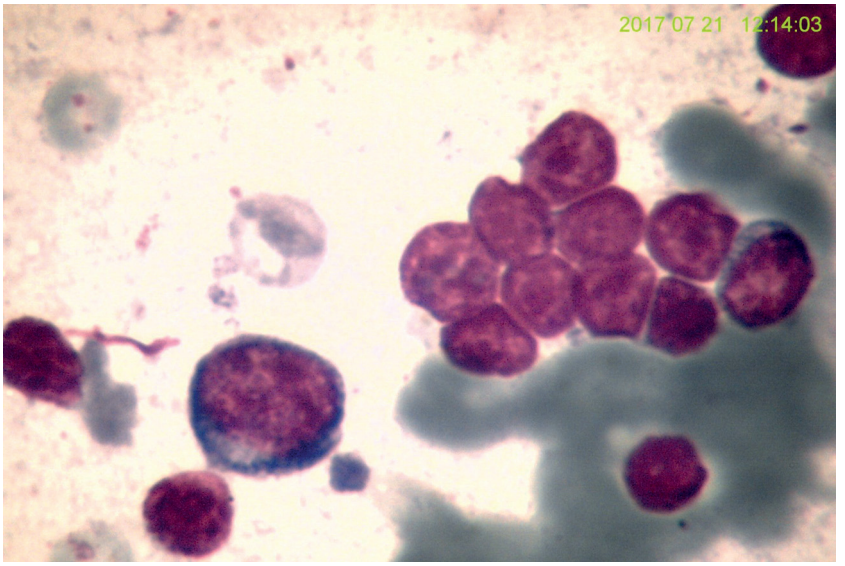


Рис.3. *После третьего введения доксорубицина х2600*

За кроликами ввели наблюдения 2 месяца после последнего введения доксорубицина, после чего кролики были забиты.

При визуальном осмотре на вскрытии: подколенные лимфатические узлы не увеличены, находятся в жировой прослойке, селезенка одного кролика незначительно увеличена, почки и печень без изменений. Микроскопия цитологических препаратов, приготовленных из перечисленных органов показала, что основная масса клеток представлена лимфоцитами и небольшим количеством опухолевых клеток. Митозы не обнаружены.

В препаратах, приготовленных из лимфатических узлов, клетки представлены лимфоцитами, эозинофилами, жировой тканью. Опухолевых клеток не обнаружено.

Выводы.

Таким образом, исходя из выше изложенного, можно проследить локальный противоопухолевый эффект доксорубицина в подколенных лимфатических узлах регионарных к месту введения вируса, а также снижение интенсивности опухолевого процесса в селезенке, почках, печени.

Литература

1. Агрба В.З., Тимановская В.В., Иванов М.Т. и др. Опыт получения постоянных лимфоидных суспензионных культур клеток приматов, продуцирующих В-лимфотропный вирус герпеса.//Вестник АМН ССР, 1987, 10, 75-78.
2. Алехин А.И.,Сергеева Т.В., Баркая В.С. и др. Применение в эксперименте лазерного воздействия с использованием фотосенсибилизатора при злокачественной лимфоме. Материалы второй международной научной конференции Сочи-Адлер, -С: Изд-во ООО «Стерх», 2011 с. 111-117.
3. Какубава В.В., Тимановская В.В., Дьяченко А.Г. Молекулярная биологическая характеристика В-лимфотропного вируса герпеса Macaca arctoides (ГВМА).// Первично локализованные опухоли кроветворной ткани приматов и пути их генерализации. 1986. Сухум с 55-57.
4. Тимановская В.В., Яковлева Л.А., Инджия Л.В. и др. Культура лимфоидных клеток обезьян Macaca arctoides МАЛ-1, продуцирующая лимфотропный вирус герпеса ГВМА.// Злокачественные лимфомы и ассоциированные с ними лимфотропные вирусы. М., 1986. 149-154.

5. Тимановская В.В., Яковлева Л.А., Воеводин А.Ф. и др. Злокачественные лимфомы у кроликов, вызванные введением материала, содержащего вирус герпеса макаковбурых.// Экспериментальная онкология. 1988. 3 , с 73-79.
6. Тимановская В.В., Яковлева Л.А., Агрба В.З. и др. Влияние ацикловира на продуктивный цикл В-лимфотропного герпес вирус, выделенного от обезьян Масаса arctoides// Материалы международной научной конференции. Сочи-Адлер, 2007, 183-189.
7. Тимановская В.В., Вольтер Е.Р., Миквабия З.Я. и др. исследование влияния наномагнетита и активной окиси марганца на продуктивный цикл В-лимфоцитарного герпесамакаков бурых, реплецирующегося в клетках культуры. Сборник научных трудов. Плесс, 2010, 258-263.
8. Тимановская В.В., Вольтер Е.Р., Киласония Э.Р. и др. Экспериментальное изучение влияния нанодисперсных частиц активной двуокиси марганца на рост опухоли. Актуальные проблемы современной науки. Ставрополь. 2013. 203-205.
9. Яковлева Л.А., Тимановская В.В., Инджия Л.В. и др. Моделированиезлокачественнойлимфомы на кроликах с помощью онкогенных вирусов приматов// БЭБМ. 1987.№3. с 336-338.

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ, ГЕМОСТАЗА И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ МАКАК ЯВАНСКИХ (MACACA FASCICULARIS) АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА

Карал-оглы Д.Д.[1], Деменкова Н.П.[1], Мухаметзянова Е.И.[1], Агумава А.А.[1], Бакшеева Е.В.[2], Клоц И.Н.[1],Агрба В.З.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (ФГБНУ «НИИ МП»)

[2] Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Краевая больница № 4»

Karal_5@mail.ru

Резюме

В работе были изучены показатели сердечно- сосудистой системы, гемостаза, гематологические показатели 18 клинически здоровых обе-

зьян (9 самок и 9 самцов) вида макака яванский (macaca fascicularis) Адлерского питомника. Была установлена значительная вариабельность в показателях крови у обезьян в каждой группе. Широкие индивидуальные колебания количества клеток белого ряда, прежде всего, связаны с резко выраженной у обезьян ориентировочно-оборонительной реакцией. Достоверное различие наблюдалось в показателях числа эритроцитов, гемоглобина и гематокрита между самцами и самками. Показатели гемостаза внутри групп животных варьировали значительно меньше. Вместе с тем, имелось достоверное различие в протромбиновом индексе между самцами и самками. Что касается показателей ЭКГ, несмотря на то, что в каждой группе животных они варьировали в больших пределах, достоверных различий между самцами и самками не выявлено.

Ключевые слова: ПВ- протромбиновое время, ПИ – протромбиновый индекс, АЧТВ- активированное частичное тромбопластиновое время, МСНС- средняя концентрация гемоглобина в эритроците, MCV-средний объем эритроцитов, МО- моноциты, RBC- эритроциты,WBC-лейкоциты, ЧСС-частота сердечных сокращений.

EVALUATION OF BLOOD, HEMOSTASIS AND CARDIOVASCULAR SYSTEM PARAMETERS OF THE LONG-TAILED MONKEYS (MACACA FASCICULARIS) IN ADLER MONKEY COLONY

Karal-ogly D.D.[1], Demenkova N.P.[1], Mukhametzyanova E.I.[1], Agumava A.A.[1], Baksheeva E.V.[2], Klots I.N.[1], Agrba V.Z.[1]

1-Federal State Budget Scientific Institution "The Research Institute of Medical Primatology" (FSBSI "NII MP")

2- State budgetary health care institution "Regional Hospital No. 4"

Abstract

The parameters of cardiovascular system, hemostasis, and hematologic indices of 18 clinically healthy Macaca fascicularis (9 females and 9 males) of the Adler monkey colony were studied. There was significant variability of blood parameters in each group of monkeys. Wide individual fluctuations

in the white blood cells numbers were associated with pronounced monkey tentative defensive reactions. However, only the values of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit differ significantly between males and females. The hemostasis parameters varied significantly less within groups of animals. At the same time, there was also a significant difference in prothrombin index values between males and females. In spite of the fact that ECG parameters in each group of animals varied very much, there were no significant differences in these parameters between males and females.

Key words: PV-prothrombin time, PI-prothrombin index, APTT-activated partial thromboplastin time, MCHC-mean hemoglobin concentration in erythrocyte, MCV-mean erythrocyte volume, MO-monocytes, RBC-erythrocytes, WBC-leukocytes, HR -heart rate

Введение

В силу анатомо-физиологического сходства с человеком, лабораторные приматы являются наиболее востребованным объектом для проведения доклинических испытаний. Доклиническое исследование биопрепаратов, планируемых для дальнейшего клинического использования, в модельных экспериментах на обезьянах является важным этапом предклинических испытаний [7,8]. Для корректной оценки данных, полученных на обезьянах, необходимы точные сведения о функционировании их физиологических систем в норме. В литературе широко представлены данные об обезьянах [5,6]. Приведены сведения о функционировании кроветворной [4,9], эндокринной[2], иммунной [1] и интерфероновой [1,3] систем обезьян. Однако, отсутствуют суммарные данные, полученные в комплексе на одних и тех же обезьянах. Многие исследуемые фармакопрепараты могут оказывать побочные действие на сердечно- сосудистую и кроветворную системы, в связи с чем необходимы достоверные данные о функционировании этих систем в норме.

Целью настоящего исследования явилось изучение клинического анализа крови, показателей гемостаза, а также состояния сердечно- сосудистой системы обезьян вида макака яванский Адлерского питомника.

Всего в эксперименте было использовано 18 клинически здоровых обезьян (9 самок и 9 самцов) Macaca fascicularis. Работа выполнялась согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации

(Приказ Министерства здравоохранения и соцразвития Российской Федерации №709 от 23,08,2010), а также в соответствии с требованиями федерального закона РФ о защите животных от жестокого обращения (ст.4 Закона РФ о защите животных от жестокого обращения от 01 декабря 1999 г.) и директивы №2010/63/EU, принятой Европейским Парламентом 22 сентября 2010 г.

Материалы и методы

Исследование проводили на 18 половозрелых макаках яванских-9 самках и 9 самцах возрастом 3-11 лет, весом от 2,0 до 4,2 кг. Животных содержали в индивидуальных клетках, оборудованных автоматическими поилками, при температуре 20-24^{0}С. Животные адаптировались к условиям содержания и персоналу в течение 1 месяца. Все исследования на животных проводили в строгом соответствии с требованиями комитета по биоэтике и федеральным законом РФ о защите животных от жестокого обращения. Условия содержания животных соответствуют стандартам, указанным в:

- ГОСТ Р 53434 – 2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»

- «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным МЗ СССР 06.07.1973 г. Каждое животное содержалось в индивидуальной клетке, размеры которой соответствуют нормам для содержания обезьян. Обезьяны получали стандартный корм, изготовленный на оборудовании и по рецепту компании Altromin, Germany. Стандартный корм дополнялся вареными яйцами,свежими фруктами и овощами. Каждая клетка оборудована индивидуальной системой водоснабжения и вода поступает без ограничений.

Электрокардиографическое исследование

Было проведено с использованием электрокардиографа «Полиспектр-8/ЕХ» в трех отведениях по Нэбу.

Гематологические исследования

Клинический анализ крови

Оценены следующие параметры:

количество эритроцитов, количество тромбоцитов, количество ретикулоцитов, количество лейкоцитов, лейкоцитарная формула, гемо-

глобин, гематокрит, СОЭ.Образцы для клинического анализа крови собирали в пробирки, содержащие 5% водный раствор ЭДТА.

Изучение гемостаза

Оценены следующие параметры:

протромбиновое время, протромбиновый индекс, активированное частичное тромбопластиновое время.

Для исследования гемостаза пробы крови в количестве 3,6 мл помещали в пробирки, содержащие цитрат натрия. Гемостаз определяли на анализаторе Коагулометр Sysmex CA500 Coagulation Analyser, Япония.

Статистический анализ.

Статистический анализ проведен с помощью T-test, хвосты=2, тип = 2.

Результаты считали статистически значимыми, если значение P окажется меньшим или равным 0,05.

Результаты

В **таблице 1-1 а** приведены статистически обработанные данные гематологического анализа самцов и самок в сравнительном аспекте.

При оценке показателей крови обращает на себя внимание вариабельность в показателях лейкоцитов, что можно объяснить выраженной ориентировочно-оборонительной реакцией у обезьян, а также влиянием стресса, испытываемого животными при заборе крови. Что касается остальных показателей, обращает внимание различие в показателях эритроцитов, гемоглобина между самцами и самками- у самцов эти показатели выше, что коррелирует с данными, приведенными для людей.

Большой интерес представляло изучение системы гемостаза у клинически здоровых животных (табл.2).

Анализируя показатели гемостаза, следует отметить различия в значениях протромбинового индекса между самцами и самками-у самцов они выше.

При сравнении показателей гемостаза обезьян с человеком следует учитывать вязкость крови приматов**.**

Для определения влияния исследуемых препаратов на сердечно-сосудистую систему обезьян необходимо знание о данных ЭКГ в норме, которые в литературе не представлены.

Данные ЭКГ приведены в таблице 3.

Таблица 1

Гематологические показатели самцов и самок макак яванских

№№ об-ян	Показатели гематологического анализа													
	RBC	**MCV**	**Hgb**	**MCH**	**MCHC**	**Hct**	**Plt**	**WBC**	**MO**	**EO**	**NE**	**BA**	**LY**	**СОЭ**
39083 ♂	**7,95**	**55**	**140**	**17,6**	**320**	**0,437**	**300**	**18,4**	**11,6**	**1,9**	**61,4**	**0,7**	**24,4**	**3**
39605 ♂	**7,78**	**56**	**143**	**18,4**	**330**	**0,432**	**370**	**18,4**	**6**	**1,6**	**23,2**	**0,8**	**51,3**	**1,5**
39672 ♂	**7,45**	**54**	**131**	**17,6**	**327**	**0,400**	**211**	**16,8**	**12,6**	**0,8**	**56,7**	**0,6**	**29,3**	**2,5**
38713 ♂	**7,73**	**53**	**129**	**16,7**	**316**	**0,409**	**308**	**14,7**	**14,7**	**1,8**	**54,7**	**0,7**	**28,1**	**2,5**
38547 ♂	**7,66**	**57**	**141**	**18,4**	**321**	**0,440**	**182**	**9,4**	**6,1**	**0,9**	**49,8**	**0,6**	**42,6**	**1,5**
39074 ♂	**8,17**	**54**	**137**	**16,8**	**311**	**0,442**	**386**	**13,3**	**4,9**	**1,1**	**41,7**	**0,8**	**51,5**	**1**
38557 ♂	**7,48**	**53**	**125**	**16,8**	**317**	**0,395**	**382**	**15,2**	**12,6**	**2,3**	**57,1**	**0,7**	**27,3**	**3**
38526 ♂	**4,56**	**52**	**77**	**16,9**	**324**	**0,238**	**207**	**11,7**	**12,0**	**2,6**	**47,9**	**0,7**	**36,8**	**3,5**
39166 ♂	**6,62**	**60**	**130**	**19,7**	**329**	**0,396**	**351**	**10,2**	**5,7**	**3,5**	**51,7**	**0,5**	**28,6**	**3**
M	**7,27**	**54,89**	**128,11**	**17,66**	**321,67**	**0,399**	**299,67**	**14,23**	**9,578**	**2,94**	**49,36**	**0,675**	**35,54**	**2,389**
m	**1,10**	**2,47**	**20,14**	**1,015**	**6,40**	**0,063**	**80,76**	**3,34**	**3,81**	**4,01**	**11,39**	**0,097**	**10,54**	**0,858**

Таблица 1а

№№ об-ян	Показатели гематологического анализа													
	RBC	**MCV**	**Hgb**	**MCH**	**MCHC**	**Hct**	**Plt**	**WBC**	**MO**	**EO**	**NE**	**BA**	**LY**	**СОЭ**
37454 ♀	**5,69**	**58**	**106**	**18,6**	**323**	**0,327**	**491**	**8,7**	**4,5**	**2,2**	**49,4**	**0,4**	**43,5**	**0,5**
37896 ♀	**6,03**	**57**	**107**	**17,8**	**314**	**0,342**	**245**	**13,3**	**5,7**	**1,6**	**52,2**	**0,5**	**40,0**	**5**
38676 ♀	**6,66**	**57**	**120**	**18,1**	**320**	**0,376**	**433**	**18,2**	**5,0**	**1,2**	**56,8**	**2,9**	**34,1**	**0,5**
38673 ♀	**6,67**	**56**	**119**	**17,8**	**318**	**0,374**	**290**	**12,9**	**4,3**	**1,3**	**67,8**	**0,4**	**26,2**	**1,5**
35770 ♀	**6,14**	**54**	**106**	**17,3**	**320**	**0,333**	**298**	**11,3**	**18,9**	**3,7**	**29,2**	**1,0**	**47,2**	**0.5**
38046 ♀	**4,85**	**61**	**97**	**20,1**	**329**	**0,296**	**363**	**7,9**	**7,0**	**2,6**	**59,9**	**0,2**	**30,3**	**2,5**
37454 ♀	**5,69**	**58**	**106**	**18,6**	**323**	**0,327**	**491**	**8,7**	**4,5**	**2,2**	**49,4**	**0,4**	**43,5**	**0,5**
37896 ♀	**6,03**	**57**	**107**	**17,8**	**314**	**0,342**	**245**	**13,3**	**5,7**	**1,6**	**52,2**	**0,5**	**40,0**	**5**
38676 ♀	**6,66**	**57**	**120**	**18,1**	**320**	**0,376**	**433**	**18,2**	**5,0**	**1,2**	**56,8**	**2,9**	**34,1**	**0,5**
M	**6,047**	**57,22**	**109,78**	**18,24**	**320,11**	**0,344**	**365,4**	**12,5**	**6,733**	**1,96**	**52,63**	**1,022**	**37,66**	**2**
M	**0,596**	**1,856**	**8,03**	**0,808**	**4,68**	**0,027**	**99,95**	**3,84**	**4,64**	**0,822**	**10,54**	**1,09**	**6,90**	**1,98**
T test	**0,01**	**0,038**	**0,022**	**0,192**	**0,564**	**0,029**	**0,144**	**0,322**	**0,174**	**0,48**	**0,535**	**0,357**	**0,622**	**0,600**

Таблица 2

Показатели гемостаза макак яванских

№№ обезьяны	Показатели гемостаза		
	ПВ (секунды)	ПИ (%)	АЧТВ (секунды)
39083♂	11,9	141	21,3
39605♂	11,8	142	19,6
39672♂	12,3	137	21,0
38713♂	9,8	113,5	29,8
39074♂	9,4	123,4	20,8
38547♂	9,7	115,9	19,6
38557♂	12,0	140	19,5
38526♂	9,8	113,5	20,4
39166♂	9,4	123,4	27,4
M	10,68	127,74	22,16
M	1,27	12,24	3,759
37454♀	9,7	115,9	27,2
37896♀	10,2	104,8	20,9
38676♀	10,4	100,8	24,6
38673♀	10,0	109,0	19,8
35770♀	11,8	129,6	26,8
35046♀	10,1	100,8	20,8
37454♀	10,0	109,0	19,8
37896♀	11,8	129,6	26,8
38676♀	10,1	100,8	20,8
M	10,46	111,14	28,61
m	0,784	11,59	18,44
T test	0,661	0,009	0,319

Таблица 3

ЭКГ самцов и самок

№№ об-ны	ЧСС,	R-R макс.,	R-R мин.,	R-R ср.,	P,	P-R(P-Q),	QRS,	QT,	QTc,
	уд./мин.	мс	мс	мс	мс	мс	мс	мс	мс
39083♂	84	936	523	716	270	301	54	307	363
39605♂	81	832	548	742	64	75	55	297	345
39672♂	119	537	481	506	212	232	58	292	410
38713♂	119	679	429	503	168	233	58	254	358
39074♂	92	704	620	653	72	97	57	307	380
38547♂	104	995	487	575	69	101	56	277	365
38557♂	169	651	234	354	79	82	89	262	440
38526♂	128	689	434	470	71	93	57	260	379
39166♂	89	708	637	672	67	89	55	269	328
M	109,44	747,9	488,1	576,8	119,1	144,78	59,89	280,6	374,2
m	28,02	145,4	120,1	129,0	77,6	85,58	11,01	20,67	33,78
37454♀	83	771	678	723	71	90	49	306	360
37896♀	82	887	672	736	66	78	62	374	436
38676♀	114	636	467	528	65	80	58	281	387
38673♀	122	548	466	493	65	75	55	277	395
35770♀	113	556	512	530	67	80	53	275	378
35046♀	148	802	239	405	74	85	52	282	443
37454♀	140	433	426	429	63	75	57	258	394
37896♀	133	458	447	452	73	93	62	255	379
38676♀	131	495	433	457	191	208	54	256	379
M	118,4	620,7	482,2	528,11	81,67	96	55,78	284,9	394,56
m	23,33	163,4	133,09	121,59	41,18	42,47	4,41	37,12	27,55
T test	0,470	0,100	0,923	0,422	0,219	0,145	0,314	0,764	0,181

Оценивая результаты электрокардиофии, следует отметить, что частота сердечных сокращений у обезьян превышает средние показатели у человека (60-80 уд/мин). У обезьян наблюдается тенденция к учащенному ритму, синусовая тахикардия. Выброс гормонов может спровоцировать ЧСС и исказить показатели. P-R интервал у обезьян увеличен по сравнению со значениями ритма людей. Фактором, влияющим на удлинение Q-T интервала является ЧСС, зависимость носит нелинейный и обратно пропорциональный характер. У людей повышение интервала Q-T повышает риск развития фатальных изменений ритма. Отличия в показателях ЭКГ обезьян и человека, вероятнее всего, обусловлено транквилизацией животных перед электокардиографией (0,1мл/кг ксилы и 0,05 мл/кг золетила).

Выводы

Выявлена вариабельность в показателях лйкоцитов, показано достоверное различия в показателях числа эритроцитов, гемоглобина и гематокрита между самцами и самками, что коррелирует с данными, приведенными для людей, а также в показателях ПИ.

Что касается показателей ЭКГ, то, несмотря на то, что они в каждой группе животных изменялись в очень больших пределах, достоверных различий между самцами и самками выявлено не было.

Таким образом, в ходе проведенного исследования были изучены показатели гемостаза, общего анализа крови и ЭКГ клинически здоровых макаков яванских (самцов и самок) Адлерского питомника.

Литература

1. Агрба В.З., Лапин Б.А., Мезенцева М.В. и др. Показатели функционирования системы цитокинов у лабораторных приматов. //Бюллетень эксп. биологии и медицины. 2009.т.148. №8. С.223-225.
2. Гончарова Н.Д., Лапин Б.А., Хавинсон В.Х. Возрастные нарушения эндокринных функций и возможные пути их коррекции.//Бюл. экспериментальной биологии и медицины.2002,1134,№11,с.484-489.
3. Карал-оглы Д.Д., Игнатова И.Е., Деменкова Н.П., Мухаметзянова Е.И., Гварамия И.А., Агрба В.З./ Оценка цитокинового профиля, иммунного стату-

са и показателей гематологического анализа обезьян вида макака резус (Macaca mulatta) Адлерского питомника.// Материалы сочинской третьей международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии»//Том.1,8-10 августа 2016 г, стр.288-295.
4. Куксова М.И. Кроветворная система обезьян в норме и патологии./ /М. «Медицина», 1972, 128С.
5. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. и др. Проблемы инфекционной патологии обезьян.// М. Изд-во РАМН. 2004. 140с.
6. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии.// М., 1987
7. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям (основанное В.Е.Предтеченским). Под редакцией Л.Г.Смирновой и Е.А.Кост. //Медгиз. Москва, 1960, стр. 7-40
8. Хабриев Р.У. (под ред.) /Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Издание 2-е. //М.: «Медицина» 2005.832 с.
9. H. Wang, Y.Y. Ni, W. Si, Y.J. Li, Y. Yan. Reference data of clinical chemistry, haematology and blood coagulation parameters in juvenile cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). Veterinarni Medicina, 57, 2012 (5): 233–238).

ДИНАМИКА ГЕМОСТАЗА У ОБЕЗЬЯН МОЛОДОГО ВОЗРАСТА

Фоменко В.Н., Баркая В.С., Хашиг Н.Э., Миквабия З.Я.
НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, г. Сухум.

Резюме

В работе представлены собственные результаты исследования системы гемостаза у двух видов здоровых обезьян молодого возраста: павианов гамадрилов и макак резусов. Выделены группы неполовозрелых (1 – 4 лет) и взрослых (5 – 10 лет) самцов и самок – всего 45 обезьян.

При традиционном исследовании клеточного и плазменного гемостаза выявлены видовые различия с активацией мегакариоцитопоэза

и тромбоцитопоэза и более высоким свёртывающим потенциалом крови у макак резусов. Анализ различий по полу характеризует более активное свёртывание у самок. Однако использование коэффициентов тромбоопасности отражает таковое у самцов, что при сопровождении стрессовыми ситуациями или возникновении соматических заболеваний может сопровождаться тромбозом.

HEMOSTASIS DYNAMICS IN JUNIOR AGED MONKEYS

Fomenko V.N., Barkaya V.S., Khashig N.E., Mikvabia Z.Ya.
Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum

Abstract

Here we present the results of our research on the hemostasis system of young, healthy hamadryad baboons and rhesus monkeys. 45 immature (1 – 4 years old) and adult (5 – 10 years old) males and females were divided into two groups.

In a standard investigation of cell and plasma hemostasis, we identified differences between the species in megacaryocytopoesis and trombocytopoesis activation, and a higher potential for coagulation in the blood of the rhesus monkeys. Analysis of sex differences showed more active coagulation in females. However with the use of the clot danger coefficients, males demonstrate a similar level. In combination with stressful situations and somatic diseases, the coagulation may be accompanied by thrombosis.

В Сухумском приматологическом центре за годы его существования накоплена уникальная научная информация, ставшая достоянием мировой науки. Имеются в виду первые сведения о биологии приматов, особенностях функционирования важнейших систем их организма: ЦНС, пищеварение, обменные процессы, репродуктивная сфера, инфекционная патология, эндокринология, широта моделирования на обезьянах болезней человека бактериальной и вирусной природы и др. Эти

бесценные научные сведения явились бесспорным доказательством филогенетической близости человека и обезьян, а значит, правомерности экстраполяции результатов исследований на человека. Однако отдельные системы, как например, система гемостаза, всё ещё нуждаются в пополнении имеющихся данных как в плане определения видовых нормативных показателей, так и, особенно, их возрастной динамике по периодам жизни. Авторы сообщения рассчитывают, что представленный материал в известной мере восполнит существующий дефицит информации.

Материал и методы

Исследование проведено на двух видах обезьян: павианах гамадрилах *(Papio hamadryas)* – 24 и макаках резусах *(Macaca mulatta)* – 21 особь разного пола.

По видам выделено 2 группы сравнения: подростки (неполовозрелые) от 1 года до 4 лет и взрослые половозрелые самцы и самки 5 – 10 лет. Животные на момент обследования были соматически здоровы и в большинстве своём служили «фоном» перед экспериментальным воздействием.

Забор проб венозной крови проводили в утренние часы натощак без применения наркотизирующих средств. Костный мозг брали путём пункции головки плечевой кости с последующим приготовлением мазков и окраской по Романовскому – Гимза. Мегакариоцитограмму подсчитывали по Г.И. Алексееву (1959) с выделением клеток различной степени зрелости и функциональной активности с подсчётом дегенеративных форм и свободных ядер мегакариоцитов (МКЦ). Общее число тромбоцитов определяли в камере Горяева, а дифференцированный их подсчёт (тромбоцитограмма) проводили по А.А. Коровину и Г.В. Кенигсу (1948) с выделением форм их зрелости, включая дегенеративные и формы раздражения. Функциональную активность тромбоцитов оценивали по 3-му фактору тромбоцитов и адгезивной их способности к стеклоткани по методу Т.А. Одесской и соавторов (1971). Для изучения параметров гемостаза плазму получали двухрежимным центрифугированием (450 – 8 мин и 1200 – 15 мин).

Наш многолетний опыт исследований системы гемостаза с использованием традиционных методов (ручных) при сопоставлении с автоматизированными методами отража5ет идентичность результатов.

Только при сбое в работе приборов результаты могут быть искажены. Это подтверждается в работах других исследователей.

Всего исследовано 13 общепринятым показателям: каолиновое время, силиконовое время, каолин-кефалиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), аутокоагуляционный тест (АКТ) – по трем параметрам – А – время свёртывания на 2 мин инкубации гемолизат-кальциевой смеси, МА – максимальной свёртывающей активности, ИИТ – индексу инактивации тромбина. Исследовали также протромбиновое, тромбиновое время, концентрацию фибриногена, XIIa-зависимый фибринолиз. Вычисляли индексы тромбоопасности: индекс диапазона контактивной активации (ИДКА), индекс тромбоцитарной активности (ИТА), константы K_1 и K_2. Материал обработан статистически с вычислением достоверности – Р. Все перечисленные методы представлены в современных руководствах по исследованию системы гемостаза [4, 9, 10].

Результаты и обсуждение

Количество МКЦ в пунктате костного мозга молодых обезьян колеблется в широких пределах: 50 – 200 в 1 мм^3. Морфологическая структура форм МКЦ сходна с таковой, описанной для здоровых людей [15]. В мегакариоцитограмме неполовозрелых обезьян (1 – 4 года) до 60% приходится на зрелые функционально активные МКЦ и много свободных ядер МКЦ (12% у павианов гамадрилов и 16% у макак резусов), что характеризует активный тромбоцитопоэз у этой группы обезьян. У взрослых животных функционально активные МКЦ также находятся в большом количестве (60%), но уменьшается число свободных ядер МКЦ. Индекс активности МКЦ у неполовозрелых павианов гамадрилов составляет 2,1, а у взрослых макак резусов – 2,6. (табл.2).

Общее число тромбоцитов у неполовозрелых павианов гамадрилов доходит до 30 × 109/л, а у макак резусов несколько выше – 34 × 109/л; в зрелом возрасте их несколько ниже (табл. …). Морфологическая структура тромбоцитов сходна с таковой у здоровых людей [1, 5]. По тромбоцитограмме отмечено интенсивное тромбоцитообразование. Наибольший процент в формуле составляют зрелые формы тромбоцитов (до 90%), а число старых снижается до 8 – 10%, на дегенеративные формы приходится до 2 – 4%.

По нашим данным и литературным сведениям оценка качества фиксированных тромбоцитов на мазках крови не позволяет достоверно оценить их реальную функциональную активность [5, 12]. Поэтому в нашей работе о функциональной способности тромбоцитов мы судили по оценке 3-го фактора тромбоцитов, участвующего в образовании протромбиназы и их адгезивной способности к стеклоткани. Данные по исследованному фактору у *неполовозрелых обезьян* обоих видов составляют 20,6 сек, у *взрослых самок* время увеличивалось до 26 сек. Адгезивная способность тромбоцитов у *подростков* самая высокая (41% у павианов гамадрилов и 49% у макак резусов), а у *взрослых самок* (55% у павианов гамадрилов и 45% у макак резусов) несколько выше, чем у *самцов* (38,4% у павианов гамадрилов и 43% у макак резусов). Таким образом, в клеточном гемостазе молодых обезьян уже отмечается активация процесса у самок (табл. 3, 4).

Плазменные показатели гемостаза. По тесту времени свертывания цельной крови (общий коагуляционный тест) кровь быстрее свёртывалась у подростков макак резусов (3,7 мин) и вдвое дольше у павианов гамадрилов (6,2 мин, $P < 0,01$). Такая же тенденция сохранялась в группе взрослых обезьян.

Силиконовое время свёртывания. Тест более чувствителен к нарушениям свёртывания крови, особенно гиперкоагуляции. У подростков павианов гамадрилов он составлял 193 с, у макак резусов – 205 с, а у взрослых обезьян – 200 – 210 с, т.е. различий не выявлено.

Каолин-кефалиновое время свёртывания – проба, чувствительная к дефициту факторов внутреннего механизма свёртывания (VIII, IX, XI, XII). В группе *неполовозрелых* павианов гамадрилов она составляла 48 с, а у макак резусов короче – 36 с. У взрослых павианов гамадрилов это время удлинялось до 53 с, у макак резусов – до 45 с. АЧТВ по своей чувствительности аналогично предыдущему тесту (табл. 3, 4). К сожалению по объективным причинам тест исследован только в группе самцов макак резусов и составлял 32 с, что соответствует пределам колебаний здоровых людей (23 – 33 с) [4].

АКТ. Стандартизованная методика, отражающая динамику нарастания, а затем угнетения тромбопластин-тромбиновой активности в исследуемой крови (табл. 3, 4). У *неполовозрелых* павианов гамадри-

лов показатель активации начала свёртывания (А) и максимальная активность свёртывания (МА) повышаются параллельно увеличению возраста. У неполовозрелых макак резусов эти показатели наоборот, существенно выше (А – 13%, МА – 84,5%), чем у взрослых (А – 10% у самцов и 8% у самок, МА – 70% у самцов и 60% у самок), т.е. наблюдается обратная тенденция. ИИТ был стабильным для обоих видов *неполовозрелых* обезьян (3,2% у павианов гамадрилов и 3,8% у макак резусов) и взрослых (3% и 3,9% соответственно).

Протромбиновое время свёртывания, отражающее активность протромбинового комплекса (факторов II, V, VII, X), в группе неполовозрелых павианов гамадрилов составляло 19 с, а у молодых – 18,6 с у самцов и 18 с у самок. У макак резусов этот показатель более продолжителен: 21 с у неполовозрелых и 22 и 19 с у взрослых самцов и самок соответственно (табл. 3, 4).

Тромбиновое время, характеризующее конечный этап свёртывания крови и антикоагулянтную активность, у неполовозрелых павианов гамадрилов составляло 12,3 с, у взрослых самок – 12,5 с, а у самцов короче: 10,6 с. Но в группе макак резусов этот показатель длительнее: у неполовозрелых 14,3 с, а у взрослых – 15 с у самок и 17 с у самцов. Это может свидетельствовать о присутствии в крови этих обезьян увеличенного количества антитромбинов.

Повышенный уровень фибриногена в плазме крови указывает на наличие в организме воспалительных, деструктивных, неопластических, иммунных процессов, при которых возникает гиперфибриногенемия. У неполовозрелых павианов гамадрилов концентрация этого белка была 4 г/л, а у взрослых – 4,1 г/л у самцов и 4,5 г/л у самок. В группе макак резусов содержание фибриногена было немного выше (5,6 г/л) у неполовозрелых, а у взрослых особей оно составляло 4 – 5 г/л.

Фибринолиз, оцениваемый по интенсивности растворения сгустков фибрина под влиянием ферментативной активности плазмы, представляет собой тест XIIa-зависимого фибринолиза (ХЗФ). Происходит ускорение лизиса эуглобулинов, полученных из обработанной каолином бедной тромбоцитами плазмы. У неполовозрелых обезьян он был практически одинаков у обоих видов: 10,2 мин у павианов гамадрилов и 9,5 мин у макак резусов. У взрослых обезьян наблюдалось более про-

должительное время растворения сгустков, особенно у самцов (15,8 мин у павианов гамадрилов и 25 мин у макак резусов) и 20 мин у самок макак резусов.

Различия по половому признаку. У взрослых самок обоих видов повышена функциональная активность тромбоцитов (оценка по 3-му фактору тромбоцитов и их адгезивной способности). По АКТ также прослеживается активация начальных этапов у самок павианов гамадрилов, укорочение протромбинового времени у самок макак резусов, повышенная концентрация фибриногена и более короткий фибринолиз. В целом складывается впечатление, что у взрослых самок свёртывание крови более активное, чем у самцов.

В целом исследование коагулограммы у молодых половозрелых обезьян выявило некоторые отклонения, в частности, активацию свертывающего потенциала у макак резусов и самок обоих видов.

Подтверждением служит ИДКА, который включает определение силиконового и каолинового времени плазмы. Определение ИДКА у взрослых павианов гамадрилов выявило его уменьшение у самцов (56), а не самок (65), что не свидетельствует о гиперкоагуляционном сдвиге у самок (табл. 1).

Заключение

Представлены данные по состоянию показателей гемостаза у неполовозрелых и взрослых обезьян двух видов (павианов гамадрилов и макак резусов), наиболее широко используемых в медико-биологических экспериментах.

Видовые различия. Высокая активность мегакариоцитарного ростка обеих групп животных (неполовозрелые и взрослые) обеспечивает достаточный уровень тромбоцитов в периферической крови. При этом у неполовозрелых обезьян более высокие характеристики тромбоцитопоэза, судя по увеличенному проценту свободных ядер мегакариоцитов и индексу активности МКЦ, равному 2 у павианов гамадрилов и 2,8 у макак резусов, что почти вдвое выше известного для здоровых молодых людей [1, 3].

В гемостазе рассматриваемых групп обезьян уже присутствуют видовые различия: более активный мегакариоцитопоэз у макак резусов, что согласуется с увеличением у них же количества тромбоцитов. От-

мечается более короткое время свёртывания цельной крови – до 3 – 4 мин против 6 – 8 у павианов гамадрилов ($P < 0,01$); высокий процент активации начала свёртывания (А в АКТ), особенно у неполовозрелых обезьян (12,8% у макак резусов против 2,6 у павианов гамадрилов, $P < 0,001$), отражающий *содружественное участие тромбоцитов и эритроцитов* в свёртывании крови [5, 9, 20]. Всё это характеризует повышенную свёртывающую активность крови у макак резусов, что согласуется с данными литературы [9, 11, 19]. Такая активация в системе гемостаза у макак проводит к её истощению, что отражает заторможенный фибринолиз (20 – 25 мин) по сравнению с павианами гамадрилами (19 и 9 мин, $P < 0,01$). Удлинение лизиса сгустка исследователи связывают с дефицитом плазминогена, фактора XII, плазменного прекалликреина, либо с наличием ингибиторов, в том числе и продуктов деградации фибриногена – ПДФ [4, 8]. Концентрация фибриногена тоже была выше у макак резусов: 5,0 – 5,6 г/л против 4,0 – 4,5 г/л у павианов гамадрилов, $P < 0,001$. Другие показатели – протромбиновое и тромбиновое время – у макак резусов по сравнению с павианами даже имели тенденцию к удлинению: 22 с против 19 с и 14 – 17 с против 10 – 12 с у павианов гамадрилов соответственно.

При определении ИТА, отражающего степень участия тромбоцитов в свёртывании плазмы, оказалось, что он почти одинаков у самцов и самок. У взрослых самцов он составлял 23,0, что несколько ниже, чем у самок: 27,0.

О коэффициентах тромбоопасности. Исследователи отмечают их значимость в патологии гемостаза [13, 14]. Чем ниже коэффициент, тем больше опасность развития тромбоэмболических заболеваний (табл. 1).

При вычислении коэффициента тромбоопасности (К1, К2 – по времени свёртывания цельной крови и АЧТВ к ХЗФ) установлено, что в группе неполовозрелых макак резусов они ещё высокие, и тромбоопасности не существует. В зрелом возрасте она уже намечается у самцов, у которых опасность возникновения тромбоэмболических осложнений (ДВС-синдром) при стрессовых состояниях и соматических заболеваниях более велика, чем у самок, а у макак резусов тромбоопасность повышена в силу замедленного у них фибринолиза. Таким образом,

использование приведенных индексов не подтвердило активации свёртывания у самок обезьян, т.е. их диагностическую значимость.

Таблица 1.

Коэффициенты тромбоопасности у неполовозрелых и молодых обезьян

	Павианы гамадрилы			Макаки резусы		
	Неполовозрелые	Взрослые		Неполовозрелые	взрослые	
		Самцы	Самки		Самцы	Самки
ИДКА[1]	69 ±	56 ±	65 ±	69 ±	55,0	
ИТА[2]	27,2 ±	23,5	27,0	26,5 ±	33,0	
K1[3]	0,6	0,4	0,9	0,4	0,2	0,2
K2[4]	4,8	2,8	5,8	3,7	1,8	2,3

Возрастные сдвиги. Известно, что подростковый период у людей (а у обезьян это неполовозрелый возраст) сопровождается интенсивными эндокринными и функциональными перестройками функциональных систем организма, отражающимися на процессах свёртывания крови, с периодической стабилизацией [2, 15, 16, 17]. У взрослых павианов гамадрилов по сравнению с неполовозрелыми мы наблюдали увеличение числа функционально активных форм МКЦ, что согласуется с данными литературы о функции МКЦ в соответствии с процессами оссификации, резорбции и регуляции кроветворения в физиологически активном периоде жизни организма [15]. В зрелом возрасте (5 – 10 лет) у обезьян функционально активные формы МКЦ достигают 63%

---

[1] $\text{ИДКА} = \frac{\text{Силиконовое время} - \text{каолиновое время богатой плазмы}}{\text{Силиконовое время}} \cdot 100$

[2] $\text{ИТА} = \frac{\text{Каолиновое время бедной плазмы} - \text{каолиновое время богатой плазмы}}{\text{Каолиновое время бедной плазмы}} \cdot 100$

[3] $K_1 = \frac{\text{Время свёртывания, мин}}{\text{ХЗФ}}$

[4] $K_2 = \frac{\text{АЧТВ (ККВ)}}{\text{ХЗФ}}$

– максимальной величины у павианов гамадрилов, а индекс активности МКЦ составляет 2,6. Другими словами, у обезьян в молодом половозрелом возрасте наблюдается самый высокий пролиферативный потенциал костного мозга.

Наряду с этим отмечается активный тромбоцитопоэз с наибольшим увеличением в периферической крови зрелых форм тромбоцитов до 84 – 88% и высокой функциональной активностью, судя по 3-му фактору тромбоцитов (до 25,8%) и адгезивной способности (55% у самок павианов гамадрилов). Помимо этого, существует другой метод оценки функционального состояния тромбоцитов с использованием флуоресцентной микроскопии [5, 14, 20]. Однако по объективным причинам этот метод нами не использовался.

У павианов гамадрилов в плазменных показателях наблюдались гиперкоагуляционные сдвиги только по АКТ и незначительно по каолин-кефалиновому времени, тромбиновому времени и уровню фибриногена (у самок). Угнетение ХЗФ более значительным было у макак резусов ($P < 0,001$), т.е. у молодых половозрелых обезьян критерии гемостазиологической активности нарастают с тенденцией к увеличению у макак резусов.

Таким образом, в системе гемостаза обезьян молодого возраста уже имеет место полноценность функционирования системы свёртывания крови, благодаря которой обеспечивается надёжность гомеостаза целого организма [2, 16, 17].

Влияние полового признака. Проведенный анализ изменений гемостаза по половому признаку в группе молодых обезьян выявил в целом более активный процесс свёртывания у самок, чем у самцов. Однако использование индексов контактной тромбоцитарной активации и тромбоопасности эту направленность не подтвердило.

Выводы

1. Исследование системы гемостаза проведено на двух видах обезьян по двум возрастам: неполовозрелые (до 4 лет) и половозрелые (5 – 10 лет).

2. В работе использована оценка клеточного и плазменного компонентов системы гемостаза (16 тестов).

3. Видовые различия заключаются в более высоком свёртывающем потенциале крови у макак резусов с усилением коагуляционной активности и угнетением фибринолиза.

4. В молодом возрасте выявлена активация мегакариоцитопоэза и тромбоцитопоэза с хорошей функциональной способностью тромбоцитов, активация свёртывающего потенциала крови (по времени свёртывания, АКТ, протромбиновому времени, фибринолизу, ХЗФ).

5. Анализ различий по полу отражает только тенденцию к более активному свёртыванию крови у самок.

Литература

1. Абрамов М.Г. Гематологический атлас. Москва, Медицина, 1979, 300 с.
2. Балуда В.П., Исабаева В.А., Пономарёва Т.А. Биологические ритмы системы гемостаза человека. Фрунзе, 1978, 200 с.
3. Балуда В.П., Балуда М.В., Деянов И.И., Тлепушков И.К. Физиология системы гемостаза. Москва, 1995, 224 с.
4. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Москва, Ньюдиамед, 2008, с. 289.
5. Тромбоциты. Под ред. Германова В.А., Пиксанова О.Н., Юрловой В.М. Куйбышев, 1973, 139 с.
6. Козинец Г.И., Макаров В.А. Исследование системы крови в клинической практике. Москва, Триада, 1998, 598 с.
7. Коробова Ф.В., Левина Т.Н., Соколинский Б.З. и др. Сравнительное исследование тромбоцитов здоровых лиц с использованием световой микроскопии и проточного счетчика Cobos micros. *Клиническая лабораторная диагностика,* 2010, №12, с. 46 – 49.
8. Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Люлькина Е.В. Возрастные особенности системы гемостаза у людей. *Успехи геронтологии,* 2005, вып. 16, с. 38 – 47.
9. Куксова М.И. Кроветворная система обезьян в норме и патологии. Москва, Медицина, 1972, 127 с.
10. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии. Москва, Медицина, 1987, 190 с.
11. Лапин Б.А. Итоги и перспективы медико-биологических исследований на приматах. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины,* 1996, 122 (9), с. 245 – 256.

12. Лапин Б.А. Перспективные направления исследований на приматах. *В кн.:* Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии. Материалы второй международной научной конференции. Сочи-Адлер, 2011, т. 1, с. 12 – 20.
13. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. Москва, 2011, с. 10 – 56.
14. Макаров М.С, Кобзева Е.Н., Высочин И.В. и др. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания. *БЭБИМ,* 2013, т. 158, с. 388 – 391.
15. Онтогенез системы свёртывания крови. Под ред. А.А. Маркосяна. Ленинград, 1968, 188 с.
16. Маркосян А.А. Надежность физиологических систем и онтогенез. *В кн.:* Молекулярные и функциональные основы онтогенеза. Москва, 1970, с. 224 – 234.
17. Bernuzzi J., Turditos S., Bussolatio O. et al. *Blood Transfusion,* 2010, v. 8, No. 4, p. 237 – 247.
18. Schenone M. et al. The blood coagulation cascade. *Curr. Opin. Hematol.,* 2004, 11 (4), 272 – 277.
19. Seamon A., Malinow M.R. Blood clotting in nonhuman primates. *Lab. Anim. Care,* 1968, 18, 1, p. 80 – 84.
20. Whette J. *Platelets,* 2000, vol. 11, No. 1, p. 49 – 55.

Таблица 2

Мегакариоцитограмма и тромбоцитограмма обследованных животных

	Павианы гамадрилы		Макаки резусы		
Мегакариоцитограмма		Подростки n = 5	I 5 – 10 n = 3	Подростки n = 3	I 5 – 10
	МК-бласты	0,6 ±	0,5	2,0	—
	Промегакариоциты	2,3 ±	4,5	4,0	—
	МКЦ функционально активные	56,1 ±	63,0	52,0	—
	МКЦ функционально неактивные	26,2 ±	24,0	18,0	—
	Дегенеративные	2,0 ±	1,0	8,0	—
	Свободные ядра	11,5 ±	5,2	16,0	—
	Индекс активности МКЦ	2,1	2,6	2,8	—
Тромбоцитограмма		n = 6	n = 5	n = 6	n = 6
	Тр. · 109/л	29,5 ±	28,6 ±	34,0 ±	31,5 ±
	Юные формы	6,6 ±	2,3 ±	4,3 ±	3,0 ±
	Зрелые формы	83,0 ±	84,0 ±	77,3 ±	88,0 ±
	Старые формы	6,7 ±	9,3 ±	8,0 ±	6,3 ±
	Дегенеративные формы	0,7 ±	2,6 ±	1,8 ±	2,0 ±
	Формы раздражения	2,3 ±	2,0 ±	4,6 ±	2,7 ±

Таблица 3

Гемостаз у павианов гамадрилов

	До 4 лет	5 – 10 лет	
		Самцы, n = 6	Самки, n = 8
Тромбоциты, Ч	29,5 ± 5,3	25,6 ± 2,2	32,0 ± 1,4
3-й фактор тромбоцитов, с	20,7 ± 1,6	20,0 ± 0,1	25,8 ± 3,2
Адгезивная способность тромбоцитов, %	41,0 ± 4,0	38,4 ± 8,0	55,3 ± 8,1
Время свёртывания, мин	6,2 ± 0,8	7,0 ± 0,3	8,0 ± 0,1

Силиконовое время, с		193,0 ± 4,2	200,0 ± 1,4	210,0 ± 1,7
Каолин-кефалиновое время, с		48,0 ± 6,3	45,0 ± 0,2	53,0 ± 2,5
АКТ, %	А	2,6 ± 0,6	6,5 ± 2,0	7,9 ± 2,1
	МА	65,1 ± 5,6	79,0 ± 5,0	76,0 ± 2,4
	ИИТ	3,2 ± 0,6	2,9 ± 0,6	3,6 ± 0,4
Протромбиновое время, с		19,0 ± 1,3	18,6 ± 0,5	18,0 ± 2,5
Тромбиновое время, с		12,3 ± 0,6	10,6 ± 0,4	12,5 ± 1,7
Этаноловый тест, ±		–	–	–
Фибриноген, г/л		4,0 ± 0,4	4,1 ± 0,5	4,5 ± 0,1
ХЗФ, мин		10,2 ± 3,6	15,8 ± 2,3	9,0 ± 2,4

Таблица 4

Гемостаз у макак резусов

		До 4 лет	5 – 10 лет	
			Самцы, n = 6	Самки, n = 9
Тромбоциты, Ч		33,6 ± 3,4	31,1 ± 1,3	32,0 ± 4,1
3-й фактор тромбоцитов, с		20,6 ± 2,6	30,0	
Адгезивная способность тромбоцитов, %		48,9 ± 5,3	43,0 ± 2,0	45,3 ± 4,0
Время свёртывания, мин		3,7 ± 0,1	4,2 ± 0,2	4,5 ± 0,9
АЧТВ, с		—	32,2 ± 1,1	—
Силиконовое время, с		205,0 ± 6,2	—	200,0
Каолин-кефалиновое время, с		36,3 ± 1,6	45,0	45,0
АКТ, %	А	12,8 ± 2,1	9,7 ± 2,0	7,9 ± 1,7
	МА	84,5 ± 3,2	70,6 ± 7,2	60,2 ± 3,8
	ИИТ	3,8 ± 0,5	3,9 ± 0,5	3,5 ± 0,8
Протромбиновое время, с		21,3 ± 0,7	22,0 ± 0,3	19,0 ± 0,5
Тромбиновое время, с		14,3 ± 0,4	17,0 ± 0,2	15,0 ± 0,4
Этаноловый тест, ±		«–»	«–»	«–»
Фибриноген, г/л		5,6 ± 0,1	4,0 ± 0,3	5,0 ± 0,1
ХЗФ, мин		9,5 ± 0,2	25,0 ± 0,1	20,0 ± 2,1

ДИНАМИКА ГЕМОСТАЗА У ОБЕЗЬЯН СТАРШЕГО ВОЗРАСТА

Фоменко В.Н., Баркая В.С., Хашиг Н.Э., Миквабия З.Я.
НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, г. Сухум

Резюме

При исследовании 30 гемостазиологических показателей у здоровых павианов гамадрилов и макак резусов (всего 66 обезьян) в пожилом и старческом возрасте (13 – 30 лет) выявлены ещё достаточно активные мегакариоцитопоэз и тромбоцитопоэз, но уже с признаками морфологической и функциональной дегенерации. По мере увеличения продолжительности жизни обезьян в плазменных показателях отмечается нарастание гиперкоагуляционной направленности на фоне депрессии фибринолиза и некоторой активации противосвёртывающей системы. При условии сбалансированного состояния этих механизмов продолжительность жизни обезьян увеличивается и может составлять 35 – 40 лет.

HEMOSTASIS DYNAMICS IN SENIOR AGED MONKEYS

Fomenko V.N., Barkaya V.S., Khashig N.E., Mikvabia Z. Ya.
Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum

Abstract

We researched 30 hemostasiological indexes in healthy hamadryad baboons and rhesus monkeys (66 individuals) of elderly and senile age (11 – 30 years old). We identified rather active megacaryocytopoesis and trombocytopoesis, which already showed signs of morphological and functional degeneration. With increases in the monkeys' lifespans, we noted increases in hypercoagulability orientation, with fibrinolysis depression and some activation of the anticoagulation system taking place. Monkeys' lifespan can increase and reach 35 – 40 years, if the conditions that result from these mechanisms are balanced.

Основы геронтологии были заложены ещё вторым российским Нобелевским лауреатом (1888) И.И. Мечниковым. Данная работа входит в раздел биологических характеристик обезьян как объекта медицинских исследований.

В современных условиях проблема старения организма приобретает научную и практическую ценность, т.к. с каждым годом в мире растет контингент лиц пожилого и старческого возраста. Имеющиеся литературные данные отражают взаимосвязь тромбозов и возраста. Частота тромбозов у людей увеличивается на 5 – 6 десятилетиях жизни. Одной из причин учащения тромбоэмболических заболеваний в этом периоде жизни исследователи считают снижение содержания противосвёртывающих механизмов крови, чем и объясняют целесообразность применения антикоагулянтов в этом периоде жизни [6, 10, 12, 19, 20, 24, 25].

Однако сведения о возрастных особенностях системы свертывания крови у обезьян, особенно старческого возраста, в доступной литературе ограничены [13, 26, 28]. В то же время изучение системы гемостаза у обезьян, «лабораторного двойника человека» в возрастном аспекте расширяет наши представления о происходящих в этой системе изменениях по мере старения организма с выработкой компенсаторно-приспособительных механизмов против возникающих с возрастом патологических процессов или, наоборот, способствующих их возникновению. Отмеченное выше явилось целью данного исследования.

Материалы и методы.

Забор проб крови осуществляли в стандартных условиях: утром до кормления, без применения наркотизирующих средств.

В пробах крови животных определяли:

– общее число тромбоцитов путём подсчёта в камере Горяева;

– на специально приготовленных мазках подсчёт тромбоцитов различной степени зрелости с выделением дегенеративных форм и форм раздражения (тромбоцитограммы);

– функциональную активность тромбоцитов по адгезивной способности к стеклоткани и 3-му их фактору;

– общую коагуляционную активность венозной крови в плазме по 13 общепринятым показателям: каолиновое время, активирован-

ное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), аутокоагуляционный тест (АКТ) по трём параметрам (А – время свёртывания на 2-й минуте инкубации, МА – максимальное время свёртывания, ИИТ – индекс инактивации тромбина);

- протромбиновое и тромбиновое время;
- концентрацию фибриногена;
- Хагеман-зависимый фибринолиз;
- индекс диапазона контактной активации (ИДКА);
- коэффициент тромбоопасности.

Все перечисленные методы представлены в рекомендованных современных руководствах по исследованию гемостаза [4, 7, 13].

В мегакариоцитограмме в окрашенных мазках костного мозга, полученного путём пункции головки плечевой кости, подсчитывали:

- клетки различной степени зрелости данного ростка;
- содержание дегенеративных форм и свободных ядер мегакариоцитов (МКЦ).

Полученные материалы обработаны статистически.

Результаты и обсуждение.

В таблице 1 представлены данные анализа мегакариоцитограммы и тромбоцитограммы у обезьян вида павианы гамадрилы и макаки резусы возраста 13 – 19 лет.

Морфологическая характеристика клеток мегакариоцитарного ряда у обоих видов обезьян соответствует данным, полученным у здоровых людей [1]. В мегакариоцитограмме основную массу клеток представляют функционально активные формы мегакариоцитов – 58,7% у павианов гамадрилов и 64,0% у макак резусов, а неактивных форм вдвое меньше – 27% и 26% соответственно. Наименьший процент приходится на мегакариобласты. Индекс активности мегакариоцитов одинаков в обследованных группах обезьян – 2,1 у павианов гамадрилов и 2,4 у макак резусов, что почти вдвое превышает активность у здоровых людей среднего возраста – 1,3 [6, 7].

Количество тромбоцитов у обезьян старшего возраста соответствует нормативам взрослых людей, но с тенденцией повышения у самок, что при сравнении с данными для человека не согласуется

[7, 15]. Морфологическая структура тромбоцитов сходна с описанной у здоровых людей. В тромбоцитограмме до 80% составляют зрелые формы тромбоцитов; остальные приходятся на юные, старые, дегенеративные формы и формы раздражения. Причем с возрастом увеличивается содержание старых форм до 13%. Диагностика тромбоцитопатий требует изучения адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов, факторов 3 и 4. В нашей работе приводятся данные по 3-му фактору тромбоцитов в группе павианов (табл. 3, 4). Из таблиц видно, что у старых обезьян активность была сниженной, причем больше у старых самок – до 12 – против 18,3 у пожилых особей ($P < 0,01$). Адгезивная способность тромбоцитов также снижалась с возрастом почти вдвое (с 47% до 24,5%, $P < 0,001$).

Изменения в коагулограмме с возрастом сводятся к следующим сдвигам: время свёртывания цельной крови существенно укорачивается у самок (с 8,0 мин до 3,8 мин, $P < 0,001$). Силиконовое время свёртывания как низкоконтактная проба также укорачивается с возрастом у павианов гамадрилов, а у макак резусов – более короткое время только у пожилых самок.

Каолин-кефалиновое время свёртывания – проба, чувствительная к дефициту факторов внутреннего механизма свёртывания (VIII, IX, XI, XII). В группе павианов гамадрилов отмечается сокращение времени до 43 с у старых самок против 49,4 с у пожилых, $P < 0,05$. АЧТВ – проба, также чувствительная к дефициту тех же факторов свёртывания и эффектам антикоагулянтов, исследована нами только у самцов макак резусов пожилого возраста и составляла 30,2 с (26,5 с у старых обезьян). Это указывает на гиперкоагуляцию у этих обезьян.

По другим показателям плазменного гемостаза также наблюдалось нарастание с возрастом гиперкоагуляционных сдвигов. По данным АКТ у самок макак резусов прослеживается повышение с возрастом свёртывающей активности крови по показателю «А» (до 28%), отражающему начальный этап процесса свёртывания (образование тромбопластина и тромбина) и снижение величины «ИИТ» – 1,7 и 1,5 у старых макак независимо от пола. У павианов гамадрилов такие изменения наблюдаются и у самок, но не столь высокая активность свёртывания в показателе «А» (5,2% и 9,6%) у старых обезьян, а ИИТ у них

же резко увеличивается (4,2), т.е. антикоагулянтная активность крови самок выше, чем у самцов (2,3, $P < 0,01$). Протромбиновое время плазмы с возрастом больше укорачивается у старых самок макак, а тромбиновое время в этой возрастной группе увеличивается у самок обоих видов до 13 с.

Уровень фибриногена с возрастом у обезьян повышается, что более заметно в группе самок макак резусов – до 5,6 г/л. *Фибринолиз* оценивали по интенсивности растворения сгустка фибрина под влиянием ферментативных процессов в плазме крови обезьян. Этот тест – Хагеман-зависимый фибринолиз (ХЗФ) – показал, что у макак с увеличением возраста растворение сгустка замедляется, причем значительно больше у самок (50 мин, $P < 0,001$). У другого вида обезьян – павианов гамадрилов – такого выраженного угнетения процесса растворения сгустка не обнаружено (табл. 3, 4).

Дополнительным фактором, подтверждающим гиперкоагуляционный сдвиг в системе гемостаза старых обезьян, является определение ИДКА свёртывания. Его вычисляли на основании определения силиконового и каолинового времени плазмы. Уменьшение индекса свидетельствует о гиперкоагуляционном сдвиге в группе павианов гамадрилов, где отчётливо видно его снижение у старых обезьян до 58% (72% у пожилых).

Далее, при вычислении *коэффициента тромбоопасности* в группах обезьян, оказалось, что самый низкий коэффициент среди старых самок макак резусов – 3,6, у взрослых самок – 8,5. Для павианов гамадрилов сохраняется та же тенденция к снижению коэффициента у старых самок (табл.). Исследователи [4, 10, 19, 21] отмечают, что чем ниже коэффициент, тем выше опасность тромбозов. В наших случаях у самок макак резусов возможность возникновения тромбозов выше, чем у павианов гамадрилов.

Таким образом, отмеченное нами снижение ИДКА у павианов гамадрилов и значительное уменьшение коэффициента тромбоопасности у обезьян свидетельствуют об активации в системе свёртывания крови у старых самок обезьян.

Таблица 2

Коэффициенты тромбоопасности у обследованных обезьян

Изучаемый показатель	Макаки резус				Павианы гамадрилы			
	Пожилой		Старческий		Пожилой		Старческий	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
ИДКА[1]	—	—	62,7	65,2	72,0	77,1	58,2	59,3
ИТА[2]	—	—	29,4	21,5	14,2	22,6	—	20,0
K_1[3]	9,4	8,5	8,9	3,6	23,0	29,0	23,2	12,3
K_2[4]	—	1,1	—	—	—	—	—	—

Заключение.

Таким образом, у обследованных нами обезьян в системе гемостаза присутствуют *видовые различия,* которые в общем отражают повышенный у макак резусов против павианов гамадрилов свёртывающий потенциал крови. Это согласуется с данными литературы, также свидетельствующими об активном гемокоагуляционном процессе у обезьян этого вида [13, 28]. Такая активация в системе свёртывания крови у макак резусов приводит к истощению её, что отражает заторможенный у макак ХЗФ по сравнению с павианами. Такое удлинение лизиса сгустка (до 50 мин) может быть обусловлено дефицитом плазминогена, реже фактора XII, плазменного прекалликреина или высокомолекулярного кининогена, либо наличием ингибиторов, в том числе продуктов деградации фибриногена (ПДФ) [3, 6, 12, 22, 25].

В клеточном компоненте гемостаза в мегакариоцитограмме у обезьян пожилого возраста ещё достаточно высокий процент функци-

---

[1] $\text{ИДКА} = \frac{\text{Силиконовое время} - \text{Каолиновое время богатой плазмы}}{\text{Силиконовое время}} \cdot 100$

[2] $\text{ИТА} = \frac{\text{Каолиновое время бедной плазмы} - \text{Каолиновое время богатой плазмы}}{\text{Каолиновое время бедной плазмы}} \cdot 100$

[3] $K_1 = \frac{\text{время свертывания крови, с}}{\text{ХЗФ, мин}}$

[4] $K_2 = \frac{\text{АЧТВ, с}}{\text{ХЗФ, мин}}$

онально активных форм. Функционально полноценные мегакариоциты оказывают регулирующее влияние на общее число тромбоцитов в русле крови. Зная количество тромбоцитов периферической крови и процент деятельных мегакариоцитов, отношение последних к функционально неактивным, можно дать количественную оценку функционированию мегакариоцитов. В результате вычислений возникает величина, отражающая индекс активности мегакариоцитов (ИАМ). В наших наблюдениях он был достаточно высоким: до 2,4, что выше нормы для людей среднего возраста (1,3) [7]. У здоровых людей с увеличением возраста уменьшается содержание функционально активных форм мегакариоцитов и свободных ядер. Считают, что это свидетельствует о своеобразной редукции системы «мегакариоцит – тромбоцит» и, как следствие, о развитии тромбоцитопении. С возрастом снижается пролиферативный потенциал костного мозга, а значит, и компенсаторные возможности у пожилых людей уменьшаются. Вследствие этого пожилые люди более подвержены анемиям [3, 8, 10, 12]. У обезьян с *увеличением возраста* мы не отмечали изменения в количественном содержании тромбоцитов. В тромбоцитограмме имелись изменения: увеличение старых дегенеративных форм тромбоцитов и некоторое снижение в старческом возрасте зрелых тромбоцитов. В пожилом и старческом возрасте у людей также отмечают увеличение этих форм тромбоцитов и объясняют это удлинением срока их жизни. Указывается, что старые формы тромбоцитов живут 36 ч вместо 15 ч в молодом возрасте и, следовательно, циркулируют в кровотоке дольше [7, 16, 29]. С возрастом у людей происходит снижение функциональной активности тромбоцитов [5, 6, 7, 12, 26].

В плазменных показателях гемостаза с возрастом у обезьян мы наблюдали нарастание гиперкоагуляционного процесса в крови с параллельным угнетением фибринолиза. И отмеченная выше гипофункция тромбоцитов, возможно, служит своеобразным рычагом, благодаря которому устанавливается временное равновесие в системе гемостаза обезьян при старении организма. Наши данные совпадают с исследованиями в клинике [5, 9, 10], когда одной из причин тромбозов в преклонном возрасте человека является сниженное содержание противосвёртывающих механизмов крови и угнетение фи-

бринолиза, чем и объясняется целесообразность применения антикоагуляционной терапии в пожилом возрасте [2, 4, 6, 10, 11, 12, 18, 19]. Иначе сужаются жизненные границы физиологической системы гемостаза.

Кроме того, исследователями отмечено, что у людей старших возрастных групп в крови присутствуют активированные лейкоциты, выделяющие в кровь инициатор коагуляции TF (тканевой фактор); к ним также относят моноциты крови и макрофаги сосудистой стенки [5, 20]. Основными стимуляторами процесса коагуляции исследователи считают наличие противовоспалительных цитокинов (IL-1a, IL-6, 8), стимулирующих в том числе и гепатоциты, а значит, усиливающих синтез фибриногена, С-реактивного белка (СРБ), церулоплазмина и других белков острой фазы. Одновременно с этим ингибируется синтез естественных антикоагулянтов (простагландины, тромбомодулин, антитромбин-III (AT-III) и фибринолиз) [23, 24, 25].

Кроме того, исследования, проведенные в последние годы, указывают на значение белков теплового шока – шаперонов HSP в защите клеток от повреждающих факторов, а также геропротекторное их влияние на систему гемостаза. Однако отмечено, что с возрастом функция HSP значительно снижается, и это неуклонно приводит к гибели клеток с высвобождением прокоагулянтов, инициирующих внутрисосудистое свёртывание крови и постепенно приводящих к смерти организма [21]. У людей пожилого и старческого возраста нарушается динамическое равновесие внутри системы гемостаза и резко снижается её надежность. Это – одна из причин частого тромбоза, инфаркта миокарда и другой сердечнососудистой патологии в пожилом и старческом возрасте [10, 12, 19, 22, 26, 27].

С увеличением продолжительности жизни обезьян гиперкоагуляционная направленность крови увеличивается на фоне депрессии фибринолиза и некоторой активации противосвёртывающей системы. При условии сбалансированного состояния этих механизмов продолжительность жизни обезьян увеличивается и может составлять 35 – 40 лет у отдельных особей, что соответствует возрасту человека 100 лет и более [13, 15, 28, 29].

Выводы.

1. Исследования гемостаза проведены у двух видов обезьян – павианов гамадрилов и макак резусов – старших возрастных групп: пожилой возраст (13– 19 лет) и старческий (20 лет и старше)

2. Выявлены видовые различия, свидетельствующие о высоком свёртывающем потенциале крови у макак резусов.

3. С увеличением возраста у обезьян на фоне ещё сохраненного мегакариоцитопоэза уже появляются признаки дегенерации и снижения его функциональной способности.

4. У старых обезьян повышается тромбопластинообразование и угнетение противосвёртывающих механизмов, что отражает готовность к тромбообразованию.

5. У обезьян пожилого и старческого возраста возрастает коэффициент тромбоопасности, что указывает на активацию свёртывания крови.

6. Анализ различий по полу отражает более активный гемостаз у самок, особенно у макак резусов.

7. Система гемостаза здоровых обезьян имеет свои физиологические колебания, соответствующие виду, возрасту и полу, которые необходимо учитывать при использовании этих животных в медико-биологических экспериментах.

8. Дополнительные сведения, полученные нами на обезьянах старшего возраста, могут быть использованы в медицинских экспериментах на этих видах лабораторных животных.

Таблица 1

Мегакариоцитограмма у обезьян пожилого возраста

(в процентах, M ± m)

	Макаки резус взрослые 13 – 19 лет		Павианы гамадрилы взрослые 13 – 19 лет	
	♂ n = 3	♀ n = 8	♂ n = 6	♀ n = 6
Мегакариобласты	1,0	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,04	0,42 ± 0,3
Промегакариоциты	3,0	2,0 ± 0,4	3,5 ± 0,4	2,4 ± 0,4

МКЦ функционально активные	64,0	59,8 ± 2,9	58,7 ± 3,2	60,2 ± 5,6
МКЦ функционально неактивные	26,0	28,4 ± 1,3	27,3 ± 2,4	26,6 ± 5,0
Дегенеративные формы	4,0	1,0 ± 0Ю2	1,8 ± 0,07	1,5 ± 0,3
Свободные ядра	6,0	8,0 ± 1,2	9,3 ± 2,4	9,7 ± 0,4
Индекс активности МКЦ	2,4	2,1	2,1	2,3

Тромбоцитограмма у обезьян старческого возраста

(в процентах, M ± m)

	Макаки резус взрослые старше 20 лет				Павианы гамадрилы взрослые старше 20 лет			
	♂ n = 9	♀ n = 8	♂ n = 13	♀ n = 6	♂ n = 7	♀ n = 9	♂ n = 14	♀ n = 14
Тромбоциты, × 109/л	25,3 ± 1,1	27,0 ± 2,1	32,0 ± 2,4	38,5 ± 3,2	30,0 ± 2,3	32,7 ± 2,2	34,6 ± 0,7	37,2 ±3,0
Юные формы	2,1 ± 0,4	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,1	2,0 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,5 ± 0,8	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,3
Зрелые формы	77,0 ± 2,0	79,5 ± 0,8	72,8 ± 0,3	78,0 ± 0,5	80,0 ± 2,3	78,2 ± 1,5	73,0 ± 2,4	72,3 ± 1,0
Старые формы	11,3 ± 0,8	9,7 ± 0,6	12,9 ± 0,6	13,0 ± 0,3	12,6 ± 1,4	10,5 ± 1,2	13,5 ± 0,1	13,3 ± 0,9
Дегенеративные формы	4,3 ± 0,6	3,1 ± 0,2	4,5 ± 0,2	3,0 ± 0,1	4,0 ± 0,5	3,5 ± 0,3	4,5 ± 0,8	4,3 ± 0,3
Формы раздражения	5,5 ± 0,7	3,8 ± 0,5	6,0 ± 0,9	4,0 ± 0,2	3,4 ± 0,3	3,9 ± 0,5	6,5 ± 0,7	5,7 ± 0,5

Гемостаз у павианов гамадрилов

(M ± m)

	Пожилой возраст 13 – 19 лет	Старческий возраст Старше 20 лет

		♂ n = 5	♀ n = 11	♂ n = 6	♀ n = 8
Тромбоциты, × 109/л		30,0 ± 2,3	32,7 ± 2,2	34,6 ± 0,7	37,2 ± 3,0
3-й фактор тромбоцитов, с		19,0 ± 1,2	18,3 ± 1,4	17,0 ± 0,2	12,0 ± 3,1
Адгезивная способность тромбоцитов,		40,8 ± 3,0	47,0 ± 4,0	26,9 ± 2,0	34,5 ± 1,7
Время свёртывания, мин		8,3 ± 0,1	7,7 ± 0,6	5,7 ± 0,8	3,8 ± 0,3
Силиконовое время, с		250,0 ± 8,0	198,0 ± 10,7	91,0 ± 3,1	105,0 ± 2,8
Каолин-кефалиновое время, с		43,0 ± 0,4	49,4 ± 4,2	54,0 ± 0,1	43,0 ± 0,2
АЧТВ, с					
АКТ, %	А	10,0 ± 2,0	10,3 ± 1,7	5,2 ± 1,0	9,6 ± 0.7
	МА	78,0 ± 0,5	68,6 ± 9,2	61,5 ± 4,3	77,0 ± 5,8
	ИИТ	2,1 ± 0,5	2,9 ± 0,3	2,3 ± 0,5	4,2 ± 0,7
Протромбиновое время, с		18,4 ± 0,3	16,0 ± 1,0	18,1 ± 0,6	19,3 ± 0,8
Тромбиновое время, с		12,0 ± 0,1	12,0 ± 0,8	12,0 ± 0,1	13,0 ± 0,3
Фибриноген, г/л		4,3 ± 0,1	4,5 ± 0,2	4,3 ± 0,4	4,8 ± 0,2
ХЗФ, мин		21,0 ± 5,0	16,3 ± 2,1	15,5 ± 3,1	17,8 ± 4,0
ИДКА, %		72,0 ± 0,5	77,1 ± 1,2	58,2 ± 0,3	59,3 ± 6,0

Гемостаз у макак резусов

(M ± m)

	Пожилой возраст 13 – 19 лет		Старческий возраст Старше 20 лет	
	♂ n = 9	♀ n = 8	♂ n = 13	♀ n = 6
Тромбоциты, × 109/л	25,3 ± 1,1	27,0 ± 2,1	32,0 ± 2,4	38,5 ± 3,2
3-й фактор тромбоцитов, с			25,0	
Адгезивная способность тромбоцитов,	25,6 ± 2,1		26,5 ± 1,5	
Время свёртывания, мин	3,4 ± 0,1	4,3 ± 0,3	3,6 ± 0,1	3,0 ± 0,1

Силиконовое время, с		148,7 ± 19,4	110,0	220,0	200,0
Каолин-кефалиновое время, с		40,0			
АЧТВ, с		30,2 ± 1,0		26,5 ± 1,5	
АКТ, %	А	18,2 ± 1,5	14,8 ± 1,4	17,5 ± 1,2	28,3 ± 0,8
	МА	66,6 ± 3,5	61,0 ± 5,3	64,8 ± 3,0	57,0 ± 5,6
	ИИТ	3,4 ± 0,7	2,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,2
Протромбиновое время, с		18,3 ± 1,1	17,5 ± 0,3	19,0 ± 0,7	15,2 ± 0,3
Тромбиновое время, с		12,8 ± 0,6	11,0 ± 0,1	10,5 ± 0,3	12,5 ± 0,2
Фибриноген, г/л		4,1 ± 0,3	5,0 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,7
ХЗФ, мин		22,3 ± 2,4	28,5 ± 1,4	23,4 ± 3,0	50,0 ± 6,0
ИДКА, %				62,7	65,2

Литература

1. Абрамов М.Г. Гематологический атлас. Москва, Медицина, 1979. 300 с.
2. Александрова Л.А., Жлоба А.А., Алексеевская Е.С. Окислительный стресс при активации внутрисосудистого свёртывания и фибринолиза. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция,* 2014, №1, с. 79 – 82.
3. Балуда В.П., Балуда М.В., Деянов И.М., Тлепушков И.К. Физиология системы гемостаза. Москва, 1995. 224 с.
4. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Москва, Ньюдиамед, 2008. 290 с.
5. Болезни крови у пожилых. Под ред. М.Дж. Денхэма, И. Чанарина. Москва, Медицина, 1989, с. 165 – 194.
6. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Взаимодействие лейкоцитов и тромбоцитов с эндотелием и ДВС-синдром. *Тромбоз, гемостаз и реология,* 2006, №1, с. 15 – 28.
7. Германов В.А., Чакина Л.А., Зиновьев Е.Д. и др. Особенности гемостаза при старении. *В кн.:* Очерки практической гемостазиологии. Под ред. В.А. Германова. Куйбышев, 1971, с. 45 – 56.
8. Германов В.А., Пиксанов О.Н., Юрлова В.М. Тромбоциты. Куйбышев, 1973. 139 с.
9. Давыдовский И.В. Геронтология. Москва, Медицина, 1966, с. 130 – 134.

10. Кипшидзе Н.Н. и др. *В кн.:* Актуальные вопросы сердечнососудистой патологии. Вып. 1. Тбилиси, 1963. 285 с.
11. Козинец Г.И., Макаров В.А. Исследование системы крови в клинической практике. Москва, Триада, 1998. 598 с.
12. Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Люлькина Е.В. Возрастные особенности системы гемостаза у людей. *Успехи геронтологии,* 2005, вып. 16, с. 38 – 47.
13. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии. Москва, Медицина, 1987, с. 62 – 76.
14. Лапин Б.А. Итоги и перспективы медико-биологических исследований на приматах. *БЭБиМ,* 1996, 122 (9), с. 245 – 256.
15. Лапин Б.А. Перспективные направления исследований на приматах. *В кн.:* Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии. Материалы второй Международной научной конференции, т. 1. Сочи-Адлер, 2011, с. 12 – 20.
16. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. Москва, 2011, с. 10 – 56.
17. Маркосян А.А. Онтогенез системы свёртывания крови. Ленинград, 1968. 188 с.
18. Маркосян А.А. Надёжность физиологических систем и онтогенез. *В кн.:* Молекулярные и фундаментальные основы онтогенеза. Москва, 1970,. 320 с.
19. Михайлова-Лукашева В.Д. Биология старения. Минск, 1968. 158 с.
20. Мякотных В.С., Березина Д.А., Боровская Т.А., Гаврилов И.В. Сравнительная биохимия процесса старения мужчин и женщин. *Успехи геронтологии,* 2014, т. 27, №4, с. 612 – 617.
21. Нагорный В.А., Пигаревский П.В., Мальцева С.В. Шапероны и их роль в атерогенезе. *Вестник Российской АМН,* 2008, №1, с. 41 – 45.
22. Нагорный А.В., Никитин В.Н., Буланкин И.Н. Проблемы старения и долголетия. Москва, Медицина, 1963.
23. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. 35-летний опыт исследований пептидной регуляции старения. *Успехи геронтологии,* 2009, т. 22, с. 11 – 23.
24. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Линькова Н.С. Влияние пептидных биорегуляторов и белков теплового шока на возрастные изменения системы гемостаза. *Тромбоз, гемостаз и реология,* 2011, №4, с. 15 – 32.
25. Хавинсон В.Х. и др. Влияние пептидных биорегуляторов и цитокинов на продолжительность жизни и возрастные изменения системы гемостаза. *Успехи физиологических наук,* 2013, №1, с. 39 – 44.
26. Чазов Е.И. Пути снижения смертности от сердечнососудистых заболеваний. *Терапевтический архив,* 2008, №8, с. 11 – 16.

27. Bernuzzi G., Turdito S., Bussolatio O. et al. *Blood Transfus.,* 2010, v. 8, No. 4, p. 237 – 247.
28. Gromnica-Ihle E. Blutgerinnung im alter und besondere Heiten der antithrombotischen Therapie. *Z. ärzti Fortbild,* 1989, Bd. 83, Nr. 11, S. 589 – 593.
29. Seamon A., Malinow M.R. Blood clotting in nonhuman primates. *Lab. Anim. Care,* 1968, 18, 1, p. 80 – 84.
30. Whette J. *Platelets,* 2000, vol. 11, No. 1, p. 49 – 55.

ДЕЙСТВИЕ ФЕНИЛГИДРАЗИНА НА НЕКОТОРЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ОБЕЗЬЯН ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ В МАЛЫХ ДОЗАХ.

Сабекия Ж.Д., Баркая В.С., Елистратова Ж.В., Фоменко В.Н., Ахуба Л.О., Алексян А.А., Джокуа А.А., Кулава Н., Шевцова З.В., Матуа А.З.
НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, г. Сухум.

Резюме

На обезьянах изучен эффект длительного введения малых доз фенилгидразина (ФГ). Эксперимент проведен на двух группах. Препарат вводили в дозе 2 млг/кг (2 раза в неделю) и 4 млг/кг (1 раз в неделю). Выявлено снижение гемоглобина у обеих групп, повышение ретикулоцитов периферической крови. Отмечено изменения печеночных проб (связанный билирубин, АлТ, АсТ). Результаты теста оперативной памяти (ОП) свидетельствуют о негативном воздействии ксенобиотика на центральную нервную систему (ЦНС). Исследованные цитокины – ФНО-a, ИНФ-g, ИЛ-1b – без изменении.

Ключевые слова: обезьяна, анемия, фенилгидразин.

EFFECT OF PHENYLHYDRAZIN ON SOME FUNCTIONAL SYSTEMS OF MONKEYS AT PROLONGED INTRODUCTION IN SMALL DOSES

Sabekia Zh.D., Barkaya V.S., Elistratova Zh.V., Fomenko V.N., Akhuba L.O., Aleksian A.A., Dzhokua A.A., Kulava Z., Shevtsova Z.V., Matua A.Z.

Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum.

sabekiajanna@yandex.ru

Abstract

The effect of prolonged introduction of smoll doses of phenylhydrazin (PH) was studied on monkeys. The experiment was carried out with two groups. The preparation was introduced in dose of 2 mig/kg (twice a week) and 4 mlg/kg (once a week). It was revealed the reduction of hemoglobin in both groups and the increase of reticulocytes of peripheral blood. The change of liver assays (bounded bilirubin, AlT,AsT) was marked. The resnts of operating memory (OM) test show the negative effect of PH on central nervous system (CNS). Tested cytokines – FNO-α, INF-γ, IL-1β were not changed.

Key words: monkey, anemia, phenylhydrazin.

Введение.

Токсические анемии приобретают все больший удельный вес в связи с загрязнением окружающей среды. Эксперименты по моделированию таких состояний выполнены с использованием доз, близких к летальным [3;5;7]. Что касается влияния малых концентрации длительно поступающих в организм (через ЖКТ, дыхательные системы, кожные поверхности), то такие исследования отсутствуют вовсе. И в этом отношении особо важны сведения, полученные на биологических объектах, как наиболее близких к человеку – обезьянах.

Цель исследования – изучить влияние малых доз фенилгидразина (ФГ) на некоторые функциональные системы организма обезьян

macaca mulatta. В работе приводятся данные фрагмента (50 дней наблюдения) из запланированного длительного многомесячного введения препарата по созданию устойчивого анемического состояния.

Материалы и методы.

В пробах крови определяли:

- количество гемоглобина, эритроцитов и тромбоцитов на анализаторе PCE – 210, Япония.
- лейкоцитарную формулу – по общепринятой методике [1;2]
- содержание ретикулоцитов в мазках, окрашенных бриллиант крезиловым синим [1;2]
- биохимические показатели: ферменты АлТ и АсТ, связанный билирубин, глюкоза на анализаторе BioChem SA.
- уровень цитокинов (ФНО-α, ИНФ-γ, ИЛ-1β) на ИФА-анализаторе, США.
- тест на состояние оперативной памяти (ОП) обезьян по методике отсроченных реакции (ОР) с применением специальной тест-кормушки [4].

В эксперименте использованы 6 половозрелых самцов macaca mulatta в возрасте 6-9 лет, весом 9-15 кг, содержащихся на типовом рационе, разработанном в ННИЭПиТ, г. Сухум. Животных разделили на две группы. Все обезьяны получали еженедельно по 4 млг/кг ФГ. Первой группе препарат вводили дробно – по 2 млг/кг, второй – 4 млг/кг. Пробы крови брали из локтевой вены в утренние часы до кормления. Сроки наблюдения: фон, 3сутки,7 день, 15 день, 22 день, 35 и 50 сутки.

Результаты.

Снижение гемоглобина у 1-й и 2-й групп животных отмечено на 15 день эксперимента, достигнув наименьших цифр к 35 суткам (26 и 29% от фона соответственно). Количество же эритроцитов удерживалось на уровне близких к фоновым показателям. Прослеживаются незначительные колебания лейкоцитов на 15 день у 1-й группы в пределах нормативных значении. У 2-й группы в эти же сроки более заметное повышение лейкоцитов - на 39%, преимущественно за счет зрелых нейтрофилов. Показатели СОЭ за весь период наблюдения оставались без отклонении (2-4 мм/ч). Более показательны содержание ретикулоцитов: уже на 7 день введения препарата их количество увеличилось - у 1-й группы в два раза, у 2-й в три раза (рис 1).

Биохимические показатели крови: на 22 день наблюдения у всех обезьян повысился связанный (прямой) билирубина в 2,8 раза. Концентрация AsT незначительно увеличилась с 35 суток. Более показателен уровень AlT: с седьмого дня введения фенилгидразина наблюдается тенденция к повышению его количества у 2-й группы. Содержание глюкозы колебалось в пределах физиологических значении у всех обезьян. Исследование ФНО-α, ИНФ-γ, ИЛ-1β (фон, 2 нед., 22 сут.) не выявило существенных отклонении от норм.

В табл.1 представлены показатели по тесту оперативной памяти. Как видно из пяти обезьян две совсем не справлялись с выполнением теста, а у трех животных направленность динамики выполнения теста ОП была отрицательной (от -5 до -20) как при 5-ти, так и при 10-ти секундных отсрочках.

Обсуждение

Со стороны красной крови не отмечено четкой картины, характерной для анемического состояния. Клинический анализ также не выявил заметных изменении клеточного состава крови, за исключением увеличения ретикулоцитов периферического звена у обеих групп животных. Однако, длительное введение ксенобиотика сопровождается нарушением функции печени (билирубин, ферменты), что свидетельствует о цитотоксическом действии ФГ. На это же и указывают данные теста ОП. По существу все пять обезьян или не справились с выполнением теста, или показали отрицательную направленность при всех испытанных отсрочках. Более негативное воздействие препарата выражена у группы, получавшей по 4 млг/кг веса еженедельно.

Отсутствие реакции цитокинов и устойчиво низкие показатели СОЭ свидетельствует о том, что действие ксенобиотика не сопровождается воспалительной реакцией. Это согласуется со слабым активностью белого ростка костного мозга: невысокий уровень лейкоцитов даже у второй группе обезьян.

Выводы.

- впервые показаны гепатотоксические и нейротоксические свойства фенилгидразина.

- слабо выраженная анемизация – вероятно, результат повышенной устойчивости эритроцитов за счет образования мембраносвязанного гемоглобина[8].

- отсутствие реакции цитокинов на фоне низких показателей СОЭ и лейкоцитов указывает на то, что введение ксенобиотика в малых концентрациях не сопровождается воспалительной реакцией на данном этапе эксперимента [6].

Литература

1. Анализы. Полный справочник. Основы лабораторных показателей, нормы, методика проведения исследования. Под ред. Ю.Ю. Елисеева. Москва (2009).
2. Воробьев А.И.. Руководство по гематологии, Т.2, Медицина,Москва (1985),с.94-111.
3. Н.А. Григорович, БЭБиМ, Т.2, (1966),с.29-31.
4. Джокуа А.А. Физиологические эффекты длительной клиностатической гипокинезии обезьян. Автореферат. Москва, 1987.
5. Зюзьков Г.Н.,. Абрамов Е.В, Дыгай Е.В. БЭБиМ, Т.138 (№10) с. 378-381 (2004).
6. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С.. Цитокины, Фолиант (2008).
7. Сабекия Ж.Д.,. Баркая В.С, Ершова Л.И. и др. Влияние фенилидразина на некоторые гематологические показатели в эксперименте на обезьянах. Материалы Сочинской третьей международной конференции, Т.2, 8-10 августа 2016г., Сочи, с. 122-131.
8. van Zwieten R., Verhoeven A.J., Roos D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. Free. Med. V.67. P. 377-386. 2014.

Таблица 1.

Обезьяны	Дни опытов	Среднее кол.% 5/ 10-ти сек.	5-ти сек. отсрочка	10-ти сек. отсрочка
№ 1 (1группа)	Опыт 1 Опыт 2 Опыт 3	55 /43,3%	60% 50% 55% -5	50% 40% 40% -10
№ 2 (2группа)	Опыт 1 Опыт 2 Опыт 3	48,3/38,3%	60% 40% 45% -15	50% 35% 30% -20

№ 3 (2группа)	Опыт 1 Опыт 2	55 /45%	60% 50% -10	50% 40% -10
№ 4 (2группа)	----------	----------	----------	----------
№ 5 (1группа)	----------	----------	----------	----------

Примечание: *в качестве основных анализируемых показателей использовали: уровень положительных (правильных) ответов в каждом опыте, средний уровень по всем дням тестирования, а также разницу уровней положительных ответов между последним и первым днями опытов, что позволяло определить направленность динамики положительного или отрицательного выполнения теста ОР.*

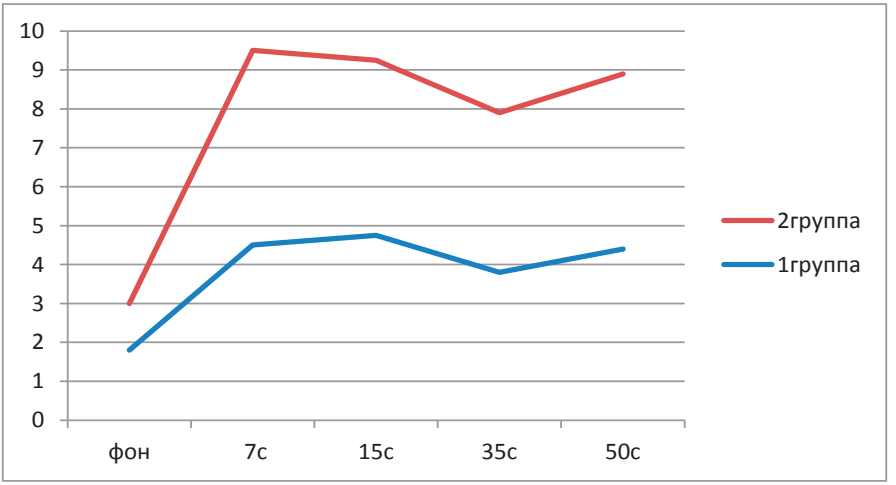


Рис 1. *График изменения ретикулоцитов 1-й и 2-й групп животных ×1000*

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СВЕТОВОГО ДЕСИНХРОНОЗА

Антонова В.М., Журкин К.И., Злобина О.В., Андронова Т.А.
ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России
Саратов, Российская Федерация
antonova.v.m@mail.ru

Резюме

Световой десинхроноз является актуальной проблемой современности, так как выступает инициатором множества патологических процессов. Механизмы регуляции системы кровообращения имеют ярко выраженные биологические ритмы и тонко реагируют на изменения продолжительности светового дня. В этой связи актуально изучение влияния светового десинхроноза на систему гемостаза экспериментальных животных в эксперименте. В ходе работы было проведено исследование функционального состояния симпатоадреналовой системы, как стресс-реализующей.

Ключевые слова: световой десинхроноз, катехоламины, симпатоадреналовая система, гемостаз.

EVALUATION OF THE FUNCTIONAL STATE OF THE HEMOSTASIS UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL LIGHT-INDUCED DESYNCHRONOSIS

Antonova V.M., Zhurkin K.I.
Saratov State Medical University, Saratov, Russia
zhurckin.md@yandex.ru

Abstract

Light-induced desynchronosis is an actual problem of our time. The circulatory system's mechanisms of regulation have pronounced biological rhythms and subtly respond to changes in day length. In this regard, rele-

vant is the study of the influence of light-induced desynchronosis on hemostasis in the experiment. In the course of work, a study was conducted of the functional state of sympathoadrenal system as stress-realizing system.

Key words: light-induced desynchronosis, catecholamine, sympathicoadrenal system, hemostasis.

Введение. Одной из главных характеристик цивилизации на Земле сегодня является интенсивный научно-технический прогресс, открывающий человечеству огромные перспективы. Однако следует отметить – вместе с тем происходит полная замена естественной среды на искусственную [7], что сопровождается появлением множества факторов, к которым человек эволюционно не приспособлен [2]. Они могут неблагоприятно воздействовать на функционирование различных органов и систем, в частности, приводят к нарушению биологических, в том числе циркадных, ритмов организма, что, в свою очередь, способствует развитию хронопатологии – десинхронозу [4]. У здоровых людей десинхронизация циркадных ритмов отражается на резистентности организма к неблагоприятным воздействиям, снижает работоспособность, повышает риск развития различных заболеваний [3]. Широкий спектр патологических процессов может быть индуцирован нарушением биологических часов [7].

Свет через ретиногипоталомический тракт оказывает влияние на супрахиазматическое ядро гипоталамуса (СХЯ), которое синхронизирует различные физиологические процессы, действуя через другие ядра гипоталамуса по путям вегетативной нервной и эндокринной систем [1].

Доказано, что реорганизация работы СХЯ обладает эксплицитным влиянием на нейроэндокринные механизмы регуляции, главным образом, на симпатоадреналовую систему (САС) как стресс-реализующую [2, 5, 9]. Световое воздействие является стрессором, поэтому система гемостаза вовлекается в процесс формирования неспецифической адаптивной реакции организма [8].

Целью работы в этой связи стало изучение взаимосвязи изменений активности симпатоадреналовой системы и гемокоагуляции при световом десинхронозе в эксперименте.

Методы исследования. Все исследования проведены в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным.

Эксперимент выполнен на 20 белых беспородных крысах-самцах массой 200-250 г, разделенных на четыре равные группы: контрольную и три опытных, в которых животные подвергались световому воздействию на 1-ые, 10-ые и 21-ые сутки эксперимента.

Имитация светового десинхроноза выполнена путем изменения режима освещения в лаборатории. На животных опытных групп было оказано неестественное световое воздействие в темное время суток с помощью искусственного освещения, создаваемого лампой дневного света, эквивалентной лампе накаливания мощностью 60 Вт.

Изучение показателей гемокоагуляции – активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), протромбинового времени (ПВ), концентрации фибриногена (ФГ) – выполнено с помощью клоттинговых методов с использованием автоматического коагулометра CEVERON® alpha (производство Technoclone GmbH, Austria). Применен набор реактивов фирмы Technoclone GmbH (Austria): Siron LS (жидкий реагент для определения АЧТВ), Technoplastin HIS (лиофилизированный реагент для определения ПВ), набор реагентов для определения ФГ.

Изучение функционального состояния симпатадреналовой системы проведено с помощью подсчета количества катехоламинов в мазках крови, приготовленных по методике, предложенной *А.И. Мардарь, Д.П. Кладиенко.*

Полученные результаты были обработаны вариационно-статистическим методом с помощью программы «STATISTICA 10» («StatSoft», USA). Поскольку большинство полученных результатов не соответствовали закону нормального распределения, был применен непараметрический критерий Манна-Уитни. Достоверными считали различия при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. У животных, подвергавшихся в течение суток световой депривации, происходит укорочение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), что отражает активацию внутреннего механизма гемокоагуляции, вероятно, за счет стимуляции симпатической нервной системы и последующего поступления в кровь катехоламинов, количество которых увеличивается в 4 раза по сравнению с контрольными значениями. Данные изменения отражают острую стресс-реакцию на световое воздействие.

На 10-е сутки эксперимента также наблюдаются признаки гиперкоагуляции, обусловленные усилением работы внутреннего механизма свертывания крови и проявляющиеся укорочением АЧТВ. Однако, уровень катехоламинов, сорбированных на эритроцитах, несколько снижается по сравнению с 1 сутками эксперимента, но остается достаточно высоким в сравнении с контрольной группой. Это свидетельствует о переходе в стадию адаптации и некоторой компенсации происходящих нарушений.

На 21-е сутки эксперимента сохраняются, как и в других группах, нарушения внутреннего механизма коагуляции, что проявляется укорочением АЧТВ. Наблюдается ярко выраженное увеличение концентрации фибриногена. Также происходит резкое укорочение протромбинового времени, что свидетельствует об активации внешнего механизма свертывания крови и, возможно, обусловлено гиперфибриногенемией и увеличением содержания в крови тканевого тромбопластина и тромбопластинподобных веществ, что, вероятно, является следствием ишемии прилежащих к нутритивному сосуду тканей [6]. Подобные изменения отражают переход в стадию истощения, что подтверждается резким выбросом катехоламинов в кровь. Количество включений катехоламинов на эритроцитах в 5,5 раз превышает контрольные значения.

Выводы. Таким образом, наблюдается изменения симпатического адренергического механизма регуляции системы гемостаза, что проявляется появлением признаков гиперкоагуляции, наиболее выраженных на 21-ые сутки эксперимента. Это, в свою очередь, обусловленно нарушениями как внутреннего, так и внешнего механизмов свертывания крови. В целом, по результатам проведенного исследования можно сделать вывод о том, что световой десинхроноз индуцирует серьезные изменения работы системы свертывания крови, что позволяет рассматривать его как потенциального инициатора множества патологических процессов.

Литература

1. Будкевич Р.О., Евдокимов И.А., Будкевич Е.В. Теоретические предпосылки управления биоритмами с использованием функциональ-

ных продуктов питания // Техника и технология пищевых производств. 2010. Т.18, №3. С. 73-76.
2. Ежов С.Н. Аспекты экологической физиологии: типы географических перемещений и виды десинхронозов / Известия Дальневосточного федерального университета. Экономика и управление. 2007. №2. С. 78-89.
3. Ежов С.Н., Кривощеков С.Г. Хронорезистентность, биоритмы и функциональные резервы организма в фазах десинхроноза при временной адаптации // Сибирский научный медицинский журнал. 2004. №4. С. 77-83.
4. Заславская Р.М., Васькова Л.Б., Болсуновская Ю.Р. Хронофармакология и хрономедицина как новый методологический подход к оптимизации лечения / Пространство и Время. 2012. №1. С. 195-198.
5. Застрожин М.С., Агарвал Р.К., Чибисов С.М. Десинхроноз как проявление нормы и патологии // Здоровье и образование в XXI веке. 2012. Т.14, №2. С. 51-54.
6. Изменения микроциркуляции при экспериментальном световом десинхронозе / А.Н. Иванов, О.В. Злобина, К.И. Журкин и др. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2017. Т. 16, №1(61). С. 43-48.
7. Морфофункциональное состояние почек в стадию структурных нарушений светового десинхроноза в эксперименте / В.М. Антонова, О.В. Злобина, А.Н. Иванов и др. // Современные проблемы науки и образования. 2017. №1. С. 62.
8. Шахматов И.И., Киселев В.И. Влияние кратковременного стресса на гемостаз у крыс // Казанский медицинский журнал. 2010. Т. 91, №4. С. 464-467.
9. Scheer FA, Kalsbeek A, Buijs RM. Cardiovascular control by the suprachiasmatic nucleus: Neural and neuroendocrine mechanisms in human and rat. Biol. Chem. 2003; 384: 697-709.

ВЛИЯНИЕ ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА НА ВЫСШУЮ НЕРВНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ОБЕЗЬЯН СУХУМСКОГО ПИТОМНИКА

Аргун С.Н., Джокуа А.А., Кулава З., Баркая В.С., Миквабия З.Я.
НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, г.Сухум, Абхазия

Резюме

В 2010году в лаборатории физиологии и патологии высшей нервной деятельности (ВНД) были начаты исследования биологических эффектов длительного ведения физиологических доз дегидроэпиандростерона (ДГЭА) и продолжаются по настоящее время на 24 животных 4-х групп, что составило 771опытов по УДПР и 456 по ОП. Получены приоритетные данные о нейропротекторном эффекте ДГЭА, наиболее ярко выраженном у обезьян, достигших предела своего биологического возраста. Длительное введение ДГЭА улучшало анализируемые параметры ВНД, уравновешивая основные нервные процессы и повышало реактивность ЦНС. Резко увеличивались общая двигательная активность и пищевая мотивация.

У животных других возрастных групп (13-14, 15-17 и 24-30 лет) протекторный эффект ДГЭА сохранялся в течение 2-3 лет после окончания лечения. Наблюдался тренд к повышению уровней ДГЭА, тестостерона и свободного тироксина в циркулирующей крови обезьян.

Ключевые слова: дегидроэпиандростерон, высшая нервная деятельность, центральная нервная система, оперативная память, условные двигательные пищевые рефлексы, уровень выполнения рефлексов, латентные периоды, межсигнальные реакции.

EFFECT OF DEHYDROEPIANDROSTERONE ON HIGHER NERVOUS ACTIVITY OF THE SUKHUMI MONKEY NURSERY

Argun S.N., Dzhokua A.A., Kulava Z.,
Barkaya V.S. Mikvabiya Z.Ja.
SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE of experimental pathology and therapy, ANA, Sukhum, Abkhazia

Abstract

A summary of the year in the laboratories of higher nervous activity and pathology were developed research the biological effects of long-term reference physiological doses of dehydroepiandrosterone (DHEA) and continues to the present time at 24 animals 4-h groups, which amounted to 771opytov UDPR and 456 on OP. Received priority on nejroprotektornom effect of DHEA, most pronounced in monkeys who had reached the limit of their biological age. A long introduction of DHEA improved GNI options analyzed by balancing basic neural processes and increased reactivity of central nervous system. Dramatically increased overall physical activity and food motivation. Three age groups of animals (13-14, 15-17 and 24-30 years) the protective effect of DHEA remained within 2-3 years after the end of treatment. There has been a trend to higher levels of DHEA, testosterone and free thyroxine in circulating blood monkeys.

Key words: dehydroepiandrosterone, higher nervous activity, central nervous system, memory, motor reflexes, alimentary conditional execution level reflexes, latent periods, mezhsignalnye reaction.

Введение. Известно, что нейростероид ДГЭА и его сульфатная форма ДГЭА-сульфат секретируются в мозговой ткани человека, обезьян и некоторых других животных и только у представителей отряда приматов (т.е., у человека и обезьян) образуются в надпочечниках [4]. Для него, в отличии от других стероидов, характерна четкая возрастная динамика: с достижением пикового уровня к 25-30 годам и последующим постепенным снижением его продукции. Постепенное снижение ДГЭА у человека к 50-60 годам связывают с развитием заболеваний, ассоциированных с возрастом [1,4]. Многочисленными клиническими

исследованиями установлена эффективность заместительной терапии ДГЭА при возрастном или патологическом дефиците. Длительные инъекции нейростероида существенно улучшали качество жизни людей пожилого и старческого возраста. В то же время остается неопределенной роль и участие ДГЭА в обеспечении вегетативных, соматических функций организма и нервных процессов головного мозга [2].

Отсутствуют данные о влиянии ДГЭА на состояние памяти у людей среднего и молодого возраста и у обезьян (животных, наиболее близких к человеку по своей морфофункциональной организации) различных возрастных групп. Эти данные являются весьма актуальными, т.к. исследования двух последних десятилетий свидетельствуют о значительном снижении кратковременной, слухоречевой и зрительной П у детей, подростков и лиц молодого возраста. [4].

Целью работы явилось изучение эффектов длительного введения физиологических доз ДГЭА на состояние ВНД обезьян, оцениваемое по тестам кратковременной (ОП) и долговременной (условнорефлекторной) (УДПР) П.

Методы исследования. Исследования проводили на 24 самцах макаках резусах четырех возрастных групп – 4,5- 5,5 лет, 13-14, 15-17 и 24-30 лет. Анализировали показатели выполнения животными обоих тестов до введения ДГЭА (исходный период), на разных этапах эксперимента во время введения и после окончания инъекций (период отдыха). ДГЭА вводили 2 раза в неделю в дозе 1 мг/кг в течение 1 – 3 месяцев. На всех этапах оценивали эмоциональное состояние обезьян по динамике АД и ЧСС.

Результаты и их обсуждения. Установлено, что ДГЭА не оказывало влияния на эмоциональную реактивность обезьян – величины АД и ЧСС как до, так и после введения, достоверно не изменялись и соответствовали вариантам возрастной нормы (130-150/80-90 мм. рт. ст., ЧСС в среднем, 164-168 уд./мин.) Нами получены приоритетные данные о нейротропном эффекте ДГЭА, наиболее ярко выраженном у животных, достигших предела своего биологического возраста [3]. Характерной их особенностью была одинаковая последовательность и направленность позитивной динамики анализируемых параметров ВНД и гормонального статуса, сохранявшиеся (по основным показателям) в течение 2-3 лет после лечения.

Влияние ДГЭА на показатели ОП и УДПР старых обезьян.

Через 1-месяц введения ДГЭА отмечалась позитивная динамика в поведении животных: увеличилась общая двигательная активность, пищевая мотивация, улучшалось соматическое состояние животных (стойкое восстановление густоты и блеска утраченного из-за возраста шерстного покрова). У обезьян этой группы отмечалось одинаковая последовательность и однонаправленность положительных изменений исследуемых параметров выполнения УДПР и ОР. Достоверно сокращались ЛП (с3,8 до 1с) сравнительно с исходными значениями до инъекций ДГЭА, что свидетельствует об увеличении реактивности ЦНС, т.е. введение ДГЭА значительно улучшало ОП и реактивность нервной системы у старых животных.

По показателям УДПР после инъекций в течении 2-3 месяцев у всех обезьян УВР на сигналы положительного значения достигал 100%, на тормозные сигналы – 72 -100%. В 2-3 раза уменьшилось количество МСР, что говорит о снижении нервного процесса возбуждения животных (как правило доминирующего у мака резусов в условиях эксперимента) и отчетливой тенденции к сдвигу основных нервных процессов в сторону их уравновешивания. У одной особи (№2579) УВР на тормозный сигнал на всех этапах эксперимента на протяжении почти 4 лет удерживался на 100% уровне, а МСР чаще отсутствовали или их количество было минимальным (рис.1).

В процессе введения ДГЭА выявлена отчетливая тенденция к повышению уровня циркулирующего в крови ДГЭАС, тестостерона и биологически активного тироксина, что можно рассматривать как результат увеличения активности гипоталамических структур. В основе нейропротекторного эффекта ДГЭА лежи его антиглюкокорикоидное действие на уровне гиппокампа. ДГЭА может реализовывать свое действие через нейротрансмитеры. Выявленное нами повышение активации ВНД у старых животных в результате длительного введения ДГЭА может быть обусловлено оптимизацией баланса нейротрансмиттеров и как следствие, улучшение синаптической передачи в мозг.

Влияние ДГЭА на показатели ОП и УДПР обезьян 13-14 лет**.**

Инъекции ДГЭА в течение одного месяца повышали реактивность ЦНС, о чем свидетельствовало достоверное сокращение ЛП двигатель-

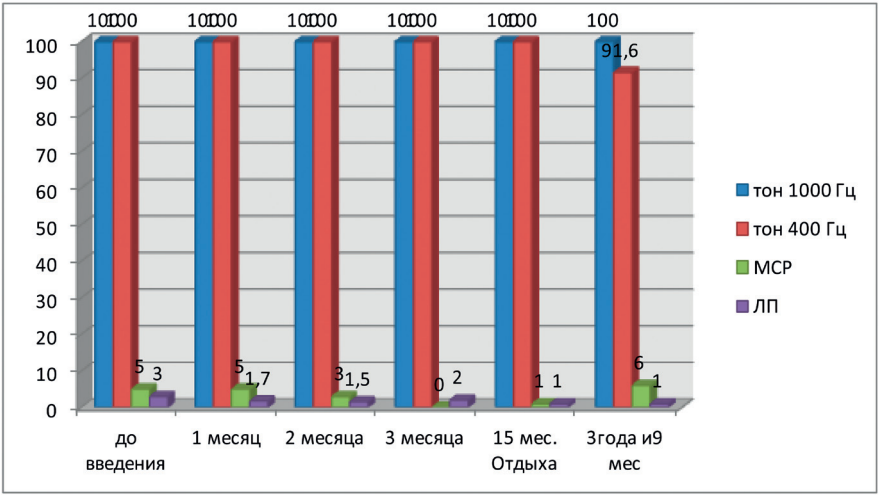


Рис.1 *Показатели УДПР до и после введения ДГЭА в течении 1,2,3 месяца и через 3 и15 мес. отдыха и после 3 лет и 9 месяцев прекращения введения ДГЭА 24-30 лет. Обезьяна № 2579*

ных ответов (с 2,3 с в среднем в исходном периоде до 1 с; $p<0,01$). Выполнение положительных рефлексов сохранялось на 100% уровне, тормозных-достоверно увеличивалось, у некоторых животных-в 2 раза.

Т.е. отмечена гармонизация основных нервных процессов. Продолжение введения препарата в течение второго месяца не изменяло УВ положительных условных рефлексов, УВ тормозных рефлексов был сопоставим с фоновым у половины животных. У других же особей двухмесячные инъекции ДГЭА приводили к снижению УВ тормозных рефлексов при одновременном увеличении количества МСР, что свидетельствовало о нарушении равновесия нервных процессов и сдвиге их в сторону возбуждения. В период после 5,6,15 месяцев и до 2 лет 9 месяцев отдыха животных вновь отмечалось повышение (улучшение) всех анализируемых показателей ВНД сравнительно с исходными. Сходная динамика наблюдалась по данным анализируемых параметров ОП. ЛП рефлексов у всех животных 13-14 лет во время двух месяцев введения ДГЭА и далее в течение 15 месяцев после прекращения инъекций были минимальными и составляли одну секунду. Количество проведенных

опытов на каждом животном по показателям ОП при 5-ти и 10-ти сек отсрочках до и после введения ДГЭА составил 10. В данную группу входило 6 обезьян, что в общем составило 60 опытов. По показателям УДПР до и после введения ДГЭА, количество опытов на каждом животном составило – 47,а общее число опытов – 282.Т.о. у обезьян 13-14 лет нейропротекторный эффект был более выраженным после введения ДГЭА в течение одного месяца и в отдаленном сроке после прекращения инъекций.

Влияние ДГЭА на показатели ОП и УДПР у обезьян 15-17 лет**.** После введения ДГЭА в течение одного месяца у трех из пяти животных группы наблюдали увеличение УВ как положительных, так и тормозных рефлексов, причем последних – в 2 раза- от 44% и 43% в исходном периоде до 83,3% – 92,1% (рис.2).

Повышение УВ тормозных рефлексов при отсутствии МСР (до инъекций их количество было довольно большим – 11-16) свидетельствовало о значительном снижении нервного процесса возбуждения, как правило, доминирующего у макак резусов в условиях эксперимента. По видимому, у этих особей изначально была низкая концентрация эндогенного ДГЭА. У двух других обезьян, с наиболее высоким УВ обоих рефлексов (98% и 68% и 96% и 67% соответственно в исходном периоде) после введения ДГЭА отмечался срыв ВНД – животное отказывалось от выполнения тестов. У них резко повышались двигательное возбуждение и агрессивность в условиях опытов. Инъекции ДГЭА были прекращены. Через 2 месяца отдыха уже у трех особей группы отмечался срыв ВНД, а у двух других УВ рефлексов и показателей ОП превышали исходные. После трех, четырех и пяти месяцев отдыха животных из всей группы из пяти особей только одна выполняла оба теста на уровне, достоверно превышающим исходные показатели (рис.2).

Восстановление параметров ОП и УДПР у четырех животных 15-17 лет в полной мере происходило через шесть месяцев после прекращения введения ДГЭА и далее в течение двух лет основные показатели ВНД удерживались на довольно высоком уровне, превышающем исходный. Только одна обезьяна (№ 31577) по-прежнему отказывалась выполнять тесты. По показателям ОП количество опытов на каждом животном-12,как при 5-ти, так

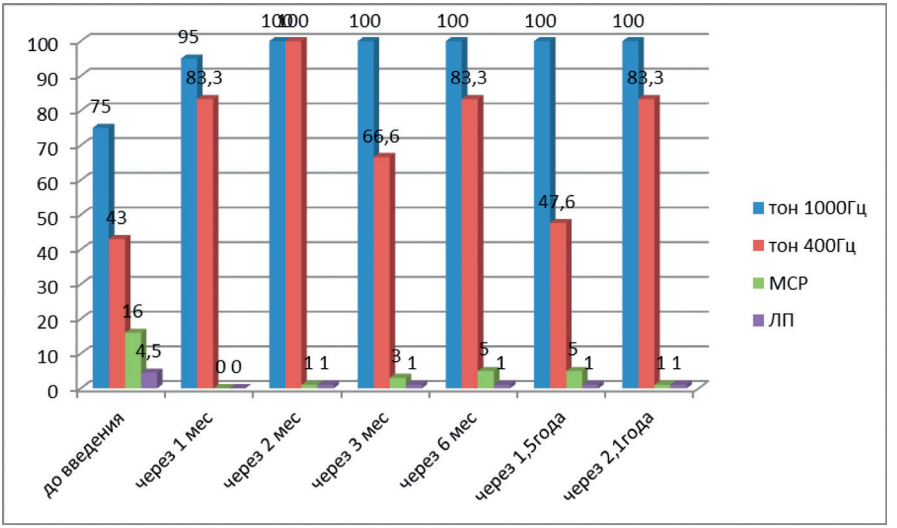


Рис.2. *Показатели состояния ВНД до и после введения ДГЭА*

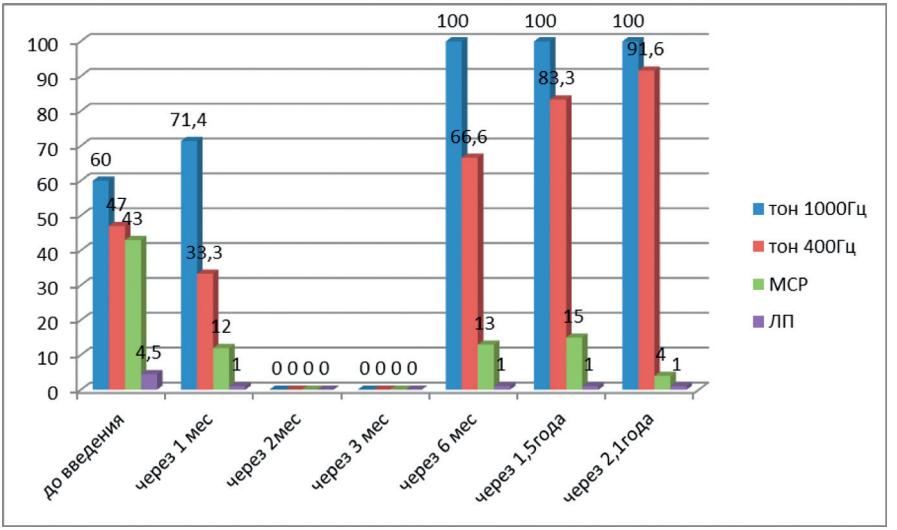


Рис.3. *Показатели состояния ВНД до и после введения ДГЭА*

и при 10-сек отсрочках. Общее число опытов 60 на каждую отсрочку. Количество проведенных опытов до и после введения ДГЭА по тесту УДПР составило – 38 на каждом животном, за исключение одной обезьяны – 17.Общее количество проведенных опытов на этой группе животных(5обезьян) –169.

Влияние ДГЭА на ОП и УДПР животных 4,5-5,5 лет**.** Опыты проводили на животных двух групп: пяти обезьянам вводили ДГЭА (экспериментальная группа), трем – физ. раствор (плацебоконтролируемая группа). До начала введения у всех животных проводили тестирование состояния ОП, определяли содержание в циркулирующей крови гормонов: ДГЭА – сульфата, кортизола, тестостерона и свободного тироксина, массу тела. Как показали наши исследования, показатели выполнения теста ОР были вариабельными как при пятисекундных, так и десятисекундных отсрочках и составляли у разных особей от 47% и 78% до 35% и 65% соответственно. Содержание ДГЭА – сульфата составляло 0,35-0,82 мкг/мл, кортизола – 1376 нмоль/л, свободного тироксина – от 5,5 до 9,7 нмоль/л, тестостерона – 2,4-3,9 ммоль/л. Инъекции нейростероида в течение одного месяца не ускоряли процесс выработки условных рефлексов у экспериментальных животных сравнительно с контрольными. У половины обезьян группы содержание ДГЭА увеличивалось, у других – снижалось. Отмечалась корреляция между УВ обоих тестов и изменениями концентрации в циркулирующей крови ДГЭА и его антагониста кортизола. Так, у резуса № 31733 после инъекций УВ теста ОП значительно повышался(до 65% и 55% сравнительно с 46% и 40% в исходном периоде при 5- и 10 – секундных отсрочках), при этом содержание ДГЭА у особи достоверно увеличивалось – до 0,55 мкг/мл (в фоне- 0,37 мкг/мл), а кортизола – снижалось – до 1266,3 нмоль/л (в фоне – 1377,6 нмоль/л). У обезьяны же № 31885 показатели выполнения теста ОР снижались до 20% и 25% сравнительно с исходными (50% и 45%) на фоне существенного уменьшения содержания в крови ДГЭА (до 0,44ммг/мл; в исходном периоде – 0,76 ммг/мл) и повышения концентрации кортизола – до 1940,9 нмоль/л (до введения препарата – 1680 нмоль/л).Через 6,8 и 10 месяцев после окончания инъекций содержание в крови ДГЭА было сопоставимо с исходными данными, но у всех животных не-

значительно ниже возрастной нормы. Уровень тестостерона достоверно увеличивался, а свободного тироксина – снижался. После прекращения введения ДГЭА динамика показателей ОП и УДПР, гормонального статуса у обеих групп обезьян практически не отличался. Введение ДГЭА не ускорял процесс выработки УВ сравнительно с плацебо-контролируемыми животными. Количество опытов проведенных для данной группы обезьян(6 животных)по 5-ти – 10опытов и 10-сек отсрочках – 10. Общее – 50опытов на каждую отсрочку. По тесту УДПР-33 опытов на каждую обезьяну. В группе 6 животных. Общее число опытов – 198 (таб.1).

Таблица 1.

Количество проведенных опытов ОП и УДПР с 2010-2017 гг.

Группы обезьян разных возрастов	Количество опытов		0бщее кол опытов
	Время ОП		УДПР
	5 сек	10 сек	
4,5-5,5лет	50	50	198
13-14лет	60	60	282
15-17лет	60	60	169
28-30лет	60	60	140
Итого:	230	230	789

Выводы.

Таким образом, как показали наши исследования, нейропротекторный эффект ДГЭА зависит как от возраста обезьян, так и от длительности введения. Для животных всех возрастных групп закономерной была устойчивость действия ДГЭА в течение длительного времени после прекращения инъекций. 100% уровень выполнения положительных рефлексов и высокая реактивность ЦНС сохранялись на протяжении 2-3 лет. Наиболее выраженное влияние ДГЭА оказывает на ВНД старых животных. У обезьян 13-14 и 15-17 лет отчетливые позитивные

изменения наблюдались после введения в течение одного месяца и в период после 5-6 месяцев и до 2-3 лет отдыха обезьян. Проведенными нами исследованиями еще раз экспериментально доказано, что низшие обезьяны могут быть использованы для изучения влияния биологически активных препаратов (в том числе центрального действия) на различные системы организма, в частности на состояние ВНД.

Литературы

1. Воронцов С.А. и др. Динамика когнитивных нарушений при психоорганическом синдроме у пациентов позднего возраста. Журнал неврологии и психиатрии, 2013, №11, с. 85-88
2. Н.П. Гончаров, Г.В. Кация. Гормон здоровья и долголетия. М., 2012, 159 с.
3. Н.П.Гончаров, Г.В. Кация, А.А. Джокуа, В.С. Баркая, З.В. Кулава, З.Я. Миквабия. Влияние нейропептида ДГЭА на состояние ВНД старых обезьян. Журн.Физиология человека, 2014, №2, т.40.
4. Baulieu E.E. Three sulfate esters of ketosteroids in the plazma of human subjects after adminisrations of ACTN I. ClinEndocrinol. 1960.20; p 900 – 904.

РАНГ, КАЧЕСТВО ОТНОШЕНИЙ И РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ САМОК ПАВИАНОВ ГАМАДРИЛОВ

Пачулия И.Г., Чалян В.Г., Мейшвили Н.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (ФГБНУ «НИИ МП»), Сочи, Адлерский район, Россия

irma-1983@mail.ru

Резюме

Проводилось изучение влияния ранга на некоторые аспекты социального поведения и репродуктивный успех самок группы павианов гамадрилов. Установлено, что иерархический статус самцов и самок

павианов гамадрилов тесно связан с их агрессивностью. Однако достигнутый благодаря своей агрессивности высокий ранг самок, практически не предоставлял им никаких преимуществ. В частности, они не были более предпочитаемыми партнершами при груминге с другими самками гарема или группы и не получали преимуществ в груминге с самцом – лидером гарема, по сравнению с низкоранговыми самками. Результаты данных показали, что ни по величине коэффициента нормальных родов, ни по выживаемости детенышей, различия между высоко – и низкоранговыми самками не достигают достоверного уровня.

Ключевые слова: Социальное поведение, ранг, репродуктивный успех, павианы гамадрилы.

RANK, QUALITY OF RELATIONS AND REPRODUCTIVE INDEXES SUCCESS IN HAMADRYAS BABOON FEMALE

Pachuliya I.G., Chalyan V.G., Meishvili N.V
Federal State Budget Research Institution
"Research Institute of Medical Primatology"
(FSBRI "NII MP"), Sochi, Russia
irma-1983@mail.ru

Abstract

A study was made of the influence of rank on certain aspects of social behavior and female reproductive success of hamadryas baboons group. It is known that hierarchical status of hamadryas baboon males and females is closely related to their aggression. High-ranking females were significantly more aggressive than low-ranking ones. However, their high rank, achieved by aggression, did not give them any visible advantages. Particularly, those high-ranking females were not preferred grooming partners for other females in harem or group as well as for harem-leader males, in comparison with low-ranking females. The analysis showed that differences between high- and low-ranking females were not reliable either in normal birth rate or in infants' survivial rate.

Key words: social behavior, rank, reproductive success, papio hamadryas.

Введение. Иерархия доминирования является важной составляющей социального поведения приматов. Предполагается, что иерархия доминирования имеет особое значение при содержании обезьян в неволе, поскольку посредством стабильных иерархических отношений обеспечивается необходимая регламентация поведения и взаимоотношений особей в условиях замкнутого пространства. Более того концепция доминирования полезна для описания и прогнозирования социальных взаимодействий у животных, живущих в условиях неволи.

Основные критерии социального ранга, особенности его проявления, функциональная роль и последствия иерархических отношений описаны для многих видов обезьян. Большой интерес для исследователей представляет выяснение зависимости между рангом и социальным поведением, а также между рангом и репродуктивным успехом самцов и самок. В настоящее время доминантные отношения у самцов павианов гамадрилов изучены не достаточно хорошо как в местах естественного обитания, так и в условиях неволи. Исследования, проведенные на макаках, геладах и павианах показали, что высокоранговые самки служили объектом повышенного внимания со стороны членов группы, обладали доступом к привлекательным партнерам [5,6,7,8], являлись более плодовитыми [4] и оказывали влияние на уровень напряженности в группе [1,4].

Целью данного исследования явилось изучение влияния ранга на некоторые аспекты социального поведения и репродуктивный успех самок группы павианов гамадрилов.

Методы исследования. Объектом исследования являлись половозрелые павианы гамадрилы (Papio hamadryas),содержащиеся в вольерных условиях на базе НИИ медицинской приматологии. Наблюдения осуществлялись с помощью этологических методик: сплошного протоколирования поведения особей группы и временного протоколирования поведения фокальных животных с 15 – секундным интервалом.

Относительный ранг обезьян устанавливался на основании анализа поведения «вытесненииия» и «избегания» и вычислялся по формуле n/N. Для удобства определения влияния ранга самок на некоторые аспекты социального поведения все самки группы были разделены на: высокоранговых, среднеранговых и низкоранговых самок. В част-

ности к высокоранговым самкам мы относили самок занимавших первый ранг внутри односамцовых единиц. К категории среднеранговых самок относили самок занимавшие внутри гарема вторые и третьи ранги. В свою очередь к низкоранговым самкам относились самки занимавшие четвертые и пятые ранги.

У изучаемых самок были определены репродуктивные показатели – коэффициент нормальных родов (число нормальных родов, приходящее на самку в год (КНР)) и коэффициент выживших детенышей до годовалого возраста, приходящееся на самку в год (КВД).

Статистическая обработка материала была произведена с помощью непараметрических критериев.

Результаты и их обсуждение. Для установления влияния иерархического статуса самцов на их социальное поведение, нами была проанализирована связь между относительным рангом самцов и некоторыми характеристиками их поведения. В результате анализа установлено, что общее количество агрессивных действий самцов, направленных на других членов группы, рассмотренных независимо от их пола и возраста, тесно коррелирует с относительным рангом каждого из самцов (r_s=0,87, P<0,01). Высокоранговые самцы производили достоверно больше агрессивных проявлений, чем низкоранговые самцы (критерий Манн – Уитни, N=15, W=28, z=3,19, P<0,001). В 60% всех зафиксированных в группе агрессивных взаимодействий агрессорами были 7 высокоранговых самцов – лидеров собственного гарема. Остальные 8 самцов были агрессорами в 19% случаев агрессивных взаимодействий, отмеченных в группе. Высокоранговые самцы были ответственны за большую часть агрессивных действий самцов, направленных на особей различных половозрастных категорий – самцов (критерий Манн – Уитни, N=15, W=28, z=3,19, P<0,001), самок (критерий Манн-Уитни, N=15, W=28, z=3,19, P<0,001), подростков и детенышей (критерий Манн – Уитни, N=15, W=42, z=1,56, P>0,05).

В среднем частота агрессивных действий высокоранговых самцов, направленных на других самцов, составила 0,10 случаев в час, частота действий низкоранговых самцов – 0,03 случая в час. Частота агрессии, направленной на самок, у высокоранговых самцов составила 0,07 случая в час, у низкоранговых самцов – 0,015 случаев в час. Частота

агрессивных проявлений, адресованных детенышам и подросткам, у высокоранговых самцов составила 0,014 случаев в час, у низкоранговых самцов – 0,075 случаев в час.

Высокоранговые самцы относительно редко становились объектом агрессии низкоранговых самцов. Частота агрессии низкоранговых самцов, адресованной высокоранговым самцам, составила 0,011 случаев в час, частота противоположно направленной агрессии – от высокоранговых самцов к низкоранговым, в четыре раза выше – 0,048 случаев в час.

Частота агрессивных проявлений самок, адресованных высокоранговым самцам незначительна – 0,00022 случаев в час. Фактически, за все время наблюдения, было отмечено только три случая, когда имела место агрессия самок, направленная на самца с высоким социальным статусом. Частота агрессивных действий самок, адресованных низкоранговым самцам, в 10 раз выше – 0,002 случая в час.

Сравнительный анализ зависимости между иерархическим статусом самок и числом их агрессивных проявлений показал существование тесной связи между внутригаремным рангом и показателями их агрессивности. Обнаружена достоверная корреляция внутригаремного ранга самок с общим числом их агрессивных проявлений (r_s=0,55, P<0,01) и с количеством агрессивных проявлений, адресованных самкам своего гарема (r_s=0,75, P<0,01). Установлено, что самки с высоким гаремным рангом проявляли достоверно больше агрессии по отношению к самкам группы, чем самки с низким гаремным статусом (критерий Манн-Уитни, N=19, W=63, z=2,16, P<0,05). Средняя частота адресованных самкам своего гарема агрессивных проявлений у самок с высоким внутригаремным рангом (n=9) составила 0,012 случая в час, у самок с низким гаремным рангом – 0,0045 случаев в час (n=10).

В результате анализа зависимости взаимоотношений по грумингу между самцом – лидером гарема и его самками, установлено, что высокоранговые самки не имеют преимущественных прав на участие такого рода взаимодействиях. Отсутствуют достоверные различия между самками с высоким и низким гаремным рангом как в числе случаев груминга ими своего самца – лидера гарема (критерий Манн – Уитни, N=19, W=94,5, z=1,47, P>0,05), так и в числе случаев груминга самцом – лидером своей самки с высоким или низким рангом (критерий

Манн – Уитни, N=19, W=89,5, z=1,06, P>0,05). Практически отсутствует корреляция между внутригаремным рангом самок и числом случаев обыскивания ими самца – лидера гарема (r_s=0,14, P>0,05). Корреляция между внутригаремным рангом самок и числом случаев обыскивания их самцом – лидером гарема также слабая (r_s=0,05, P>0,05). Частота груминга самца-лидера самками с высоким гаремным рангом составила в среднем 0,015 случая в час, частота груминга самца – лидера с остальными самками – 0,098 случая в час. Самцы – лидеры гаремов обыскивали своих самок с высоким гаремным статусом с частотой в среднем 0,051 случаев в час, а всех остальных самок со средней частотой 0,057 случаев в час.

Анализ также, показал, что, как и во взаимоотношениях со своим самцом – лидером гарема, иерархическое положение самок в системе взаимоотношений самок, не является определяющим, в их взаимоотношениях по грумингу с молодыми холостяками и самцами, утратившими свой гарем по возрасту. Отсутствуют достоверные отличия в числе случаев груминга самкой с высоким или низким гаремным статусом самцов, не имеющих своих гаремов (критерий Манн – Уитни, N=19, W=85,5, z=0,33, P>0,05), а также в числе случаев грумига одиноким самцом самок с разным гаремным рангом (критерий Манн – Уитни, N=19, W=92,5, z=0,24, P>0,05). Самки с высоким гаремным рангом обыскивали самцов, не имеющих своих гаремов, с частотой 0,038 случая в час. Для самок с низким гаремным рангом частота такого груминга практически не отличается – 0,032 случая в час. Частота обыскивания самок одинокими самцами составила для самок и с высоким гаремным рангом, и с низким гаремным рангом – 0,017 случаев в час.

Исследования связи между социальным статусом самок и частотой их груминга с другими самками группы показало, что частота участия самок в таких взаимодействиях слабо связана с внутригаремным рангом самок. Анализ связи между внутригаремным рангом самок и числом случаев обыскивания ими самок группы показал, что значения корреляции между этими показателями достигают достоверного уровня, также как и значение корреляции между внутригаремным рангом самок и числом случаев груминга ими самок своего гарема (r_s=0,58, P<0,01). Тем не менее, хотя средняя частота груминга самками с высо-

ким гаремным рангом самок группы почти вдвое выше, чем у самок с низким внутригаремным рангом, (соответственно, 0,100 и 0,054 случаев за час наблюдения), отсутствуют достоверные различия в числе случаев такого поведения (критерий Манн-Уитни, n=19, W=69,5, z=1,64, P>0,05). Аналогично отсутствуют достоверные различия в числе случаев груминга другими самками самок с высоким и низким гаремным рангом (критерий Манн-Уитни, n=19, W=73, z=1,31, P>0,05). Частота груминга такой направленности составила, соответственно, для высокоранговых и низкоранговых самок 0,090 и 0,061 случаев в час.

Таким образом, результаты наблюдений в вольерной группе павианов гамадрилов показывают, что иерархические отношения самок, несомненно, имеют место, причем, они связаны с уровнем агрессивности каждой самки. Тем не менее, очевидно, что практическое значение таких отношений незначительно. Не смотря на то, что самки, имеющие высокий статус среди самок всей группы и своего гарема, могут себе позволить агрессивные проявления не только по отношению к другим самкам и подросткам, но даже по отношению к молодым самцам, это не дает им серьезных преимуществ в социальной жизни группы. В частности, по сравнению с самками с более низким иерархическим положением, высокоранговые самки группы не были более привлекательными партнерами для груминга ни для самок, ни для самцов, включая и собственного самца – лидера и других самцов. Причина такого положения, несомненно, заключается в том, что в условиях гаремной организации павианов гамадрилов влияние высокоранговых самок на возможность получения каких-то преимуществ, для себя и своих приближенных, минимально. Все самки, как высокоранговые, так и низкоранговые находятся в зависимом положении относительно своего самца – лидера, имеющего несопоставимо высокий иерархический статус, по сравнению со своими самками, как низкоранговыми, так и высокоранговыми. Поэтому возможность получения низкоранговыми самками каких-то преимуществ, например, получения агонистической поддержки для себя и потомства, определяется исключительно отношением к ним самца, а не отношением высокоранговых самок. Обнаруженная агрессивность высокоранговых самок может быть обусловлена высоким уровнем мужских половых гормонов, что не кор-

релирует с высокой фертильностью. Поэтому, наличие этого признака у самок может также способствовать снижению их привлекательности для самцов.

Для установления связи иерархического статуса самок с их репродуктивными характеристиками нами были использованы 2 показателя: коэффициент нормальных родов (к.н.р.) и выживаемость детенышей. Установлено, что в среднем по группе к.н.р. самок равнялся 0,441, при выживаемости детенышей – 69,3%. Значение коэффициента ранговой корреляции между к.н.р. и внутригаремным рангом самок составляет r_s=0,229, n=19, P>0,05, значение коэффициента ранговой корреляции между выживаемостью детенышей и внутригаремным рангом равняется r_s=0,321, n=18, P>0,05. Результаты данных также показали, что ни по величине коэффициента нормальных родов, ни по выживаемости детенышей, различия между высоко – и низкоранговыми самками не достигают достоверного уровня. Такой расклад, как правило, объясняется характерной для павианов гамадрилов образцом социальной жизни в виде семейной ячейки – гарема, в котором любое действие детеныша строго контролируется матерью и отцом, и практически не зависит от отношения других членов гарема. Вероятность выживания детеныша тесно связана с качеством материнского ухода и физическим состоянием матери и никак не зависит от ранговой принадлежности самки в гареме. Взаимоотношения матери и детеныша на ранних стадиях его развития важны для выращивания полноценного психически здорового поколения, поэтому материнский вклад является незаменимым при социализации потомства. Самцы павианов гамадрилов, как правило, не участвуют в воспитании своего потомства, однако обеспечивают всем своим детенышам, независимо от социального статуса и привлекательности их матерей, надежную защиту от любой угрожающей детенышу опасности и посягательств других членов группы. О проявлении отцовского вклада в форме защиты своего детеныша свидетельствует отсутствие инфантицида со стороны других самцов группы за все время наблюдения. В отличие от других павианов [2], самки павианов гамадрилов являются основными агентами потока генов [9], и способны эффективно смягчать риск инфантицида сосредоточив свое внимание на самце – лидере гарема, увеличивая тем самым отцовский вклад [10].

Выводы.

1. Иерархический статус самцов и самок павианов гамадрилов тесно связан с их агрессивностью.

2. Ранг самок не оказывает влияния на частоту груминга с самцом – лидером гарема, и не влияет на показатели размножения самок и выживания детенышей.

Литература

1. Чалян В.Г., Мейшвили Н.В. Социальный ранг, факторы, его определяющие и репродуктивные показатели самок павианов гамадрилов // Вестник академии медицинских наук СССР – 1987. – №10. – С. 43-47.
2. Alberts S.C., Watts H.E., Altmann J. Queuing and queue jumping: long-term patterns of reproductive skew in male savannah baboons, Papio cynocephalus // Anim. Behav. – 2003. – N65. – P. 821-840.
3. Ellis L. Dominance and reproductive success among nonhuman animals: A cross-species comparison // Sociobiology. – 1995. – V.16, N4. – P. 257-333.
4. Harcourt A.H. Dominance and fertility among female primates // J. Zoo. Lond. – 1987. – V.213, N3. – P. 471-487.
5. Kummer H. Rules of dyad and group formation among captive gelada baboons (Theropithecus gelada) // Proc. Symp. 5th Cong. Int. Primatol. Soc. Nagoya. Tokyo. Japan Science Press. – 1975. – P. 129-159.
6. Sade D. S. A Longitudinal study of social behavior of rhesus monkeys // In: Functional and Evolutionary Biology of Primates / Ed. by R. Tuttle. Chicago: Aldine, 1972. – P. 378-398.
7. Seyfarth R.M. A model of social grooming among adult female monkeys // J. theor. Biol. – 1977. – V. 65. – P. 671-698.
8. Stammbach E. On social differentiation in groups of captive female hamadryas baboons // Behav. – 1978. – V. 67. – P. 322-338.
9. Swedell L., Saunders J., Schreier A., Davis B., Tesfaye T., Pines M. Female “dispersal” in hamadryas baboons: Transfer among social units in a multilevel society // Amer. J. of Phys. Anthropol. – 2011. – V.145, Issue 3. – P. 360–370.
10. Swedell L., Saunders J. Infant mortality, paternity certainty, and female reproductive strategies in hamadryas baboon // in reproduction and fitness in baboons: Behavioral, ecological, and life history perspectives /eds. L. Swedell and S. R. Leigh. New York, 2006. – P. 19-51.

АДАПТАЦИЯ ПРИМАТОВ К ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫМ НАГРУЗКАМ: ФИЛО- ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

Кузнецова Т.Г., Голубева И.Ю., Горбачева М.В., Шуваев В.Т.
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
tamara-kuznetsova@yandex.ru

Резюме

В работе обобщены результаты сравнительного фило- онтогенетического исследования способностей приматов (макак-резусов, шимпанзе, детей дошкольного возраста) к адаптации при возрастающих психоэмоциональных нагрузках в процессе достижения ими цели.

Использованы методика выбора по образцу [8] и методика приближающейся цели [10]. Оба методических подхода позволяют не только моделировать ситуации легкого (быстрого) и трудного (медленного) достижения результата-цели, но и оценивать функциональное состояние испытуемых на основании изменения их поведенческих, вегетативных (ЭКГ) и центральных (ЭЭГ) реакций саморегуляции.

Ключевые слова: приматы, обучение, когнитивная деятельность, достижение цели.

PRIMATES'S ADAPTATION TO PSYCHO-EMOTIONAL LOADS: PHILO-ONTOGENETIC ASPECT

Kuznetsova T.G., Golubeva I.U., Gorbacheva M. V., Shuvaev V.T.
Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia
tamara-kuznetsova@yandex.ru

Abstract

The paper summarizes the results of a comparative phylogenetic study of the abilities of primates (rhesus monkeys, chimpanzees, preschool children) to adapt to increasing psycho-emotional loads in the process of achieving the goal.

In this research was used the method of matching-to-sample [8] and the method of Aim approaching [10]. Both methodical accesses allow not only to simulate situations of easy (fast) and difficult (slow) achievement of target result, but also to measure the functional state of subjects on the basis of changes in their behavioral, autonomic (ECG) and central (EEG) self-regulation reaction.

Key words: primates, teaching, cognitive activity, goal achievement.

Введение

В конце XIX столетия И.М. Сеченов писал, что организм стремится к положительному и избегает отрицательного [6].

Любая целенаправленная деятельность обусловлена достижением цели, что сопряжено с активацией системы ориентировочного рефлекса в случае неопределенности ситуации, активацией систем положительных или отрицательных реакций при успешном или неуспешном ее достижении. При невозможности достичь цели отрицательная реакция избегания может развиваться по двум сценариям: агрессии и активного ухода или пассивных реакций, например переключения, отвлечения и др. [5, 7].

Многолетние наблюдения за целенаправленным поведением низших обезьян, шимпанзе и детей дошкольного возраста от 2 до 7 лет позволили провести сравнительный фило- онтогенетический анализ их системных реакций саморегуляции при реализации легко (быстро) и трудно (медленно) достижимой цели в процессе когнитивной деятельности.

В связи с этим была поставлена ***задача –*** выявить и сравнить поведенческие, вегетативные и центральные реакции саморегуляции в различных модельных ситуациях в процессе целенаправленного поведения и проанализировать успешность выполнения заданий различной степени сложности тремя представителями отряда приматов (*Macaca mulatta*, *Pan troglodytes* и дети дошкольного возраста), находящихся на различных ступенях эволюционного развития.

В работе использованы ***методика выбора по образцу*** [8], модифицированная в лаборатории [2], и ***методика приближающейся цели*** [10] с количественной и качественной оценкой изменения поведенче-

ских реакций саморегуляции у всех испытуемых, «стресс-индекса» у шимпанзе и детей и биоэлектрической активности головного мозга у детей 6-7 лет [1, 2, 3, 4, 5]. В каждой из методик были ситуации легкого и трудного достижения положительного результата – подкрепления.

В исследовании принимали участие 7 макак-резусов (возраст 7±2,9 года), 4 шимпанзе (возраст 14± 1,4 года), 38 детей 2-3 лет и 39 детей 6-7 лет.

В ходе исследования всегда велась видеозапись. У всех детей регистрировалась ***ЭКГ*** во втором грудном стандартном отведении, а у 6-7 летних детей дополнительно записывалась ***ЭЭГ*** от 10 симметричных отведений обоих полушарий по международной схеме 10-20. В ЭКГ анализировался индекс напряжения (ИН), в ЭЭГ выявлялись корреляционные связи между исследуемыми зонами мозга.

Для статистической обработки данных использовался t-критерий Вилкоксона и критерий Макнемана с применением пакета прикладных программ «StatSoft Statistika 6.0». Значимыми считались различия на уровне $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

1. **Выявлены** достоверные различия между макаками-резусами, шимпанзе и детьми дошкольного возраста в *успешности* выполнения задачи выбора по образцу в ситуации легкого и трудного достижения цели, что, по нашему мнению, связано с принципиальными различиями в организации механизмов опознания ими зрительных стимулов (рис. 1 а, б, в, г).

2. Показано, что в процессе достижения цели у всех приматов общими поведенческими реакциями саморегуляции были *пассивное избегание* и *двигательная разрядка*, определяемые потребностью самосохранения при столкновении с трудностью и снимающие или снижающие эмоциональное напряжение, что отражает единую эволюционную природу их адаптивного поведения.

3. Анализ целенаправленного поведения приматов показал, что при усложнении заданий у всех испытуемых, с одной стороны, достоверно увеличилось количество доминирующих реакций (рис. 2, а, б, в, г, сплошные линии). С другой – у шимпанзе и детей 2-3 лет, в сравнении с макаками, расширился и сам спектр поведенческих реакций

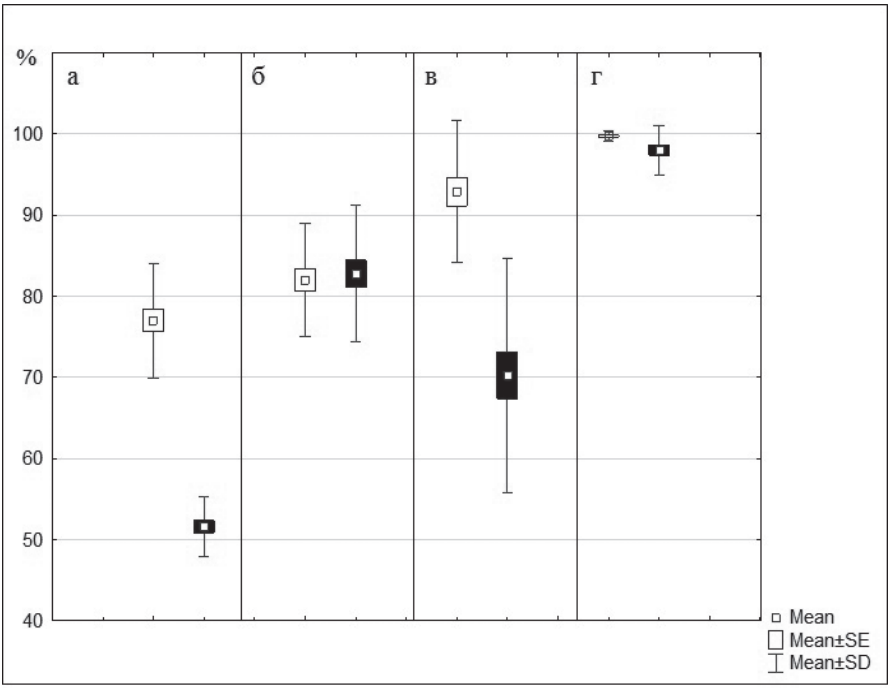


Рис. 1. *Сравнительная характеристика успешности достижения цели: а) макаки, б) шимпанзе, в) дети 2-3 лет, г) дети 6-7 лет. Обозначения: серые прямоугольники – при легком достижении цели, черные – при трудном достижении цели; ось ординат – % правильных решений.*

саморегуляции (рис. 2, б, в). В тоже время у 6-7-летних детей, в сравнении с младшими детьми и шимпанзе, наблюдался процесс «свертывания» спектра реакций саморегуляции (рис. 2, в, г).

Расширение спектра адаптивных реакций от макаки до ребенка младшего возраста можно связать с повышенной импульсивностью и слабостью тормозных процессов. Так, макаки активно «уходят» от трудности (опасности) в силу преобладания генерализованной возбудимости и импульсивности. Социальная жизнь шимпанзе вырабатывает более «мягкие» способы адаптации. Активный уход замещается пассивным избеганием, переключением на иную деятельность, реакцией «на себя» или контактами с другими особями.

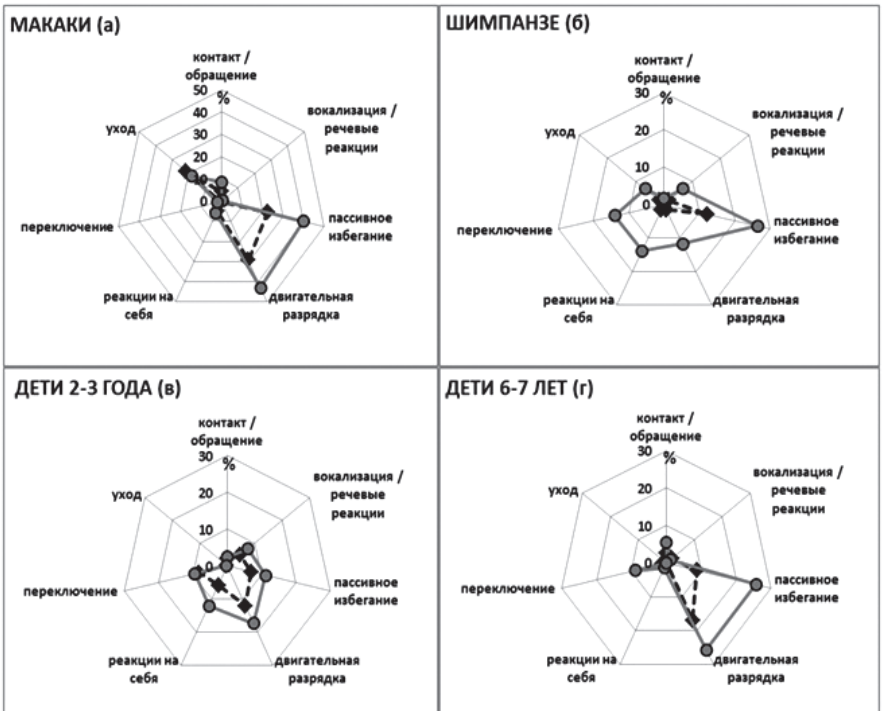


Рис. 2. *Суммарные спектры защитных поведенческих реакций саморегуляции в фило- онтогенезе приматов при адаптации к психоэмоциональной нагрузке. Обозначения: а) макаки, б) шимпанзе, в) дети 2-3 лет, г) дети 6-7 лет; черный пунктир – легкое достижение цели, сплошная линия – трудное достижение цели; радиальные оси – проявляемость поведенческих реакций в %.*

Похожая картина проявилась и у детей младшей возрастной группы. Видимо, это обусловлено не только созреванием центральной нервной системы и совершенствованием безусловно- и условно рефлекторного баланса тормозно-возбудительных процессов как таковых, но и выработкой социальных норм поведения, базирующихся на формировании тормозных процессов.

«Свертывание» спектра компенсаторных поведенческих реакций у детей 6-7 лет можно объяснить их переходом на следующий уровень

созревания ЦНС, когда у них практически завершается формирование социально обусловленных условно рефлекторных форм поведения.

Именно этими факторами, с нашей точки зрения, и определяется принципиальное различие в проявлении компенсаторных поведенческих реакций данной группы приматов при адаптации к психоэмоциональной нагрузке, а сами компенсаторные поведенческие реакции в фило-онтогенезе претерпевают существенную динамическую перестройку.

Таким образом, выяснилось, что всем испытуемым приматам были присущи реакции активного или пассивного избегания трудности, т.е. избегание «отрицательного и стремление к положительному», о чем говорил еще И.М. Сеченов [6]. Известно, что именно двигательные реакции наиболее успешно снимают эмоциональное напряжение, ликвидируя или снижая степень стресса. Вместе с этим, включение механизма переключения, присущего высшим обезьянам и людям, смещает внимание на другую деятельность, изменяя доминирующую мотивацию, что является еще одной стратегий адаптивного поведения.

4. Наиболее чутким показателем изменения психоэмоционального состояния является ИН механизмов регуляции сердечного ритма не только у человека [1; 3; 9], но и у шимпанзе. Его анализ уже в исходном состоянии дал основание для выделения двух групп испытуемых. В одной группе (70%) у детей он составлял 83±7,3 усл. ед. и 90-95 усл. ед. у шимпанзе, что можно отнести к «норме». У второй группы (30%) у детей он достигал 185-220 усл. ед. и 350-400 усл. ед. у шимпанзе, что соответствовало состоянию «дистресса».

В процессе выполнения «трудного» задания испытуемыми первой группы ИН изменялся незначительно, но существенно перестраивались поведенческие реакции саморегуляции – возникали отвлечения, переключения, реакции «на себя» и двигательной разрядки (вскакивание, ёрзание на стуле и т.д.).

У второй группы испытуемых поведенческие реакции в аналогичных ситуациях не изменялись, но значительно возрастал ИН: у детей он достигал 300 и более усл. ед., а у шимпанзе – 450-500 усл. ед., что позволило расценить их состояние как «стресс-риск».

Это обстоятельство дало основание говорить о двух стратегиях адаптации испытуемых к психоэмоциональным нагрузкам: одна за

счет расширения спектра компенсаторных ***поведенческих реакций***, вторая – за счёт ***вегетативного компонента*** – изменения напряжения механизмов регуляции сердечного ритма.

Вместе с этим, выяснились возрастные особенности адаптации детей к когнитивной нагрузке. Оказалось, что усложнение задания способствовало нормализации функционального состояния детей с первой стратегией адаптации: в младшей группе число детей, находящихся в «дистрессе» перед началом испытания с 67% сократилось до 45%, у 6-7-летних детей исчезла подгруппа испытуемых, находящихся в состоянии «стресса-риска».

У детей со второй стратегией адаптации наблюдалась обратная картина: усложнение задания не зависимо от предлагаемой методики исследования увеличило число детей (до 80-90%), чьё функциональное состояние соответствовало «стрессу-риску». Особенно чётко это проявилось у 6-7-летних испытуемых, что свидетельствует о более сложной, в сравнении с детьми 2-3 лет, адаптации к возрастающей психоэмоциональной нагрузке.

Дальнейший анализ показал, что включение поведенческих реакций саморегуляции у 6-7-летних детей первой группы отражается и в динамике ЭЭГ (рис. 3). Оказалось, что величина «стресс-индекса» и биоэлектрическая активность их головного мозга при легко достижимой цели достоверно не отличались от фоновых значений, когда преобладали спокойное сосредоточение и эмоционально положительные реакции. Близкими по величине эти показатели были и при медленном достижении цели, но при включении поведенческих реакций саморегуляции в ответ на активацию системы отрицательных эмоций [1; 4; 9]. Иными словами, благодаря поведенческим реакциям саморегуляции произошла компенсация эмоционально-негативного состояния, и организм вернулся к состоянию равновесия.

Таким образом, еще раз подтвердился факт, что поведенческие реакции саморегуляции способствуют нормализации функционального состояния приматов.

Вместе с тем экстренная смена эмоционально значимых положительных скоростей приближающегося объекта на «неопределенную» по эмоциональной значимости скорость, равную 50 мм/с, сопрово-

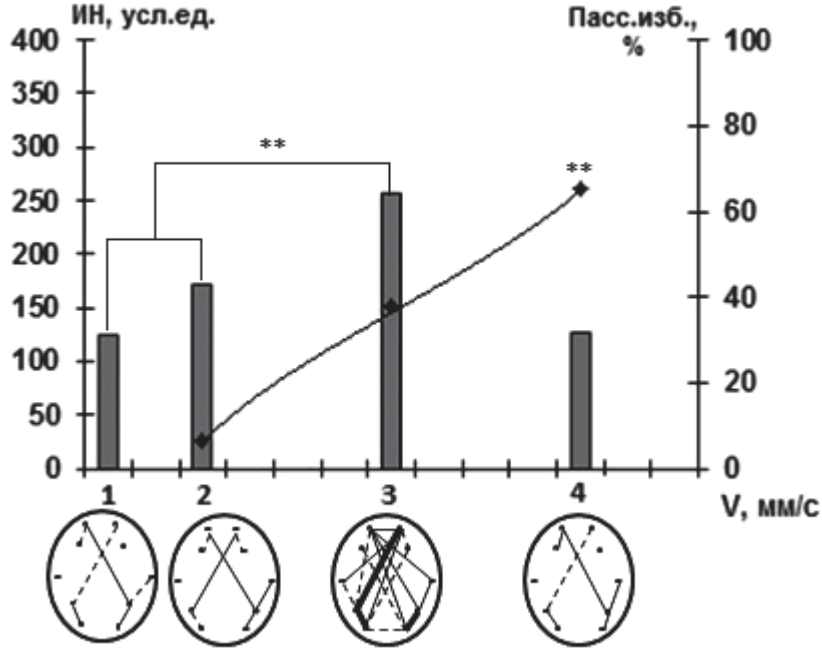


Рис. 3. *Динамика ИН, реакции пассивного избегания и распределение корреляционных связей у детей 6-7 лет в процессе достижения цели. Обозначения: оси ординат: левая – ИН в усл. ед. (столбики), правая – % реакций пассивного избегания (линия); абсцисса – исходное состояние (1), легкое достижение цели (2), состояние неопределенности (3), трудное достижение цели, компенсированное реакциями саморегуляции (4). Под графиком – топограммы распределения корреляционных связей между исследуемыми лобными, моторными, височными, теменными и затылочными зонами мозга; линии – % значимых корреляционных связей (r>0,6); линии пунктирные – количество связей до 20%, черные тонкие – до 30% и черные жирные – выше 30%; **– p<0,01.*

ждалась достоверным (P<0,01) повышением ИН, увеличением числа значимых корреляционных связей ЭЭГ и их перераспределением, как относительно фоновых значений, так и состояний ***до*** и ***после*** ее введения, что демонстрирует рис. 3. Данный факт отражает не только активацию системы внимания и ориентировочного рефлекса, но и усиление психоэмоционального напряжения испытуемых [4].

Заключение

Итак, в работе показана роль реакций саморегуляции в организации целенаправленного поведения приматов в процессе легко и трудно достижимой цели. В последнем случае принятие решения в филоонтогенезе низших и высших обезьян, а также детей 2-3 и 6-7 лет ведет к трансформации функционального состояния за счет видоизменения и надстройки поведенческих, вегетативных (ИН) и центральных (ЭЭГ) реакций саморегуляции, направленных на сохранение динамического равновесия в ЦНС, оптимизацию адаптации к когнитивным нагрузкам и предотвращение развития стрессового состояния.

Вскрыто принципиальное сходство в организации целенаправленного поведения макак-резусов, шимпанзе и детей, отражающее общие глубинные филогенетические механизмы защиты от стрессовых ситуаций.

Выявленные фило-онтогенетические различия в успешности выбора сложных изображений, по нашему мнению, связаны с принципиальными различиями в механизмах опознания зрительных стимулов обезьянами и детьми.

Учитывая, что адаптивное поведение строится на основе вероятностного прогнозирования возможных вариантов достижения цели с учетом удовлетворения потребностей на всех уровнях, тактики поведенческих, вегетативных и центральных реакций саморегуляции актуализируются в строгой пространственно-временной зависимости. При этом высказана гипотеза, что адаптация к психо-эмоциональным нагрузкам за счет изменения поведенческих реакций организму обходится дешевле, чем перенапряжение вегетативных механизмов регуляции сердечного ритма.

Комплексный сравнительный анализ поведенческих, вегетативных и биоэлектрических реакций саморегуляции позволяет понять принципы подстройки и оптимизации функционального состояния организма и каждой из его систем к условиям конкретной деятельности и показывает эволюционно-прогрессивную надстройку адаптивных поведенческих реакций в процессе филогенеза приматов.

В целом, сопоставление результатов, полученных с применением двух различных методик, но связанных с реализацией достижения цели, позволило:

1. проследить динамику успешности достижения положительного результата;
2. продемонстрировать поведенческие, вегетативные и центральные реакций саморегуляции, сопровождающие принятие решения в легкой и трудной ситуации;
3. показать, что динамика функционального состояния приматов не зависит ни от их возраста, ни от вида, ни от используемых методик;
4. показать характерную для приматов, закономерность трансформации одного функционального состояния в другое при возрастании трудности достижения цели.

Литература

1. Баевский Р.М., Кирилов О.И., Клёцкин С.З. Математический анализ изменений сердечного ритма при стрессе. М.: Наука, 1984. 221 с.
2. Кузнецова Т.Г., Голубева И.Ю. Сравнительный анализ выбора по образцу у приматов // Вестник СПбГУ. 12 сер. «Психология, социология, педагогика». 2014. Вып. 2. С. 108-118.
3. Кузнецова Т.Г., Голубева И.Ю., Горбачева М.В. Адаптивное поведение детей дошкольного возраста при достижении цели // Вестник психофизиологии. 2015. № 4. С. 72-78.
4. Кузнецова Т.Г., Горбачева М.В. Динамика биоэлектрической активности мозга ребенка 6-7 лет при достижении цели // Мат. X Междунар. Научно-практической конф. «Научная мысль информационного века». 2014. Т. 24. Польша. С. 36-42.
5. Кузнецова Т.Г., Сыренский В.И., Гусакова Н.С. Шимпанзе: онтогенетическое и интеллектуальное развитие в условиях лабораторного содержания. СПБ: Политехника. 2006. 448 с.
6. Сеченов И.М. Рефлексы головного мозга // Избр. произведения. М.: Учпедгиз, 1952. С. 7-128.
7. Сыренский В.И., Кузнецова Т.Г. Рефлекс цели у приматов. Ленинград. Наука. 1990. 154 с.
8. Ладыгина-Котс Н.Н. Дитя шимпанзе и дитя человека. М.: Наука, 1935. 278 с.

9. Оценка уровня стресса с помощью вариабельности ритма сердца. 2011. Available at: http://www.vedapuls.ru/stress.
10. Способ определения целеустремлённости / Патент № 1410948. МКИ[4] В5/16/ Бюл. № 27. 1988. Кузнецова Т.Г., Сыренский В.И., Наулайнен Б.А.

РАЗВЕДЕНИЕ СВОБОДНОЖИВУЩИХ ПАВИАНОВ ГАМАДРИЛОВ В СУБТРОПИКАХ ЧЕРНОМОРСКОГО ПОБЕРЕЖЬЯ КАВКАЗА

Чалян В.Г., Мейшвили Н.В.
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», г.Сочи, Россия
vg_chalyan@mail.ru

Резюме

Представлены результаты уникального эксперимента по свободному содержанию и разведению павианов гамадрилов (Papio hamadryas). Эксперимент был начат в 1971 г с выпуска группы павианов на территории, получившей впоследствии название Туапсинского приматологического заказника, и продолжен в 1974 г выпуском павианов в Гумистинском приматологическом заказнике. Более чем 20-летние наблюдения за свободноживущими обезьянами показали, что эти животные обладают огромным резервом пластичности, позволившим им успешно освоиться в климатических и природных условиях принципиально отличающихся от естественных африканских.

Ключевые слова: павианы гамадрилы, свободное содержание, экология, социальная структура.

BREEDING OF FREE-LIVING HAMADRYAS BABOONS IN THE SUBTROPICS OF BLACK SEA COAST

Chalyan V.G., Meishvili N.V.
FSBSO "Scientific Research Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia
vg_chalyan@mail.ru

Abstract

The results of unique experiment on maintenance and breeding of hamadryas baboons (Papio hamadryas) in free living conditions are presented. The experiment was started in 1971 when a group of baboons was released on the territory that was later called The Tuapse Primate Reserve, and was continued in 1974 after the releasing the baboons in Gumista Primate Reserve. The observations of free living monkeys that lasted more than 20 years showed that the animals have a great reserve of plasticity allowing them to adapt successfully to the conditions fundamentally different of those in their natural African habitat.

Key words: hamadryas baboons, keeping in free living conditions, ecology, social structure.

Введение. Известно, что численность большинства представителей отряда приматов, за исключением одного из них – Homo sapiens, неуклонно сокращается и темпы этого сокращения нарастают. В недалеком будущем сохранение многих представителей отряда возможно только при условии их содержания в заповедниках и разведения в неволе. Уже в наше время, число горилл, содержащихся в зоопарках, в частных и лабораторных коллекциях, равняется либо даже превышает их число в естественных популяциях. Разведение обезьян в неволе позволяет удовлетворять растущие потребности науки в лабораторных приматах. В настоящее время в России единственным центром по разведению лабораторных приматов является Институт медицинской приматологии, в клетках и вольерах которого содержится свыше 5 тысяч обезьян 23-х видов. Основная часть животных Института содержится в вольерных группах с видоспецифической социальной

структурой, что оптимально с этической точки зрения и позволяет получать в эксперименты полноценных, здоровых животных. Еще более адекватные условия создаются при свободном разведении обезьян на территориях, где они имеют возможность вести жизнь в соответствии с собственными законами социального устройства и взаимодействия со средой. Мировой науке известны несколько попыток свободного разведения обезьян вне зоны естественного обитания [Estrada & Estrada, 1981; Windle, 1980; Wolfe et al., 1988], которые осуществлялись на изолированных островных территориях. История свободного разведения обезьян в субтропиках Черноморского побережья Кавказа берет свое начало с момента принятия в 1971 г академиком Б.А.Лапиным, тогдашним директором Института патологии и терапии РАМН, решения о начале эксперимента по свободному разведению павианов гамадрилов. Выбор павианов гамадрилов в качестве объекта разведения был обоснован появившейся тогда потребностью в существовании стада этих обезьян, полностью изолированного от обезьян питомника, которое должно было послужить контролем для вирусологических и иммунологических исследований, проводимых в институте. Первоначально для свободного разведения обезьян было выбрано урочище Пасека в окрестностях города Туапсе. В 1971 г здесь было выпущено 60 павианов гамадрилов, в 1972 г – еще 32. Через 3 года эксперимент в Туапсинском заказнике был прерван, все обезьяны были вывезены в Сухумский питомник. Однако позднее – в 1980 г здесь были вновь выпущено 79 павианов гамадрилов. Эти животные и их многочисленное потомство в 1991 г были вывезены в Адлерский питомник, где они составили основу стада павианов гамадрилов Института медицинской приматологии. Наиболее успешной была попытка свободного разведения павианов гамадрилов в Гумистинском заказнике, расположенном в 20 км от г. Сухуми. Здесь, в 1974 г. было выпущено 73 павиана гамадрила, составивших основу, так называемого, Первого стада Гумистинского заказника. Позднее, в 1979 г в 2-х км южнее была выпущено Второе стадо из 50 павианов гамадрилов. Во всех случаях выпуск обезьян производился в летнее время. Начиная с 1974 г выпуск обезьян в природную среду осуществлялся согласно разработанной методике, позволившей избежать рассеивания животных и закрепления их в границах предполагаемого участка обитания. Следует отметить, что экс-

перименты со свободным разведением обезьян на всех этапах были контролируемыми. В любой момент все поголовье свободноживущих обезьян могло быть отловлено и вывезено с территории, что и было проделано в Туапсинском заказнике.

Цель. Целью исследования являлось изучение биологии павианов гамадрилов в условиях субтропиков Черноморского побережья Кавказа.

Методы исследования. Вплоть до 1991 г в Туапсинском заказнике и в до августа 1992 г в Гумистинском заказнике осуществлялись ежедневные наблюдения, направленные на исследование биологии павианов гамадрилов, их взаимоотношений со средой и демографических изменений в группах. Кроме наблюдений, вмешательство людей в жизнь обезьян ограничивалось ежегодным однократным отловом всех животных для ветеринарного осмотра. Отловленных павианов взвешивали и осматривали, у них брали кровь для исследования, детенышам накалывали татуировкой номера и затем всех отпускали. Ежедневно регистрировались случаи рождений и гибели животных, оценивалось состояние животных, регистрировались половые циклы самок, нахождение самок в гаремах самцов, структурные перестройки. Тела погибших животных увозили в институт и после вскрытия сжигали. Больных обезьян также отлавливали и увозили для лечения. Для наблюдений использовались общепринятые методики сплошного протоколирования, протоколирования поведения фокальных животных с временным интервалом, протоколирования дистанций между особями. Для оценки пищевого поведения регистрировались используемые корма естественного происхождения, оценивалось количество закладок корма и масса закладываемого корма.

Результаты и обсуждение. Результаты анализа динамики численности павианов гамадрилов в Первом стаде Гумистинского заказника показали, что за период с 1975г по 1990 г количество животных увеличилось в пять раз – с 73х на начало 1975 г до 323х – в 1990 г. В общей сложности к началу 90-х годов в Гумистинском и Туапсинском заказниках обитало около 800 павианов гамадрилов.

Освоение павианами территории заказников после выпуска их в природу происходило постепенно. К концу первого года жизни в Гумистинском заказнике, площадь участка обитания Первого стада со-

ставила 0,9 кв.км. Она включала в себя поляну Скрипина, на которой павианы были выпущены, и прилегающие к ней лесистые склоны гор. К 1980 г их участок обитания увеличился до 4х кв.км. В 1990 г площадь участка обитания павианов Первого стада составляла 8,5 кв.км. Следует отметить, что в заказниках, размеры участков обитания были намного меньше, чем в естественных условиях. Так, установленный участок обитания Группы 1 со скалы Коун Рок в Эфиопии составил 28 кв.км [Sigg & Stolba, 1981]. Сравнительно меньшие размеры участков обитания павианов в заказниках обусловлены, по видимому, более мощной кормовой базой субтропических лесов, по сравнению с полупустынями и саваннами Эфиопии и Аравии.

Одной из видоспецифических особенностей павианов гамадрилов является их ночлег большими стадами на отдельно стоящих скалах [Kummer, 1968]. В заказниках имелся большой выбор мест, пригодных для ночлега павианов, включая отдельно стоящие скалы, большие деревья, пещеры и специально установленные для этой цели деревянные домики. Павианы гамадрилы Первого стада сразу же после выпуска стали спать на высоких буковых деревьях на опушке и остались верны этому месту в дальнейшем. Только с выпадением снега они перебирались спать в деревянные домики.

Наблюдения пищевого поведения и состава корма свободноживущих павианов показало их замечательную пластичность, способность в короткое время освоить множество естественных кормов, научиться избегать местные ядовитые растения. В Гумистинском заказнике основой естественного рациона павианов гамадрилов были плоды, побеги и листья бука восточного (Fagus orientalis) – основной лесообразующей культуры заказника, плоды каштана посевного (Castanea sativa) и плоды лавровишни лекарственной (Laurocerasus officinalis). При этом, урожайность этих растений оказывала непосредственное влияние на состояние животных и способность самок к зачатию. Корреляция между урожайностью бука восточного, оцениваемой по 6-ти балльной шкале Формозова и коэффициентом нормальных родов самок составила 0,57. Связь между урожайностью каштана и лавровишни и последующими родами у самок значительно слабее – соответственно, 0,003 и 0,11. В отношении к животной пище павианы сохранили в условиях

заказников свою видовую специфичность. Они практически не охотились на позвоночных животных, но при случае ели яйца птиц. Кроме того, они ловили и поедали бабочек и цикад, раскапывали трухлявые пни в поисках личинок и муравьев, на мелководье отыскивали личинок веснянок. В целом доля животной пищи в рационе обезьян варьировала от 1% зимой, до 2-5% весной и летом.

В целом, очевидно, что высокий уровень пластичности [Swedell, 2002b], который павианы гамадрилы продемонстрировали в новых экологических условиях, в значительной степени, обусловлен особенностями их социальности, высочайшим уровнем способностей к альтруизму и кооперации. Так, павианы никогда не бросали отстающих животных. Выходя на марш, они всегда дожидались отставших, будьто старая самка, самка с новорожденным детенышем или раненный подросток, причем, ожидание иногда длилось часами (например, если кто-то из членов стада был закрыт в клетке для ежегодного осмотра).

Экологическая пластичность павианов гамадрилов, проявившаяся в их способности к адаптации к новым жизненным условиям, сочетается у них со значительным консерватизмом. Непосредственным проявлением консерватизма павианов гамадрилов нужно считать сохранение ими на протяжении нескольких поколений особенностей социального поведения, существование которых явилось основой для воссоздания видоспецифической 4-хуровневой социальной структуры. Исходно, выпущенные в лес группы павианов гамадрилов представляли собой искусственные объединения неродственных друг другу животных. С течением времени социальная структура групп приобрела характеристики, описанные у павианов гамадрилов в местах естественного обитания. Если в 1975 г социономическое отношение, то есть, отношение половозрелых самцов и самок в Первом стаде Гумистинского заказника составляло 16,5 , то через 12 лет после выпуска в лес оно уменьшилось до цифры 3,8 и практически не отличалось от такового, описанного Гансом Куммером [Kummer, 1968]. К этому же времени радикально изменилась социальная структура стада, которая приобрела такие видоспецифические черты как многоуровневость, типичные размеры гаремов и наличие самцов – холостяков. В дальнейшем, темпы изменений половозрастной и социальной структуры Первого стада

заказника резко замедлились и совсем прекратились, что позволило сделать вывод о завершении процесса трансформации искусственно сформированного объединения обезьян в стадо с характеристиками, соответствующими нормальному стаду павианов гамадрилов.

Наши наблюдения подтвердили полевые наблюдения Куммера о том, что базовой единицей социальной организации павианов гамадрилов являются одно-самцовые единицы или гаремы, существование и целостность которых обеспечивается взаимодействием двух составляющих. Основной составляющей являются усилия самца – лидера гарема, направленные на организацию гарема и поддержание его целостности. При этом, формой выражения его усилий является не только агрессивный «хердинг», то есть, «пастьба» самок, но и дружелюбные формы поведения, прежде всего, груминг. Определенное влияние на существование и состав гаремов оказывает также поведение самок. Несмотря на то, что сообщество павианов гамадрилов имеет строгую иерархическую организацию, высшую когорту в которой составляют исключительно самцы, а самки всегда занимают подчиненное положение, тем не менее, при образовании гаремов самки имеют определенную свободу в выборе нового самца и нового гарема. Анализ направленности переходов самок из одного гарема в другой показал, что самки при этом руководствуются не только качеством связи с самцом, но и наличием в гареме родственных им матерей, сестер и дочерей. Такая тенденция, являющаяся, по видимому, сохранившимся у самок павианов гамадрилов остаточным проявлением матрилинейности, характерной для всех видов макаков, наиболее очевидна при прослеживании переходов старых самок. После 16 лет самки вступают в отрезок времени своей жизни, который можно обозначить как период старческой нестабильности. В течение этого периода самка за несколько лет может присоединяться к гаремам нескольких самцов последовательно, причем, с высокой вероятностью, к тем, в которых состоит ее дочь. Кроме периода старческой нестабильности, в жизненном пути самок павианов гамадрилов имеется период юношеской нестабильности. Он начинается у самок еще до наступления половой зрелости и заканчивается с первым зачатием. На протяжении взрослого периода жизни до наступления старости, связи самцов и самок продолжаются,

в среднем, около 5 лет. Основной причиной их прерывания является старение самцов и наступающее по этой причине угасание гарема.

В зрелом стаде павианов гамадрилов, с видоспецифическими, а не искусственными характеристиками, репродуктивная и социальная карьера самцов тесно связаны с характеристиками и социальным статусом их отцов, что является непосредственным проявлением патрилокальности. Основой для патрилокальности является фиксированное отцовство, обусловленное поддерживаемой всеми членами стада строгой регламентацией поведения взрослых самцов и самок, которое запрещает возможность спаривания сексуально рецептивных самок с чужими самцами. Доказательством способности самцов различать собственное потомство и потомство других самцов является инфантицид, практикуемый всеми самцами без исключения, по отношению к детенышам, рожденным в их гаремах самками, у которых с ними не было предшествующих сексуальных отношений [Чалян, Мейшвили, 1990]. Молодые самцы на протяжении пубертатного периода и в последующем поддерживают более толерантные отношения со своими отцами и братьями, чем с неродственными самцами. Формой проявления этих отношений являются сравнительно более частые взаимные подставления – реверансы, агонистическая поддержка и пространственная близость. Следствием родственных отношений высокоранговых самцов со своими сыновьями является сравнительно более высокий социальный статус последних по сравнению с ровесниками, а также возможность более раннего образования собственных гаремов.

Одно из важнейших наблюдений, сделанных в результате многолетнего изучения свободноживущих павианов гамадрилов, это установление их способности к воспроизведению сложной 4-х уровневой социальной структуры. Основой для такого воспроизведения являются базовые образования павианов гамадрилов – одно-самцовые единицы или гаремы. Детеныши самцы, родившиеся в одних и тех же гаремах, в последующем формируют объединения родственных самцов – кланы. Разрастание кланов и их укрупнение неизбежно приводит к формированию новых групп – бендов. В свою очередь, бенды со временем могут превратиться в самостоятельные стада.

Выводы.

1. Научно подтверждена возможность свободного разведения павианов гамадрилов на Кавказе. Павианы гамадрилы могут жить и размножаться в условиях субтропиков Черноморского побережья Кавказа с минимальной помощью человека, используя, в основном, природные кормовые ресурсы и естественные укрытия.

2. Павианы гамадрилы способны к воспроизводству сложной 4-х уровневой социальной структуры.

Литература

1. Чалян В.Г., Мейшвили Н.В. Инфантицид у павианов гамадрилов. // Биологические науки – 1990. – № 3. – С. 99-106.
2. Estrada A., Estrada R. Reproductive seasonality in a free-ranging group of stumptail macaques. Primates – 1981. – Volume 22. – № 4. – P. 503-511.
3. Kummer H. Social organization of baboons: a field study. – 1968. Chicago: University of Chicago Press.
4. Sigg H., Stolba A. Home range and daily march in a Hamadryas Baboon Troop. Folia Primatologica – 1981. – Volume 36. – № 1-2. – P. 40-75.
5. Swedell L. Ranging behavior group size and behavioural flexibility in Ethiopian hamadryas baboons. Folia primatologica – 2002b. – № 3. – P. 95-103.
6. Windle W. The Cayo Santiago Primate Colony. Science – 1980. – Volume 209. – № 4464. – P. 1486-1491.
7. Wolfe L.P., Schilling T., Jones D. Reproductive rates in two breeding colonies of rhesus monkeys. Amer.J.Primatol. – 1988. – № 10. – P. 153.

ВЕСТИБУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В КОСМОСЕ. ЭКСПЕРИМЕНТ «ПРИМАТЫ»

Миллер Н.В. [1], Козловская И.Б.[1], Ильин Е.А. [1], Лапин Б.А. [2], Григорьев А.И. [1]
[1]ФГБНУ ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия
[2]ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия
nvmiller@mail.ru

Резюме

В программе Бион на приматах проводились 2 вестибулярных исследования: координации глаз и головы и активности медиальных вестибулярных ядер и флоккулюса мозжечка при угловых движениях головы в горизонтальной плоскости во время реакции установки взора; чувствительности центральных вестибулярных нейронов при линейном перемещении вдоль оси тела. Показано, что чувствительность центральных вестибулярных нейронов как к угловым, так и к линейным ускорениям увеличивалась в начале полета и затем постепенно нормализовалась, в то время как во флоккулюсе высокая активность сохранялась в течение всего полета.

Ключевые слова: приматы, микрогравитация, вестибулярная чувствительность, нейрональная активность.

VESTIBULAR STUDIES IN SPACE. EXPERIMENT “PRIMATES”

Miller N.V. [1], Kozlovskaya I.B. [1], Ilyin E.A.[1], Lapin B.A. [2], Grigoriev A.I. [1]
[1]Institute for Bio-medical Problems, Russian Academy of Sciences Moscow, Russia
[2]Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia

Abstract

There were two main vestibular studies in the Bion project: the study of eye-head coordination and activity in the medial vestibular nuclei and the

cerebral flocculus associated with angular head movement in the horizontal plane during the gaze fixation reaction; the study of the sensitivity of central vestibular neurons to linear head displacement along the body axis. The data show that the sensitivity of central vestibular neurons to both angular head rotation and vertical linear motion increased in the earlier days in Space and that gradually normalized, while high activity in the cerebral flocculus persisted throughout the flight.

Key words: primates, microgravitation, vestibular sensitivity, neuronal activity.

Введение. Космический адаптационный синдром (КАС) является одним из наиболее постоянных спутников пребывания в невесомости, существенно осложняющих жизнь космонавтов и их адаптацию к условиям космических полетов. Не вызывает сомнений ведущая роль в его развитии изменений в деятельности сенсорных систем и в первую очередь вестибулярной системы, гравитационная зависимость которой чрезвычайно высока. Именно поэтому большинство гипотетических представлений связывают КАС с дисфункцией в невесомости вестибулярного аппарата, обуславливающей возможность нарушения парной деятельности вестибулярных структур [7], развитие сдвигов в каналово-отолитовом взаимодействии [5], подавление трансляторных возможностей отолитовой системы [6] и пр. Однако ни одна из этих гипотез, базирующихся в основном на теоретических построениях, не была подтверждена в связи с отсутствием надежных экспериментальных данных, получение которых в условиях наземного моделирования вряд ли возможно, а в реальных космических полетах с участием членов экипажей крайне затруднено в связи со сложностями стандартизации экспериментальных условий и ограниченными возможностями применения необходимых экспериментальных процедур.

Цель работы. В связи со всем сказанным при формировании программы эксперимента на приматах абсолютный приоритет, 60-70% экспериментального времени, был отдан вестибулярным исследованиям. Задачи исследований при этом составили: а) изучение влияний микрогравитации на характеристики двигательных реакций, опосредуемых вестибулярной чувствительностью; б) определение основных

закономерностей вестибулярной адаптации к невесомости и в) лежащих в ее основе изменениях нейрональной организации вестибулярных ответов.

Методы исследования. Эксперимент проведен в полетах 6 биоспутников на 12 самцах macaca mulatta в возрасте около 4-х лет, обученных соблюдать спокойствие и выполнять стабильно в измененных условиях среды все требования исследования. Использовавшаяся в полетах аппаратура включала 2 капсулы, обеспечивающие необходимые для жизни животных условия среды, снабженные специальными креслами, костюмной системой фиксации животных, устройствами для подачи пищи и сока, системой уборки отходов, а также устройствами, необходимыми для осуществления экспериментов, а именно: дисплеем для предъявления зрительных стимулов и двумя актографами – для верхней и нижней конечностей. Имеющийся в каждой капсуле комплекс научной аппаратуры включал в свою очередь необходимые сенсоры, усилители и другие приборы, обеспечивающие регистрацию и хранение всей необходимой научной информации, объем которой, поступающий от устройств слежения за жизнедеятельностью животных, за работой всех технических систем и биологических систем регистрации был огромным. Достаточно отметить, что каждое экспериментальное животное являлось носителем более 40 вживленных датчиков, 18 из которых обеспечивали сбор информации по вестибулярной части эксперимента.

Особенности работы в невесомости каналовой части вестибулярного аппарата изучали по показателям теста «Реакция Установки Взора» (РУВ), в ходе которого животные для получения небольшого количества сока в течение короткого временного интервала (1 с) должны были установить взор на одной из 4-х зрительных мишеней размером в 1 угловой градус, предъявляемых в случайном порядке на зрительной панели, расположенной по дуге на расстоянии 30 см от их глаз. При выполнении теста регистрировали амплитуды и скорости горизонтальных движений глаз и головы, нейрональную активность ядерного вестибулярного комплекса (6 каналов) и вестибуло-мозжечка, а также характеристики общего состоянии животного — по показателям ЭЭГ, ЭКГ и температуры тела.

Исследования по данной программе выполняли до и после завершения полетов, а также ежедневно в их ходе дважды в день – утром и вечером. При каждом тестировании животные выполняли 256 реакций РУВ, выпивая при этом около 50 мл сока.

Для изучения функции отолитовой части вестибулярного аппарата определяли характеристики нейрональных ответов вестибулярного ядра и вестибуло-мозжечка на вертикальные синусоидальные перемещения кресла обезьяны с частотой 0,24 Hz (V=3,4 см/с; 0,005 g); 0,67 Hz (V=9,5 см/с; 0,41 g); 0,93 Hz (V=13.2 см/с; 0,078 g) и 1,7 Hz (V=24,0 см/с; 0,26 g). В ходе эксперимента на каждой частоте выполнялось 40 колебаний вверх/вниз с перерывами между ними в 30 минут, так что в целом тест занимал утром лишь 10 минут. При выполнении теста регистрировали параметры движений кресла, амплитуду вертикальных движений головы, нейрональную активность среднего вестибулярного ядра, нейрональную активность флоккулярной доли мозжечка, а также параметры жизнедеятельности животного – ЧСС, частоту дыхания и температуру тела.

Результаты и их обсуждение. Результаты выполненных исследований показали, что переход к невесомости у всех обезьян сопровождался практически немедленным возрастанием возбудимости каналовой части вестибулярного аппарата [2], что проявлялось: а) возрастанием в первый же день горизонтального усиления КВОР в 1,5 – 1,8 и более раз; и б) одновременном увеличении интенсивности нейрональных ответов на горизонтальные движения головы. Начиная со 2- 5-х суток полета оба показателя начинали снижаться, возвращаясь к 14-м суткам полета к предполетным значениям. Сохраняющаяся в течение всех дней высокая нейрональная активность во флоккулюсе мозжечка позволила предположить участие вестибуло-мозжечковой петли в развитии указанного выше адаптационного торможения избыточной каналовой чувствительности.

Динамика изменений нейрональных ответов среднего вестибулярного ядра на синусоидальные вертикальные перемещения при переходе к невесомости была аналогичной [4]: в первые 2-8 дней полета интенсивность ответов на раздражения всех тестируемых частот возрастала, а затем снижалась. Глубокая длительная суппрессия всех исследо-

вавшихся отолитовых реакций после завершения космических полетов длительностью 10-12 дней была выявлена у приматов американскими исследователями в совместных российско-американских экспериментах программы. Амплитуды компенсаторного противовращения глаз при динамическом и статическом наклонах головы в течение 11-ти послеполетных дней составляли у летавших обезьян менее 70% от исходной. Величина вертикальной модуляции при вертикальной ротации в то же время была снижена более чем на 50%. Выраженность асимметрии движений вертикального нистагма глаз вверх и вниз, характерная для 1g, также была снижена [3] Аналогичная суппрессия реакции на отолитовые раздражения была обнаружена в невесомости у приматов в системе регуляции сердечного ритма: в ходе полета у всех экспериментальных животных регистрирующиеся в условиях 1 g при линейном ускорении двухфазные изменения RR интервалов ЭКГ полностью подавлялись, восстанавливаясь лишь. на 8-й и далее послеполетный день [1].

Выводы. Таким образом, результаты выполненных в рамках экспериментальной программы «Приматы» исследований, существенно расширили наши знания об обуславливаемых невесомостью процессах в вестибулярной системе и механизмах их развития, что открыло новые возможности прогнозирования изменений в деятельности систем управления движением в условиях изменяющихся гравитационных условий среды и их профилактики.

Литература

1. Badakva A.M., Zalkind D.K., Miller N.V. Cardiac rhytme responces to otolith stimulation of monkey in microgravity // J. of Gravit. Physiology. – 1998. – V7. – N 1. – P.107-111.
2. Badakva A.M., Zalkind D.K., Miller N.V., Riazansky S.M. Head movements and vestibular neuronal activity in response to otolith stimulation of monkey in space // J. of Gravit. Physiology. – 1998. – V7. – N 1. – P. 99-105.
3. Dai M., McGarvie, Kozlovsraya I.B. et al. Effect of space flights on ocular correcter rolling // Exp. Brain Res. – 1995. – N.106. – P. 111-123.

4. Dai. M., Raphan T., Cohen B. Modulation of vergence by off-vertical axis rotation in the monkey // Exp. Brain Res. – 1996. – N.111. – P. 21-29.
5. Kornilova L.N., Yakovleva L.Yu., Tarasov I.K. Vestibular disfunction in cosmonauts during adaptation to zero g and readaptation to 1 g // In Proceeding of the Fifth Annual meeting of IUPS. – 1983. – P. 26-35.
6. Kozlovsraya I.B., Babaev B.M., Belozerova J.N., Sirota M. The effect of weightlessness on motor and vestibulomotor reaction // Physiologist. – 1984. – 25. – P. 111-114.
7. Yegorov B.B., Samarin G.I. Possible change in the paired functions of the vestibular apparatus // Kosm. Biol. Med. – 1970. – № 4. – P. 86-88.

ИССЛЕДОВАНИЯ НА ОБЕЗЬЯНАХ В КОСМИЧЕСКИХПОЛЕТАХ

Григорьев А.И., Лапин Б.А., Козловская И.Б., Ильин Е.А.
ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия
ilyine@imbp.ru

Резюме

В связи с подготовкой первого полета человека в космос в СССР, начиная с 1951 г., начали проводить эксперименты на собаках в полетах ракет. В США объектами таких исследований в полетах ракет, начиная с 1948 г., стали обезьяны. Запуски животных на ракетах носили в основном испытательный характер, а научные исследования на обезьянах в орбитальных полетах начались в США в 1969 г., а в СССР – в 1983 г. В СССР, а затем в России, исследования проведены на 12 обезьянах макаках резусах в шести полетах биоспутников «Бион». Главной задачей проведенных исследований было изучение влияния невесомости на поведение, нейросенсорную систему, моторный контроль и сердечно-сосудистую систему. С помощью вживленных и накладных электродов удалось получить уникальную информацию о механизме развития

космической формы болезни движения, моторной дисфункции и повышении внутричерепного давления в условиях невесомости. Исследования на обезьянах по программе «Бион» проводились при широкой кооперации с зарубежными специалистами.

Ключевые слова: макаки резусы, невесомость, биоспутник, адаптация

MONKEYS RESEARCH IN SPACE FLIGHTS

Grigoriev A.I., Lapin B.A., Kozlovskaya I.B., Ilyin E.A.
SSCRF – Institute of Biomedical Problems of RAS
ilyine@imbp.ru

Abstract

For the purpose to prepare the first manned flight into space dogs experiments were conducted since 1951 in USSR and monkeys experiments since 1948 in USA using different types of rockets. It were just the test flights. The scientific research on monkeys in orbital flights started at 1969 in USA and at 1983 in USSR. In USSR and then in Russia monkeys research were conducted using 12 Rhesus monkeys in six flights of biosatellite Bion (1983-1997). The main goal of study was to evaluate effects of microgravity on neurosensory system, motor control and cardiovascular system. With the help of implanted and cutaneous electrodes it became possible to get unique information related to mechanism of space motion sickness development, motor disfunction and increased intracranial pressure in microgravity. Monkeys research in frame of Bion program were accomplished by wide international cooperation.

Key words: Rhesus monkeys, microgravity, biosatellite, adaptation

Экспериментальные исследования на животных сыграли и продолжают играть огромную роль в решении многих актуальных проблем медицины и здравоохранения. Общепризнанно, что в 90% случаев медико-биологические эксперименты проводятся на мышах, крысах и других грызунах. Оставшиеся 10% экспериментов приходятся на такие виды животных, как рыбы, птицы, коровы, овцы, кошки, собаки и обе-

зьяны. При этом эксперименты на обезьянах занимают примерно 1% от всех исследований на животных. Но именно этот 1% исследований позволил совершить ряд крупных открытий, спасти жизнь и сохранить здоровье миллионам людей и открыть перспективу успешной профилактики и лечения многих заболеваний.

Широко использовались обезьяны и для решения задач космической медицины (табл.1). Эксперименты на обезьянах начались в 1948 году, когда в США стали осуществлять регулярные запуски баллистических ракет[5]. Это были ракеты V-2 и Блоссом (1948-1950 гг.), Аэроби (1951-1952 гг.), Юпитер (1958-1959 гг.) и Гермес (1959-1960 гг.). В этих запусках физиологические исследования проводили на макаках резусах и беличьих обезьянах, при этом длительность пребывания животных в условиях невесомости не превышала 20 мин. В суборбитальном полете космического аппарата (КА) «Меркурий-2» (1961 г.), а затем в орбитальном полете КА «Меркурий-5» (1961 г.), продолжавшемся 3 час 20 мин, физиологические исследования проводили на обезьянах шимпанзе. Первый относительно длительный эксперимент (8,8 суток) в космосе был проведен на макаке неместрине в полете американского биоспутника «Биосателлит-3» в 1969 г. В 1985 г. в США на борту «Спейслэба-3» в 7-ми суточном полете находились две беличьих обезьяны, на которых исследовали поведенческие реакции. Это был последний в США полетный эксперимент с обезьянами. В противовес этому в СССР и России в 80-е – 90-е годы успешно развивалась программа космических исследований на макаках резусах /Macaca mulatta /в полетах шести биоспутников «Бион » (серия «Космос»), длительность которых находилась в пределах от 5 до 14 суток [6].

Таблица 1

Физиологические исследования на обезьянах в космических полетах

Годы полета	Космический аппарат	Продолжительность полета	Вид обезьян
1948-1950	Ракеты V-2 и «Блоссом»	до 20 мин	Макаки резусы и беличьи обезьяны

1951-1952	Ракета «Аэроби»	до 20 мин	Макаки резусы и беличьи обезьяны
1958-1959	Ракета «Юпитер»	до 20 мин	Макаки резусы и беличьи обезьяны
1959-1960	Ракета «Гермес»	до 20 мин	Макаки резусы и беличьи обезьяны
1961	«Меркурий-2» (суборбит.полет)	30 мин	Шимпанзе
1961	«Меркурий-5»	3час 20 мин	Шимпанзе
1969	«Биосателлит-3»	8,8 суток	Макака неместрина
1983	«Бион-6»	5 суток	Макаки резусы
1985	«Бион-7»	7 суток	Макаки резусы
1985	Spacelab-3	7 суток	Беличьи обезьяны
1987	«Бион-8»	12,5 суток	Макаки резусы
1989	«Бион-9»	14 суток	Макаки резусы
1992	«Бион-10»	11,6 суток	Макаки резусы
1996-1997	«Бион-11»	13,7 суток	Макаки резусы

Условия проведения исследований

Решение о проведении экспериментальных исследований на обезьянах в полетах биоспутников «Бион» было принято в 1977 г. Основанием для развертывания работ в этом новом для нашей страны направлении исследований послужило создание кораблей многоразового использования «Буран» для кратковременных полетов и связанная с этим необходимость изучения так называемого космического адаптационного синдрома, т.е. «острого» /начального/ периода адаптации организма к условиям невесомости.

Эксперименты на обезьянах по программе «Бион» проводились с соблюдением принципов гуманности и максимального щажения животных.

Обезьяны, находившиеся на борту биоспутников, были обучены выполнять двигательные задачи, аналогичные выполняемым человеком в пилотируемых полетах. Наличие у животных вживленных электродов

и накладных датчиков позволило регистрировать в процессе полета активность их мозговых структур, мышц, сердца, биоритмологические и другие показатели. Взятие образцов тканей (мышечной и костной), крови и костного мозга сразу после полета позволило получить уникальный материал, необходимый для оценки и более полного понимания процессов, развивающихся в различных системах организма в условиях невесомости.

Для проведения экспериментов в полетах биоспутников специалисты Института медико-биологических проблем (ИМБП) совместно со специалистами Специального конструкторского бюро «Биофизприбор» создали капсулы, оборудованные всем необходимым для содержания обезьян и проведения на них экспериментальных исследований. На борту каждого биоспутника размещали две капсулы[7].

Обезьяна в капсуле достаточно жестко фиксировалась в области таза к основанию кресла-ложемента, где имелось отверстие для сбора мочи и кала. Туловище и конечности обезьяны оставались относительно свободными. Перед запуском в космос и перед спуском с орбиты специальная система лямок притягивала животных к спинке кресла-ложемента. Через прозрачные боковые стенки капсул обезьяны могли видеть друг друга. В каждой капсуле находились мундштук для подачи обезьяне пастообразного корма, рецепт которого был разработан в ИМБП, и мундштук для подачи сока, который использовали в качестве подкрепления при выполнении в полете условных рефлексов. Перед взором обезьяны в капсуле была размещена панель со световыми индикаторами для изучения условно-рефлекторной деятельности и вестибуло-глазодвигательного взаимодействия.

Необходимо отметить, что отечественные приматологи с большим энтузиазмом восприняли идею проведения физиологических экспериментов на обезьянах в полетах биоспутников «Бион» и активно включились в программу работ по подготовке полетных экспериментов. Большой вклад в успешную реализацию комплексной программы научных исследований внес Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии АМН СССР (директор Б.А.Лапин, г.Сухуми), обеспечивший предварительный клинико-физиологический отбор и поставку в ИМБП обезьян для экспериментов в полетах

биоспутников «Бион-6» (1983 г.), «Бион-7» (1985 г.),«Бион-8» (1987 г.) и«Бион-9» (1989 г.). Совместно со специалистами этого института была разработана методика тренировки обезьян к полету и методика предполетного клинико-физиологического отбора.

После распада СССР подготовка и проведение экспериментов с обезьянами в полетах биоспутников «Бион-10» (1992 г.) и «Бион-11» (1996-1997 гг.) проходили при активном участии Института медицинской приматологии РАМН (директор Б.А.Лапин, г.Адлер). Поскольку эксперименты на обезьянах в полетах биоспутников «Бион» являлись составной частью национальной программы медико-биологических исследований в космосе, головной организацией, ответственной за реализацию этой программы, был ИМБП.

К сожалению, многих специалистов из вышеуказанных научных учреждений уже нет с нами, но мы их помним и ценим их вклад в успешную реализацию уникальной международной программы исследований на обезьянах в полетах биоспутников «Бион».

Среди зарубежных участников программы прежде всего следует выделить специалистов США. Это были 52 исследователя из 21 научного /учебного/ учреждения. С французской стороны в программе участвовали 29 исследователей из 8 научных /учебных/ учреждений. Помимо них в программе были задействованы по одному исследователю из Германии, Швейцарии, Канады и Украины.

Состояние обезьян в полете оценивалось по таким телеметрируемым параметрам, как частота сердечных сокращений, температура тела, выполнение психомоторных тестов, поедаемость корма. Использовались также каналы телевидения для наблюдения за поведением обезьян. Состав аппаратуры для проведения научных исследований на обезьянах зависел от задач полетной программы и представлял собой комплекс, включающий накладные и вживляемые в тело датчики (электроды), кабели, усилители биопотенциалов и регистраторы физиологической информации. При проведении полетных экспериментов с обезьянами регистрировали следующие параметры:

- Нейрональная активность вестибулярных ядер головного мозга
- Электроокулограмма
- Углы поворота головы

- Условные двигательные рефлексы
- Электрокортикограмма и $p0_2$ в коре мозга
- Артериальное давление
- Скорость кровотока в общей сонной артерии
- Реопневмограмма
- ЭМГ мышц шеи и мышц голени
- Усилие, развиваемое сухожилием мышц голени
- Общая двигательная активность
- Нажатие на ножную педаль
- Электрогастрограмма

Основные результаты исследований

Реакция обезьян в начальный период адаптации к невесомости носила ярко выраженный индивидуальный характер. В первые 1-2 дня все обезьяны были, как правило, малоподвижными и сонливыми, в последующие дни состояние обезьян нормализовалось с различной скоростью и они становились более активными. Обращало внимание, что в первые 2 дня полета лицо и шея у некоторых обезьян были отечными. Постепенно отечность уменьшалась. Исследования инструментальных условных двигательных рефлексов у обезьян не выявило сколько-нибудь существенного неблагоприятного влияния невесомости.

Нейросенсорные исследования составляли приоритетный раздел экспериментальной программы в полетах биоспутников. Данные, полученные в этих исследованиях, открыли возможность понимания природы нарушений вестибулярных функций в невесомости, их динамики развития и некоторых нейрональных механизмов. Вестибулярные и сенсо-моторные исследования обнаружили выраженное влияние невесомости на характеристики реакций, осуществляемых с участием отолитового и каналового отделов вестибулярной системы, и на организацию двигательного управления[2,3].

Увеличение амплитуды компенсаторного противовращения головы и ответа сердечного ритма на отолитовую стимуляцию также, как и увеличение коэффициента горизонтального вестибуло-окулярного рефлекса, сопровождалось увеличением активности нейронов вести-

булярных ядер. К концу полета наблюдалось адаптивное подавление всех наблюдаемых реакций, вероятно, по механизму вестибуло-мозжечковой петли. Послеполетные тестирования выявили глубокое и длительное подавление глазодвигательных реакций и ответа сердечного ритма на отолитовую стимуляцию, а также подавление глазодвигательных реакций, осуществляемых с участием отолитового входа.

Результаты исследования системы управления движениями показали, что невесомость существенно снижала возможность точностного управления движениями любого типа: быстрыми и медленными, одно- и многосуставными, пространственно ориентированными и не связанными с пространственными задачами, включающими и не включающими позную компоненту, а также выполняемыми различными эффекторами. Когнитивные функции при этом не страдали [1,7].

Результаты нейросенсорных и сенсомоторных исследований на обезьянах в полетах биоспутников имеют огромное фундаментальное значение для понимания механизмов возникновения космической формы болезни движения и моторных нарушений. Вместе с тем, учитывая, что паттерн и механизм, контролирующий функцию взора у человека и обезьяны индентичен, полученные результаты были использованы при разработке практических рекомендаций применительно к размещению приборов управления полетом в кабине космического корабля. Так, приборы, требующие немедленной реакции командира корабля, должны размещаться в центральном поле зрения, а управление джойстиком не должно требовать быстрых или значительных поворотов головы в первые дни полета. Не рекомендуется также выполнять высокоточные и высоко аккуратные движения руками в первые дни полета. Эти рекомендации были переданы в заинтересованные организации для их внедрения.

В результате проведенных исследований сердечно-сосудистой системы обезьян установлено, что в первые часы и даже дни космического полета увеличение центрального объема крови не являлось безусловным. В то же время в этот период полета повышалось внутричерепное давление, которое, однако, нельзя рассматривать как внутричерепную гипертензию, поскольку его значения оставались в пределах верхней границы нормы. Изменения характера пульсовых колебаний

внутричерепного давления в первую неделю полета свидетельствуют о затруднении оттока венозной крови из полости черепа. Тем не менее, подобные нарушения гемоликвородинамики не приводили к гипоксемии в изучаемых областях коры головного мозга – лобной и соматосенсорной. Более того, в первые минуты и часы космического полета уровень pO2 в этих областях коры мозга даже увеличивался, что скорее всего связано со стрессом в результате сочетанного влияния на обезьяну предшествующей перегрузки при выводе биоспутника на орбиту и начального эффекта микрогравитации. Прогрессирующее повышение уровня pO2 на 3-5 сутки полета и превышение его фонового значения на протяжении 2-х недельного полета свидетельствует об увеличении микроциркуляции крови в головном мозге, что может быть одной из причин некоторого повышения внутричерепного давления[7,8].

Во время полета не обнаружено зависимости между динамикой показателей центрального кровообращения и характером кровотока в бассейне общей сонной артерии. Полученные данные о динамике кровотока в общей сонной артерии в 1-е сутки полета (увеличение у одной обезьяны и его уменьшение у другой) свидетельствуют о том, что патогенез отека мягких тканей лица и шеи в невесомости необязательно связан с увеличением их кровоснабжения.

В целом, выраженность и длительность, а также направленность сдвигов гемодинамических характеристик у обезьян на начальном этапе адаптации к невесомости существенные индивидуальные различия, что позволяет усомниться в доминирующей роли перераспределения жидкости в развитии реакций системы кровообращения в условиях невесомости. Более вероятным представляется предположение о том, что эти реакции являются следствием рассогласования в деятельности различных систем регуляции, обусловленного не только перераспределением жидких сред, но и изменениями характера суммарного афферентного потока.

Исследования структуры, функции и метаболизма скелетных мышц обезьян после двухнедельного пребывания в условиях космического полета показали, что размеры волокон обоих типов во всех исследованных мышцах, кроме *m. gastrocnemius medialis*, существенно

снизились. При этом атрофические изменения были более выражены в мышцах-экстензорах (*m.soleus*, глубокая зона *m.triceps brachii* и *m.vastus lateralis*). После полета в большинстве исследованных мышц (кроме *m. tibialis anterior*) атрофия волокон медленного типа была более выраженной. Однако атрофия волокон быстрого типа была также достаточно велика. Резкое снижение в полете характерной для этой мышцы фазной активности могло привести к уменьшению размеров волокон быстрого типа. Ни в одной из контрольных групп обезьян подобных однонаправленных изменений такой же глубины не было обнаружено, что позволяет относить их преимущественно за счет влияния невесомости [11].

Отмечено также значительное снижение количества капилляров в антигравитационных мышцах-разгибателях обеих конечностей у полетных животных (более 30%) и отсутствие такого снижения у животных контрольных групп.

Данные о влиянии невесомости на мышечную систему были использованы при обосновании дифференцированного подхода к диагностическим и профилактическим мероприятиям в отношении различных мышц и мышечных групп человека в космическом полете.

Исследования костного биоптата показали, что невесомость обусловлила: уменьшение губчатого вещества подвздошной кости и минеральной плотности поясничных позвонков, снижение новообразования и процессов минерализации костной ткани, снижение показателей активности остеобластов и возрастание остеолитической активности остеоцитов [9,10]. При этом концентрация кальция в сыворотке крови повысилась.

Анализ пунктата костного мозга в первые сутки после полета показал ярко выраженное снижение интенсивности процесса костномозгового эритро- и гранулопоэзов.

В крови обезьян через 4 часа после приземления было обнаружено значительное увеличение уровня кортизола, что свидетельствовало о гравитационном стрессе, обусловленном воздействием перегрузок спуска с орбиты и переходом от невесомости к условиям земной силы тяжести. На изменение эндокринной регуляции в полете указывали также снижение в крови уровней гормона роста, трийодтиронина и тестостерона[4].

Заключение

Результаты экспериментов, выполненных на обезьянах в полетах биоспутников«Бион» международным коллективом ученых, явились серьезным вкладом в понимание механизмов адаптации организма к невесомости, в развитие научных подходов к созданию новых перспективных средств и методов профилактики и сохранения на высоком уровне здоровья и работоспособности космонавтов в космических полетах.

В 2017 г. исполнилось 20 лет со дня окончания 14-суточного полета биоспутника «Бион-11» (1997 г.) с двумя обезьянами. Фактически это был последний запуск обезьян в космос в нашей стране. Анализируя научные результаты, полученные в этом и предыдущих летных экспериментах на обезьянах, понимаешь, что эти эксперименты были уникальными и намного опередили свое время и их повторение сейчас и в ближайшем обозримом будущем не представляется возможным. Во-первых, это сложно и очень дорого. Во-вторых, это требует для набора статистически значимых результатов нескольких запусков, а это опять очень дорого и долго. Однако по-прежнему остается актуальным проведение на обезьянах наземных исследований и экспериментов, моделирующих условия космических полетов.

Литература

1. AntsiferovaL.I., G.G.Shlyk, A.V.Ignatenko. Effect of microgravity on the implementation of conditioned reflex skills of Rhesus monkeys //Journal of Gravitational Physiology. 2000. V.7. N1. S.95-S.98.
2. BadakvaA.M., D.V.Zalking, N.V.Miller, S.N.Riazansky. Head pitch movement and vestibular neuronal activity in response to otolith stimulation of monkeys in space //Journal of Gravitational Physiology. 2000. V.7. N1. S.99-S.106.
3. CohenB., S.B.Yakushin, G.R.Holstein et al. Vestibular experiments in space // Advances in Space Biology and Medicine: Experimentation with animal models in space.2005. V.10. S.105-S.164.
4. Grindeland R.E.,M.A.Dotsenko, V.R. Mukku et al. Rhesus monkeys hormonal responses to microgravity //Journal of Gravitational Physiology. 2000. V.7. N1. S.143-S.144.
5. Hoban-Higgins T. M., E. L.Robinson, C. A.Fuller . Primates in space flight // Advances in Space Biology and Medicine: Experimentation with animal models in space.2005. V.10. S.303-S.326.

6. IlyinE.A. Historical overview of the Bion Project //Journal of Gravitational Physiology. 2000. V.7. N1. S.1-S.8.
7. KozlovskayaI.B., R.E.Grindeland, M.Viso, V.I.Korolkov. Bion 11 science objectives and results //Journal of Gravitational Physiology. 2000. V.7. N1. S.19-S.26.
8. KrotovV.P., A.M.Nosovsky. Oxygen tension in the somatosensory cortex of Rhesus monkeys in space //Journal of Gravitational Physiology. 2000. V.7. N1. S.125-S.128.
9. OganovV.S., A.V.Bakulin, V.E.Novikov, L.M.Murashko. Change and recovery of bone mass and acoustic properties of Rhesus monkeys after Bion 11 spaceflight //Journal of Gravitational Physiology. 2000. V.7. N1. S.163-S.168.
10. RodionovaN.V., I.M.Shevel, V.S.Oganov et al. Bone ultrastructural changes in Bion 11Rhesus monkeys //Journal of Gravitational Physiology. 2000. V.7. N1. S.157-S.162.
11. ShenkmanB.S., I.N.Belozerova, P.Lee, T.L.Nemirovskaya. Structural and metabolic characteristics of Rhesus monkeys *m.soleus* after spaceflight // Journal of Gravitational Physiology. 2000. V.7. N1. S.39-S.42.

НИИЭПИТ В ПРОГРАММАХ КОСМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Джокуа А.А., Баркая В.С.
НИИ экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, Сухум, Абхазия

Резюме

В связи с подготовкой к первому полёту обезьян на биоспутнике и созданием научных программ этого эксперимента сотрудники НИИЭПиТ совместно с учёными Института медико-биологических проблем (Москва) в середине 1970-х годов разработали модели, имитирующие такие факторы невесомости как гипокинезия и опорная разгрузка. Были изучены механизмы длительного влияния этих факторов на различные физиологические системы животных с применением инвазивных методов и дозированных вмешательств, исключенных в исследованиях с участием человека. Разработанная в НИИЭПиТ методика

подготовки обезьян для экспериментов в невесомости, включавшая обучение животных выполнению точностных произвольных движений (сопоставимых с операторскими задачами космонавтов) были внедрены в практику работ по программной подготовке обезьян к полётам на биоспутниках.

Ключевые слова: гипокинезия, невесомость, подготовка к полетам.

RIEP&T IN SPACE RESEARCH PROGRAMS

Jokua A.A., Barkaya V.S.
Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Abkhazian Academy of Sciences

Abstract

In the middle of 1970es in the connection of the preparation for the first flight of monkeys on biosatellites and developing of scientific research programs of this experiment researchers of RIEP&T together with scientists of Medical and Biological Problems Institute (Moscow) developed the models imitating such factors of weightlessness as hypokinesia and reference unloading. The mechanisms of long-term effect of these factors on various physiological systems of animals with application of invasive methods and dosed interference, excluded from experiments with human participation, were studied. The developed in RIEP&T methods of monkeys' preparation for experiments in weightlessness including animals training in carrying-out of accurate arbitrary movements (compared with operation tasks of cosmonauts) were applied in practice of works on program preparation of monkeys for flights on biosatellites.

Key words: hypokinesia, weightlessness, preflight training.

К середине 1970-х годов в исследованиях по космической медицине был накоплен значительный материал о влиянии невесомости на различные физиологические системы организма человека, но главное, было доказано, что в условиях околоземных космических полетов

возможно жить и выполнять операторскую деятельность. Эти факты свидетельствуют о высокой пластичности и приспособляемости гравитационных механизмов ЦНС. Постоянно расширялся круг методов исследования реакций организма на невесомость, применяемых в модельных условиях и непосредственно в полётах.

Было доказано, что двигательная (мышечная) система – самая гравитационно-зависимая – раньше других отвечает на воздействие невесомости, и что невесомость в первую очередь «бьёт» по разгибателям. Длительная опорная разгрузка сопровождается глубоким торможением активности тонической мускулатуры, атрофией тонических мышечных волокон и их трансформацией в фазные волокна. Вместе с тем было очевидно, что исследования с участием человека ограничены с одной стороны невозможностью применения нагрузок, нарушающих гомеостаз (вживление электродов в образования мозга, сосуды или ткани), с другой – сложностью стандартизации условий. К слову, животному, отправляющемуся в полёт на биоспутнике, имплантировали до 50 датчиков во все жизненно важные органы: сердце, сосуды, мышцы, структуры головного мозга. Очевидно также, что параллельно и даже опережая их, должны были проводиться эксперименты на животных с использованием моделей, близких к таковым, применяемым в исследованиях с участием людей.

Родоначальник советской космической медицины академик О.Г. Газенко, возглавлявший Институт медико-биологических проблем МЗ СССР, предложил провести эксперимент на обезьянах, запустив их на биоспутнике в космос. Началу эксперимента предшествовали длительные работы по моделированию эффектов невесомости (таких как гиподинамия и опорная разгрузка).

Сотрудники отдела физиологии и патологии ВНД НИИЭПиТ совместно с учеными ИМБП приняли активное и самое прямое участие в экспериментах по разработке моделей и далее с использованием традиционных для лаборатории физиологических методов исследования и с учетом данных, полученных нами в модельных экспериментах, приняли непосредственное участие в выполнении программной подготовки обезьян к полетам на четырех биоспутниках серии «Космос» и «Бион» (Т.Г. Урманчеева, Г.С. Белкания, А.А. Джокуа, Н.Ф. Колпакова, А.Н. Дёмин, И.П. Шеремет, В.Элиава).

Одним из оригинальных подходов к воспроизводству физиологических эффектов действия на организм длительной гипогравитации и невесомости был принцип наклонного вывешивания животных – стенд «пониженной гравитации» (Г.С. Белкания, А.Н. Дёмин, Ю.Н. Курочкин). Такое решение позволило существенно снизить опорную нагрузку. Важно, что модель позволяла осуществление эксперимента без заметного ограничения произвольной двигательной активности, т.е. без гиподинамии и гипокинезии. Полученные результаты носили пионерский характер: впервые было установлено, что пребывание животных в условиях пониженной гравитации продолжительностью до 60 суток приводит к развитию статокинетических расстройств (нарушению координации движений, равновесия тела), изменениям в мышечной системе, потере массы тела, жидкости и электролитов, снижению функциональной активности ЦНС, снижению кортикостероидов в крови, умеренной гипергликемии, заметному снижению ректальной температуры, ослаблению функции гемопоэза (эритропоэз), нарушениям обмена кальция. Характерно, что послеполетные двигательные расстройства и изменения в мышечной системе компенсировались в короткое время (8 – 10 суток), тогда как вегетативные сдвиги сохранялись до 6 – 8 месяцев. Аналогичные сдвиги в исследуемых системах были выявлены в последующих наземных экспериментах и в условиях космических полетов другими исследователями, что свидетельствует об адекватности разработанной модели и тщательности проведения эксперимента.

Из числа экспериментов многостороннего изучения наземной имитации факторов космического полета особо следует выделить разработку модели клиностатической гипокинезии, позволившей исследовать влияние длительных гиподинамических воздействий на различные функции организма. Оригинальная модель клиностатической гипокинезии обезьян (ограничение двигательной активности в горизонтальном положении) с использованием системы мягкой фиксации животных с помощью специального комбинезона не имела аналогов в СССР и за рубежом. Разработаны способы адекватной подготовки животных к гипокинезии, направленные, прежде всего, на минимизацию стрессорных эффектов обездвиживания (предварительная адаптация

к ограничению двигательной активности в приматологическом кресле с использованием сначала одного (шейного), затем и брюшного фиксаторов; в эксперименте всегда находились две обезьяны, они могли касаться руками; уход за животными и все исследования проводили одни и те же экспериментаторы). Разработаны методика и технология проведения эксперимента. Изучение влияния длительной (до 50 суток) гипокинезии макак резусов на физиологические системы выявило близость эффектов гипокинезии к таковой у человека: развитие отрицательного водного баланса, особенно выраженное в первые 2 недели гипокинезии, уменьшение массы тела, снижение температуры, увеличение АД, показателей красной крови, гематокрита.

Совместно с сотрудниками ИМБП под руководством профессора И.Б. Козловской разработана инструментальная модель произвольного точностного движения, адекватная для выявления особенностей координационной и биомеханической структуры движений нижней конечности, успешно использованная затем в полёте биоспутников. Выделенные в диссертационной работе А.А. Джокуа основные фазы развития двигательных нарушений аналогичны полученным впоследствии в полёте биоспутников.

Огромный вклад в развитие космической медицины и гравитационной физиологии движений внесли результаты исследований на обезьянах в полётах на биоспутниках. Отбор животных и подготовку их к полётам проводили сотрудники лаборатории физиологии НИИЭПиТ (Джокуа, Колпакова, Шеремет, Элиава). Отбирали самцов макак резусов 2 – 2,5 лет, занимавших в группе высокое ранговое положение: адаптировали к условиям частичной фиксации в приматологическом кресле и различным манипуляциям, связанным с клинико-физиологическим обследованием; обучали пить сок из специального штуцера.

Далее проводили поэтапную выработку условных двигательных рефлексов, составлявших основу двух двигательных тестов, моделирующих точностные произвольные движения («ручная» и «ножная» программы), по сути, те же операторские задачи космонавтов. Использовали программный блок управления экспериментом. В состав тренажера входили приматологическое кресло со съёмными актографами («ручным» и «ножным») и световое табло, установленное на уровне

глаз животного. В определённой временной и логической последовательности на табло появлялись световые сигналы различной конфигурации (условные раздражители, в ответ на которые обезьяны выполняли цикл точностных (фазных и тонических) движений – нажимов на педаль актографа (тарированную по нагрузке) заданной амплитуды и скорости). Правильно выполненные циклы движений подкрепляли соком. По условиям договора с ИМБП уровень выполнения животными обоих тестов при их передаче в Москву (вместе с протоколами опытов каждой обезьяны и актом передачи) должен был составлять не менее 60%. Обычно он составлял 80 – 100%.

На основании результатов исследований, полученных в модельных экспериментах с участием людей и на обезьянах, были разработаны средства и методы профилактики двигательных нарушений и сохранения на высоком уровне здоровья и работоспособности не только космонавтов. Одно из таких средств, разработанных учёными ИМБП РАН, получило название «Компенсатор опорной разгрузки». На его основе создан прибор «Корвит», широко использующийся в реабилитационной неврологической практике. Учёные установили, что в условиях опорной разгрузки человека стимуляция (раздражение) опорных зон стопы сопровождалась активацией локомоторных мышц, появлением локомоторных движений при одновременной активации соответствующих зон коры головного мозга. Таким образом, было доказано наличие локомоторной «рефлекторной петли», ранее неизвестной, а значит, доказана возможность запускать локомоции с периферического рефлекторного звена.

Более того, сотрудники ИМБП под руководством создателя школы гравитационной физиологии движений члена-корреспондента РАН профессора И.Б. Козловской открыли наличие у человека второй ведущей гравитационно-зависимой опорной сенсорной системы (или системы опорной чувствительности). Это открытие не только обогатило мировую фундаментальную науку, но и нашло широкое и активное использование в проведении реабилитации двигательных нарушений различного генеза.

Литература

1. Белкания Г.С. Функциональная организация системной реакции организма на земную гравитацию и её экспериментальное значение. Автореферат докт. дисс. Москва, 1977, 50 с.
2. Белкания Г.С. Функциональная система антигравитации и моделирование физиологических эффектов пониженной гравитации. *Успехи физиологических наук,* 1978, т. 9, №2, с. 102 – 128.
3. Белкания Г.С. Функциональная система антигравитации. *В кн.:* Проблемы космической биологии. Москва, Наука, 1982, т. 45, 287 с.
4. Джокуа А.А. Физиологические эффекты длительной клиностатической гипокинезии обезьян. Дисс. канд. биол. наук. Сухуми, 1987, 247 с.
5. Джокуа А.А. Изменения ВНД обезьян в условиях длительной клиностатической гипокинезии. *В кн.:* Материалы Республиканской конференции по вопросам ВНД. Тбилиси, 1980, с. 28 – 30.
6. Джокуа А.А. Характеристика произвольного двигательного акта в условиях длительной гипокинезии. *В кн.:* Тезисы VI Всесоюзной конференции по экологической физиологии. Сыктывкар, 1982, т. 4, с. 23 – 24.
7. Джокуа А.А. Влияние длительной гипокинезии на электрическую активность некоторых структур головного мозга обезьян при выполнении произвольного двигательного акта. *В кн.:* Материалы XVIII Совещания социалистических стран по космической биологии и медицины программы «Интеркосмос». Москва, 1985, 125 с.
8. Урманчеева Т.Г., Джокуа А.А. Методика клиностатической гипокинезии обезьян. *Космическая биология и авиакосмическая медицина,* 1980, №5, с. 82 – 84.

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ ОРГАНА ЗРЕНИЯ И ЗРИТЕЛЬНЫХ ФУНКЦИЙ У ПРИМАТОВ

Туманова А.Л., Агрба В.З.,
Сочинский институт РУДН, Сочи, Россия
НИЦКиР ФФГБУ СКФНКЦ ФМБА России в Сочи
tymanova@mail.ru

Резюме

Последние годы возрос интерес к использованию приматов для фундаментальных исследований органа зрения. В мировой литературе представлены лишь единичные публикации, показывающие вариабельность параметров органа зрения и зрительных функций. Исследования органа зрения у приматов на базе НИИ медицинской приматологии в г. Сочи показали ряд особенностей в показателях ВГД и морфологическую вариабельность структур глазного дна. Углубление исследований, с применением флюоресцентной ангиографии и флюорометрии, позволят значительно расширить возможности для разного рода исследований.

FUNDAMENTAL RESEARCH OSOBENNOSTI OF THE ORGAN OF VISION AND VISUAL FUNCTIONS IN PRIMATES

Tumanova A. L., Agrbah, V. Z.
The Sochi Institute of peoples ' friendship University,
Sochi, Russia
NiICKiR FGBU SKINKS FMBA of Russia in Sochi
tymanova@mail.ru

Abstract

Recent years have seen increased interest in the use of primates for basic research organ of vision. In the world literature presents only a few articles showing the variability of parameters of the organ of vision and visual functions. The study of the organ of vision in primates on the basis

of research Institute of medical Primatology in Sochi has shown a number of features in the IOP and morphological variability of fundus structures. Deepening studies, with the use of fluorescein angiography and fluorometry, will greatly expand the opportunities for different kind of research.

Последние годы возрос интерес к использованию приматов для фундаментальных исследований органа зрения. Особой популярностью пользуются изменения ряда зрительных функций и физиологических параметров органа зрения при научных исследованиях по воздействию на организм фармакологических препаратов. В первую очередь это касается Характеристики переднего отрезка глаза – слизистых бульбарной конъюнктивы и век, размера глазной щели, состояния роговицы и её чувствительность, размера зрачка, симметричности и его реакция на свет. Также стали появляться заинтересованности в измерении внутриглазного давления и осмотре глазного дна, то есть исследователей всё чаще интересуют детали = зрительный нерв, сетчатка, сосуды сетчатки и др.

В мировой литературе представлены лишь единичные публикации, показывающие вариабельность морфологических и физиологических параметров органа зрения и зрительных функций. В качестве одного из аспектов сравнительного исследования зрительной системы, были проведены исследования вариаций морфологии сетчатки у разных видов приматов (Ordy, Massopust & Wolin, 1962). Некоторым авторам удалось собрать коллекцию фундус-фотографий разных приматов (на основе классификации Симпсона, 1945), так как они предвидели, что это будет представлять интерес, потому, что в литературе доступен только ограниченный выбор сетчатки приматов в фундус-фотографиях (Ordy, et al., 1962; Samorajski, Ordy & Keefe, 1966; Smith, Reynolds, Rane & Justice, 1964).

В 1967 году аналогичные исследования были проведены в лаборатории нейрофизиологии в психиатрическом Институте Кливленда, Огайо. Авторы отметили, что фундус-фотография – это не простая процедура. Исследования проводились на расширенном зрачке и животное находилось под анестезией, обычно с thiamylal натрия (Suritol). Фотографии глазного дна сделаны при помощи фундус – камеры Цейс на

Кодаке. У некоторых видов приматов, имеющих высокую отражательную способность сетчатки, требовалось включать фильтр нейтральной плотности оптического пути камеры. Для проведения исследования были необходимы два – три исследователя, один для удержания головы, второй для поддержания правильной ориентации глаза, а третий человек манипулирует камерой. По мнению авторов в процессе съёмки глазного дна приматов необходимо использовать два основных ракурса, один показывает четко макулярную зону и ямку (fovea), а другой диск зрительного нерва и сосудистый пучок, без четкого отображения жёлтого пятна и ямки. В процессе исследования было обнаружено, что сосудистый рисунок сетчатки некоторых видов приматов, не подходит под общий шаблон включённых в исследования обезьян, гиббонов и человека. Нервные волокна в виде круглого или овального диска зрительного нерва и кровеносные сосуды сходятся на центральной области сетчатки с четко определенными границами макулы. Макула в значительной степени без сосудов, немного отличается в пигментации от окружающей сетчатки, и образует кольцо ответного светового рефлекса. Фовеа легко визуализируется и часто показывает глубокий фокус и рефлекс с жёлтого пятна на яркий свет. Из – за разряжения хориокапиллярного слоя часто можно видеть сосуды хориоидеи. Наблюдались значительные вариации в структуре сосудистой внутри вида и разница между представителями различных видов, что, по мнению авторов не должно приниматься за отклонения от нормы. Общие закономерности дугообразные сосуды с ветками, оканчивающимися вокруг макулы или центральной области сетчатки характерно для всех приматов. По словам Джонсона (1901) этот сосудистый рисунок встречается также у многих хищников. Артериолы имеют преимущественно горизонтальную ориентацию, венулы вертикальную и у каждого вида индивидуальный рисунок. Также были отмечены индивидуальные различия в пигментациях, не только у разных видов, но и, встречались также в пределах одного вида. В отличии от человека, окраска сетчатки у разных видов варьирует, от зеленого до зеленовато-синего цвета с пигментом относительно не равномерно распределенным по сетчатке. Площадь возле макулы – чаще близка к натуральному цвету, а иногда от ярко-синего до фиолетового.

Основными отличия между некоторыми высшими видами приматов являются: размер и границы макулярной области, размер и форма диска зрительного нерва, рисунок и пигментация сетчатки.

У ряда видов, таких, как лемуры, Лори и землеройки имеются другие отличия. Диск зрительного нерва, сосудистый рисунок и аваскулярная зона центральной области сетчатки аналогичны высшим видам, однако, не определяется жёлтое пятно или ямка. В некоторых случаях есть разница в скоплении пигмента и поэтому отсутствует кольцевой рефлекс. У некоторых животных отмечался мозаичный ответный рефлекс сетчатки. Высокий отражающий рефлекс сетчатки создаёт трудности в фотографировании сетчатки, кровеносных сосудов и зрительного нерва. Сетчатка, у этих видов, в отличие от человека (Homo sapiens) может варьировать в цвете, от оранжево – желтого, до зеленовато-желтого цвета (Рис. 1).

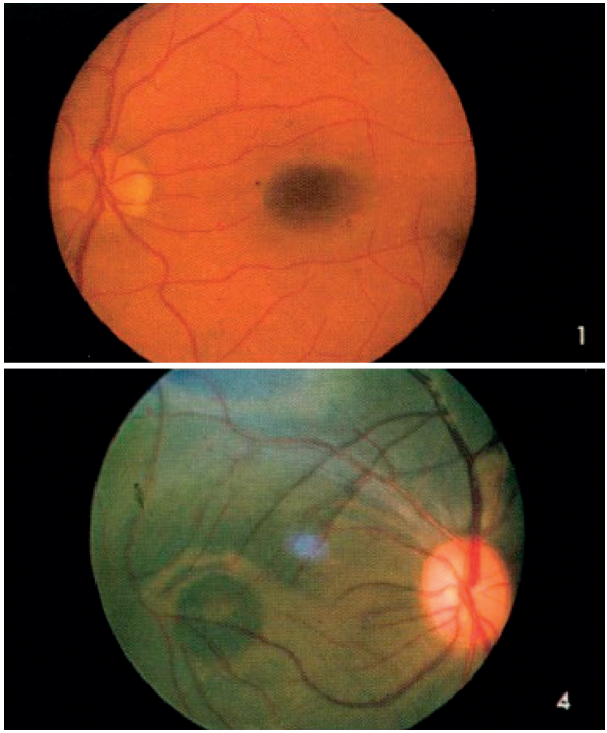


Рис. 1. *1- Глазное дно человека. 4 – Глазное дно Rhesus monkey (Macaca mulatta)*

Проводимые нами исследования на базе НИИ медицинской приматологии в г. Сочи включали в себя исследование органа зрения и зрительных функций у 30 приматов (вид макаки яванские). В процессе исследований мы также столкнулись с рядом вопросов, вызвавших у нас научный интерес, требующий дальнейших исследований. В первую очередь сведения по замеру внутриглазного давления (ВГД), который производился бесконтактным тонометром ТГДц-О1 ПРА (показатели варьировали от 16 и до 24 у разных приматов), Для проверки достоверности был произведен замер ВГД тонометром Маклаков, но уже под анестезией, который показал более низкие цифры (разница до 3 мм рт. ст.). Следовательно, возник вопрос, является ли понижение ВГД следствием анестезии, или это естественная погрешность, между бесконтактным электронным и контактным методом замера ВГД.

Также проведены исследования глазного дна у нескольких приматов, с фоторегистрацией, офтальмоскоп WelchAllyn 118

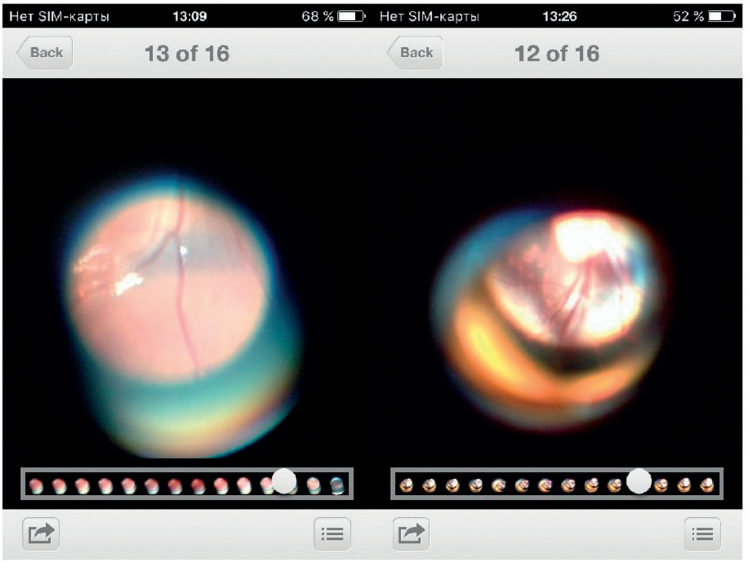


Рис. 2. *Фотографии глазного дна макаки Яванские, полученные с помощь офтальмоскоп WelchAllyn 118 series*

series (Рис. 2), после расширения зрачка и под анестезией. В процессе исследования также столкнулись с определёнными трудностями, закрытые веки, закатывание глаз после анестезии, которые можно назвать преодолимыми при помощи двух-трёх помощников.

В процессе обследования глазного дна были выявлены следующие особенности:

1. цвет сетчатки варьировал от ярко-розового до жёлто-розового, иногда жёлто-серого с выраженным рефлексом;
2. перераспределение пигмента от густопигментированного, рассеянной крапчатости до депигментаций, иногда в виде белых полос похожих на стрии;
3. разрежение хориокапиллярного слоя (местами видны сосуды хориоидеи);
4. диск зрительного нерва чаще овальной формы, иногда тёмного цвета, иногда серого, чаще пигментирован вокруг, больше с височной сторон;
5. артериолы и венулы не заходят на центральную зону, однако аваскулярная область несколько сужена, тёмного цвета, с выраженным кольцевым рефлексом.

Таким образом, считаем важным и целесообразным, продолжение исследований по изучению физиологических параметров и зрительных функций приматов, для более правильного понимания патологических процессов, поставленных перед исследователем вопросов и наиболее адекватных и достоверных ответов. Предполагаем, в дальнейшем, углубление таких исследований, с применением флюоресцентной ангиографии и флюорометрии, дающие возможность изучения скрытых дефектов, таких как – проницаемость роговицы, проницаемость сосудистых стенок, наличия точек фильтрации в пигментном эпителии и др.. Такого рода исследования позволят значительно расширить возможности получения наиболее достоверной информации для разного рода исследований, связанных с испытанием фарм продуктов и патологий с тяжёлым типом течения и прогнозом (диабет, гипертония, атеросклероз, вирусные, аллергические и др. патологии).

Литература

I. Туманова А.Л., Агрба В.З. Фундаментальные исследования органа зрения и зрительных функций у приматов. Сборник научных трудов научно-практической конференции «9 Российский общенациональный офтальмологический форум» том 2- Москва-2016- с.622

II. JOHNSON, G. L. (1901). Contributions to the comparative anatomy of the mammalian eye, chiefly based on opthalmoscopic examination. Phil. Trans. R. Soc. B, 194, 1-82.

III. LEE R. WOLIN AND L. C. MASSOPUST, JR. (September 1967) Characteristics of the ocular fundus in primates. J. Anat. 101 (Pt 4): 693–699.

IV. MARTIN, R. D. (1966). Tree shrews: unique reproductive mechanism of systematic importance. Science N. Y. 152, 1402-1404.

V. ORDY, J. M., MAssOPUST, L. C., JR. & WOLIN, L. R. (1962). Postnatal development of the retina, electroretinogram, and acuity in the rhesus monkey. Expl Neurol. 5, 364-383.

VI. SAMORAJSKI, T., ORDY, J. M. & KEEFE, J. R. (1966). Structural organization of the retina in the tree shrew (Tupaia glis).

VII. SIMPSON, G. G. (1945). The principles of classification and a classification of mammals. Bull. Am. Mus. nat. hist. 85, New York.

VIII. SMITH, J. L., REYNOLDS, D. H., RANE, L. & JUSTICE, J., JR. (1964). The fundus oculi in the squirrel, owl and marmoset monkey. Am. J. Ophthal. 57, 431-434.

НОРМАТИВНО-ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В НАУЧНЫХ ЦЕЛЯХ

Мурашев А.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (Филиал) и Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Пущинский научный центр Российской академии наук, Пущино, Россия
murashev@bibch.ru

Резюме

Проведен анализ нормативных и правовых аспектов, регламентирующих использование лабораторных животных в научных целях. Обсуждены международный опыт и современные актуальные вопросы, связанные с использованием лабораторных животных в научных целях в России.

Ключевые слова: Лабораторные животные, доклинические исследования, надлежащая лабораторная практика.

LEGISLATION ASPECTS OF LABORATORY ANIMALS USED FOR SCIENTIFIC PURPOSES

Murashev A.N.

Shemyakin&Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Branch) RAS and Pushchino Research Center RAS, Pushchino, Russia

Abstract

The analysis of international experience in the creation of regulations governing the usage of animals for scientific purposes. Raised actual issues related to the usage of laboratory animals for scientific purposes in Russia.

Key words: Laboratory animals, preclinical studies, good laboratory practice.

Идея о возможности и необходимости использования животных в научных целях принадлежит ученым Древнего мира, в частности Аристотель выдвинул положение, что в строении внутренних органов человека многое неизвестно или вызывает сомнение, поэтому необходимо их изучать у животных, органы которых сходны с человеческими. Долгое время основным методом при выполнении исследований на животных была вивисекция, которая не имела никаких регламентирующих ограничений. Человечество стало задумываться об этических аспектах использования животных и их благополучии только в 19-ом веке. В 1824 году в Англии было создано «Общество для предотвращения жестокого обращения с животными» (The Society for the Prevention of Cruelty to Animals, SPCA), которое в 1840 году получило грамоту от королевы Виктории (ярой противницы вивисекции) и стало королевским (Royal SPCA, RSPCA). В 1865 году было создано «Российское общество покровительства животным», оно поддерживалось членами царской фамилии, царями Александром II, Александром III, Николаем II, и было под опекой императрицы Марии Федоровны. В 1866 году было создано «Американское общество для предотвращения жестокого обращения с животными», была также подготовлена и законодательно принята «Декларация прав животных», контроль за исполнением которой осуществляло это общество.

В 1875 году было организовано «Общество защиты животных от вивисекции». Члены этого общества выступали против вивисекции и против исследований с применением животных. Благодаря активным действиям участников движения по защите животных, в частности Фрэнсис Пауэр Кобб, в 1876 году в Англии был издан Закон о жестоком обращении с животными (The Cruelty to Animals Act). Основные положения этого закона остаются неизменными по настоящее время:

– Эксперименты должны выполняться в зарегистрированных местах, которые должны проверяться государственными инспекторами;

– Эксперименты должны проводиться лицами, имеющими государственную лицензию;

– Копии сертификатов, выданных на проведение экспериментов, должны быть направлены заявителем Государственному секретарю, который может в любое время запретить или приостановить действие сертификата;

– Эксперименты должны проводиться с целью получения новых знаний, которые будут полезны для сохранения или продления жизни, или облегчения страданий, как на прямую, так и опосредованно через тестирования;

– Животные на протяжении всего эксперимента должны быть под воздействием анестезии достаточной мощности, чтобы они не чувствовали боль;

– Животные должны быть убитыми, прежде чем они почувствуют боль по окончании эксперимента;

– Эксперименты могут быть выполнены без анестетиков, если они не вызывают боль и страдания;

– Эксперименты могут проводиться, как иллюстрации лекций, если они абсолютно необходимы для надлежащего инструктажа с целью приобретения знаний, которые пригодятся слушателям для сохранения или продления жизни, или облегчения страданий;

– Любое лицо, нарушившее этот Закон, подлежит штрафу или тюремному заключению.

В России этические аспекты использования животных получили отражение в трудах С.Фишера «Человек и животное. Этико-юридический очерк» (1899) и П.В. Безобразова «О правах животных» (1903). С.Фишер писал, что государство должно охранять интересы животных, эта охрана должна выразиться в правовых нормах, все животные заслуживают непосредственной уголовно-правовой охраны ради самих себя. П.В.Безобразов писал, что животные могут иметь юридические права, главное из которых — право на жизнь, из простого любопытства или ради своего развлечения мы не вправе доставлять страдания самому ничтожному живому существу.

На период подготовки и ведения мировых войн у человечества не было возможности заниматься этическими проблемами использования животных. Только в 1956 по инициативе Организации Объединенных Наций по вопросам образования, научных и культурных организаций (United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organizations, UNESCO), Совета международных организаций медицинских наук (Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS) и

Международного союза биологических наук (International Union of Biological Sciences, IUBS) был организован Международный Комитет по лабораторным животным (International Committee on Laboratory Animals, ICLA) как неправительственная организация с целью продвижения высоких стандартов качества лабораторных животных и ухода за ними. В 1979 ICLA был переименован в Международный Совет по науке лабораторных животных (International Council for Laboratory Animal Science, ICLAS). Ведущая задача ICLAS – это способствовать прогрессу в здоровье человека и животных, развивая и пропагандируя этические принципы использования лабораторных животных при проведении исследований. Большой вклад в формирование этических норм использования животных в научных целях внесли W.M.S. Russell и R.L. Burch, которые в своем труде «The Principles of Humane Experimental Technique» (1959) сформулировали принципы 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement). Они утверждали, что развитие методических подходов позволит заменить *in vivo* эксперименты на *in vitro*, кроме этого их усовершенствование обеспечит уменьшение количества животных в исследованиях, а также позволит снизить уровень дистресса у животных. В настоящее время эти принципы получили широкое применение.

Во второй половине 20-го века стали образовываться национальные научные ассоциации о лабораторных животных. Миссия этих ассоциаций – это развивать и пропагандировать этические принципы использования лабораторных животных при проведении исследований. В 1978 году европейские научные ассоциации о лабораторных животных объединились в федерацию (Federation of European Laboratory Animal Science Associations, FELASA). В России такая ассоциация была создана только в 2011 году, однако, она с 2013 года является членом ICLAS и с 2014 года входит в FELASA.

Активная деятельность научных ассоциаций о лабораторных животных способствовало развитию и совершенствованию законодательства в этой области. Например, в Директиве Евросоюза 2010/63/EU [7] определены области использования животных в научных целях:

– фундаментальные исследования;

– трансляционные или прикладные исследования, ставящие перед собой одну из следующих задач:

• профилактика, диагностика и лечение заболеваний, недомоганий или других патологий и их последствий у человека и животных;

• оценка, выявление, контроль и изменение физиологических состояний человека и животных;

• благосостояние животных и улучшение условий разведения сельскохозяйственных животных;

– для любых из указанных в подпункте выше целей при разработке, производстве или тестировании качества, эффективности и безопасности лекарств, пищевых продуктов и кормов, а также других веществ или продуктов;

– охрана окружающей среды в интересах здоровья и благополучия человека и животных;

– исследования, направленные на сохранение видов;

– высшее и среднее специальное образование или обучение с целью приобретения, сохранения и совершенствования профессиональных навыков;

– судебная экспертиза.

Важное значение для обеспечения высокого качества содержания и использования животных в биомедицинских исследованиях играет международная ассоциация по оценке и аккредитации использования лабораторных животных (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC). Исходно эта ассоциация была создана в США в 1965 году (American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care), и в 1996 году она получила международный статус. Эта ассоциация проводит аккредитацию организаций на добровольной основе путем инспектирования их программ по содержанию и использованию лабораторных животных. В настоящее время насчитывается около 1000 организаций, которые имеют AAALAC аккредитацию, из 44 государств, в РФ имеется только две аккредитованные организации.

В Программе по содержанию и использованию лабораторных животных, которая подается в AAALAC, описываются: каким образом осуществляется управление и контроль этой программой, среда обитания животных, ветеринарная помощь, помещения. Особое внимание уделяется описанию работы биоэтической комиссии. Обычно на био-

этическую комиссию возлагаются функции обеспечения благополучия животных:

– консультировать персонал, работающий с животными по вопросам, связанным с благополучием животных при их приобретении, размещении, уходе за ними и их использовании;

– консультировать персонал по вопросам применения принципа 3Rs (замещения, сокращения, усовершенствования) и информировать о технических и научных достижениях в этой сфере;

– разрабатывать и пересматривать внутренние операционные процессы мониторинга, отчетности и исполнения предписаний в отношении благополучия животных, содержащихся или используемых в организации;

– следить за развитием и результатами проектов, обращая внимание на благополучие животных, выявлять элементы, к которым впоследствии можно применить принципы 3Rs, и проводить соответствующие консультации.

В РФ работа с лабораторными животными осуществляется на основе следующих подзаконных актов: СанПиН 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» [6] и ГОСТов: ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными» [1]; ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами» [2]; ГОСТ 33217-2014 «Правила работы с лабораторными хищными млекопитающими» [3]; ГОСТ 33218-2014 «Правила работы с нечеловекообразными приматами» [4]; ГОСТ 33219-2014 «Правила работы с рыбами, амфибиями и рептилиями» [5]. Перечисленные документы в той или иной мере, опосредованно регулируют деятельность по использованию животных в научных целях, однако, очевидно, что ни объем, ни содержание этих документов не отвечает задачам правового регулирования всех аспектов обращения лабораторных животных.

Ситуация несколько изменилась в связи с введением в РФ национальной системы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) в качестве норматива при проведении докли-

нических исследований. Однако, во-первых, доклинические исследования – это важное, но далеко не единственное направление научного использования лабораторных животных, и, во-вторых, требования собственно к животным и условиям их содержания в нормативных документах GLP изложены в общих терминах.

Таким образом, недостаток законодательного регулирования в области использования лабораторных животных в научных целях остается для РФ актуален. С другой стороны, опыт стран, имеющих развитое законодательство в отношении научного использования лабораторных животных, имеет в том числе и негативную составляющую. Многие вопросы (например, исследования на приматах) зарегулированы так, что они приобретают неявный запретительный характер. Это положение необходимо будет учитывать при создании национального законодательства в этой области.

Литература

1. ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными» // Справочник «ГОСТы России».
2. ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами» // Справочник «ГОСТы России».
3. ГОСТ 33217-2014 «Правила работы с лабораторными хищными млекопитающими» // Справочник «ГОСТы России».
4. ГОСТ 33218-2014 «Правила работы с нечеловекообразными приматами» // Справочник «ГОСТы России».
5. ГОСТ 33219-2014 «Правила работы с рыбами, амфибиями и рептилиями» // Справочник «ГОСТы России».
6. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» // РГ. 2015. №24/1
7. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОПЫТ: УЛУЧШЕНИЕ КАЧЕСТВА ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЧЕРЕЗ ИННОВАЦИИ

Ковалевская С. Н.
ФГБУ ВО «ПервыйСанкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад.И.П. Павлова» МЗ России, Санкт-Петербург
kovalevskaya@labstory.ru

Резюме

Преаналитический этап лабораторных исследований остается главным источником ошибок лабораторной диагностики. Последняя конференция, организованная Рабочей группой по преаналитике Европейской Федерации по клинической химии и лабораторной медицины (WG-PA EFLM) проходила в Амстердаме 24-25 марта 2017 года под названием «Улучшение качества преаналитики через инновации». Внедрение инноваций на уровне системы здравоохранения (централизация, информационные технологии), на уровне врачей – клиницистов (управление назначениями), лабораторий (полная автоматизация), медицинских компаний (новые технологии), среднего медицинского персонала (обучающие программы, новое руководство по флеботомии) позволило уменьшить количество преаналитических ошибок, повысить эффективность лечебно-диагностических мероприятий.

Ключевые слова: преаналитический этап, инновации, качество, ошибки, информационные технологии

INTERNATIONAL EXPERIENCE: IMPROVING QUALITY IN THE PREANALYTICAL PHASE OF LABORATORY RESEARCHES THROUGH INNOVATION

Kovalevskaya S.N.
Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Russia

Abstract

Preanalytical phase of laboratory researches remains the main source of error of laboratory diagnostic. Last conference, organized by the Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PA) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) was held in Amsterdam, 24-25 March, 2017 under the name “Improving quality in the preanalytical phase through innovation”. Introduction of innovations at the level of the health system (centralization, IT-technology), at the level of clinicians (managing of test ordering), at the level of laboratories (total automation), at the level of medical company (new technology), at the level of medical nurses (education programs, new recommendation for the venous blood sampling) reduced the number of preanalytical errors and improved the efficiency of diagnostic and treatment activities.

Key words: preanalytical phase, innovation, quality, errors, IT -technology

В эпоху персонализированной медицины лабораторные исследования приобретают все большую актуальность для диагностики, прогноза и терапевтического мониторинга болезней человека. Не смотря на значительный прогресс, связанный с повышением уровня качества и безопасности на аналитическом этапе диагностического тестирования, остается много ошибок, связанных в основном с преаналитическим этапом лабораторных исследований, начиная с назначения теста и заканчивая получением и сопровождением биологического материала. [4]

Принимая во внимание эти факты, Европейская Федерация клинической химии и лабораторной медицины (EFLM) создала рабочую группу по преаналитике (WG-PRE), целью работы которой являлось

снижение уязвимости преаналитического этапа. Основная деятельность рабочей группы связана с публикацией документов, руководств и рекомендаций по стандартизации и гармонизации преаналитической работы, внедрением инноваций в области преаналитики в повседневную практику. Ключевыми направлениями работы группы стало, во – первых, распространение знаний о важности преаналитического этапа среди работников со средним медицинским образованием, лабораторных сотрудников, врачей – клиницистов и пациентов. Во-вторых, рабочая группа сфокусировалась на наиболее частых ошибках преаналитики: подготовке пациента к лабораторным исследованиям, направлении на исследование, получении образцов, идентификации пациентов и образцов, оценке вакуумных пробирок. [5]

За семь лет рабочая группа организовала четыре европейские конференции по преаналитике: в Парме, Загребе, Порто, последняя проходила в Амстердаме 24-25 марта 2017 года под названием «Улучшение качества преаналитики через инновации». Инновации рассматривались на конференции с разных точек зрения: системы здравоохранения, медицинских компаний, лабораторий, а также со стороны флеботомистов.

В систему здравоохранения активно внедряется практика централизации лабораторных услуг, что позволяет сократить время получения результата и увеличить пропускную способность лабораторий, помогает сократить затраты и увеличить эффективность работы медицинских организаций в целом. К крупным достижениям со стороны системы здравоохранения относится внедрение обучающих компьютерных программ для оценки и интерпретации лабораторных данных с использованием референсных интервалов и с учетом многих других индивидуальных и демографических характеристик.

Инновации со стороны врача клинициста связаны с управлением назначениями. В результате пятилетнего исследования немецких коллег во главе с профессором Георгом Хоффманом, в 2011 году появился учебник, включающий 80 алгоритмов проведения лабораторной диагностики в виде «дерева». И учебные пособия, и специальная компьютерная программа с электронным руководством назначениями дали много преимуществ: значительно сократилось количество ненужных,

неправильных тестов, улучшилось взаимопонимание лаборантов и клиницистов, повысилась эффективность диагностического процесса, существенно сократились расходы на лабораторные исследования.[3,6]

Инновации в лабораториях, по мнению профессора Питера Вермера (Бельгия), связаны с внедрением полной автоматизации (TLA –total laboratory automation) для рутинной биохимии и гематологии, иммунохимии, молекулярной биологии, инфекционной серологии, коагулологии, исследовании гликогемоглобина. Система дает возможность полностью контролировать вводы всех биоматериалов, определять объем, аликвотирование и хранение. Дальнейшее улучшение преаналитического рабочего процесса связано с такими дополнительными шагами, как внедрение электронных заявок с отделений, использование плазмы вместо сыворотки, сокращение времени центрифугирования (5 мин, 3000 оборотов).

Качество преаналитического этапа во многом связано с работой среднего медицинского персонала, особенно с проведением флеботомии – взятием венозной крови на лабораторные исследования. Флеботомия является основным источником ошибок на преаналитическом этапе, и она определяет не только результат исследования, но и безопасность пациента, и медицинского работника, который проводит процедуру. Решающее значение здесь имеют непрерывное образование медицинских сестер, формирование правильных навыков по взятию крови из вены. [1,2]

Европейская рабочая группа предложила новое руководство по флеботомии и план обучения медицинских сестер. Рабочая группа принимает во внимание, что в каждой европейской стране есть свои проблемы в области преаналитики, и она призывает национальные сообщества перевести на местный язык предложенные документы и адаптировать их в соответствии с национальными особенностями. [6]

Со стороны медицинских компаний инновации рассматриваются не просто как хороший дизайн продукта. Компания Бектон Дикинсон, например, при создании новых приспособлений для взятия биоматериала использует специальные анкеты, изучает потребности конечных пользователей непосредственно на рабочих местах, создает при апробации имитацию «реальной жизни» медицинских организаций. Ком-

пания предложила пробирки с новой технологией разделения крови для улучшения качества результатов исследований. Для комфорта и безопасности пациентов предложены ультратонкие иглы. Вводятся инновации и в сервисном обслуживании, когда внедрение нового продукта, обучение и постоянная поддержка пользователей проводится с использованием специальных компьютерных программ. Инновации от производителя создают для учреждения в целом и для каждого участника преаналитического этапа дополнительные преимущества.

Заключение: Международный опыт в улучшении качества преаналитического этапа лабораторных исследований связан с внедрением инноваций в медицинских организациях, лабораториях, медицинских компаниях, с управлением лабораторными процессами с помощью информационных технологий и с созданием эффективного взаимодействия между всеми вовлеченными в лабораторный процесс сторонами.

Литература

1. Simundic AM, Cornes M, Grankvist K, Lippi G, Nybo M, Kovalevskaya S, Sprongl L, Sumarac Z, Church S. Survey of national guidelines, education and training on phlebotomy in 28 European countries: an original report by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PA). Clin Chem Lab Med. 2013;51(8):1585-93.
2. Compliance of blood sampling procedures with the CLSI H3-A6 guidelines: An observational study by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) working group for the preanalytical phase (WG-PRE). Simundic AM, Church S, Cornes MP, Grankvist K, Lippi G, Nybo M, Nikolac N, van Dongen-Lases E, Eker P, Kovalevskaya S, Kristensen GB, Sprongl L, Sumarac Z. Clin Chem Lab Med. 2015 Aug;53(9):1321-31
3. Lippi G, Brambilla M, Bonelli P, Aloe R, Balestrino A, Nardelli A, Ceda GP, Fabi M. Effectiveness of a computerized alert system based on re-testing intervals for limiting the inappropriateness of laboratory test requests. Clin Biochem. 2015 Jun 11. Doi: 10.1016/2015.06.006.
4. Lippi G, Banfi G, Church S, Cornes M, De Carli G, Grankvist K, Kristensen GB, Ibarz M, Panteghini M, Plebani M, Nybo M, Smellie S, Zaninotto M, Simundic AM; Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

(EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE).Clin Chem Lab Med. 2015;53(3):357-70.
5. Plebani M, Astion ML, Barth JH, Chen W, de Oliveira Galoro CA, Escuer MI, Ivanov A, Miller WG, Petinos P, Sciacovelli L, Shcolnik W, Simundic AM, Sumarac Z. Harmonization of quality indicators in laboratory medicine. A preliminary consensus. Clin Chem Lab Med. 2014;52(7):951-8.
6. Lippi G, Geoffrey SD, Banfi G, Bolenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, Dancey A, Guillon A, Hoffmann G, Nibo M, Premawardhana LD, Salinas M, Sandberg S, Slingerland R, Stancovic A, Sverresdotter SM, Vermeersch P, Simundic AM; Improving quality in the preanalytical phase through innovation, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE).Clin Chem Lab Med. 2017;55(4):489-500.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЯДРЫШКОВОГО БЕЛКА НУКЛЕОФОЗМИНА И ОНКОГЕНА C-MYC В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРИ ЛИМФОМЕ БЕРКИТТА

Букаева И.А., Райхлин Н.Т., Пробатова Н.А., Валиев Т.Т., Смирнова Е.А., Шабанов М.А.

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия
box9939@mail.ru

Резюме

Исследованы 12 случаев спорадической лимфомы Беркитта с транслокацией гена *c*-MYC t(8;14)(q24;q32) , охарактеризованных в соответствии с требованиями классификации ВОЗ. При иммуногистохимическом исследовании во всех случаях были зарегистрированы гиперэкспрессия нуклеофозмина и высокие показатели индекса Ki-67, отражающие высокую пролиферативную активность опухолевых клеток, усиливающуюся действием *c-MYC*. Нуклеофозмин и c-MYC регулируют онкогенную активность, как непосредственно вступая в взаимодей-

ствие, так и включаясь в NPM- c-MYC и PI3K/Akt онкогенные сигнальные пути.

Ключевые слова: лимфома Беркитта , нуклеофозмин, c-MYC, PI3K/Akt сигнальный путь.

RELATIONSHIP BETWEEN THE NUCLEOLAR PROTEIN NUCLEOPHOSMIN AND ONCOGENE C-MYC IN THE REGULATION OF THE CELL PROLIFERATION AND MALIGNANT TRANSFORMATION IN BURKITT'S LYMPHOMA

Bukaeva I.A., Raikhlin N.T., Probatova N.A.,ValievT.T., Smirnova E.A., Shabanov M.A.

"N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

box9939@ mail.ru

Abstract

The study comprised 12 cases of sporadic Burkitt's lymphoma with translocation of the *c-MYC* gene t(8;14)(q24;q32). The lymphomas have been diagnosed according to the WHO classification. The immunohistochemical study showed of nucleophosmin overexpression and high level of Ki-67 index revealing high rates of tumor cell proliferation that also is regulated by c- MYC.Nucleophosmin interacts directly with c-MYC to regulate oncogenic activity and at the same time nucleophosmin and c-MYC , involving in NPM-c-MYC and PI3K/Akt signaling pathways, increase hyperproliferation and transformation.

Key words: Burkitt's lymphoma, nucleophosmin, c-MYC, PI3K/Akt pathway.

Введение. Лимфома Беркитта (ЛБ) является неходжкинской злокачественной лимфомой, развивающейся из зрелых клеток зародышевых центров лимфоидных фолликулов. Фолликулярное происхождение ЛБ подтверждается иммунофенотипом опухолевых клеток, которые явля-

ются CD10/CD20/BCL6/IgM-позитивными. ЛБ характеризуется высокой пролиферативной активностью, сочетающейся с активным апоптозом.

ЛБ существует в трех клинических формах: эндемическая, спорадическая и ЛБ, ассоциированная с иммунодефицитом, связанным с ВИЧ-инфекцией и развившимся в результате трансплантации органов. Эндемическая ЛБ распространена в экватериальной Африке, где составляет ½ всех лимфом у детей. Спорадическая ЛБ наблюдается во многих странах мира, преобладая у лиц первых двух декад жизни [1, 2].

Для всех трех форм ЛБ характерны генетические нарушения, связанные с транслокациями между геном *c-MYC* и генами тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. В 80% случаев наблюдается транслокация t(8;14)(q24;q32), связанная с перестройкой локусов генов *c-MYC* (8q24) и тяжелых цепей IgH (14q32). Реже встречаются вариантные транслокации с вовлечением локусов легких цепей иммуноглобулинов. В 15% случаев выявляется транслокация t(8;22)(q24;q11) с участием локуса λ-цепи иммуноглобулинов и в 5%) транслокация t(2;8)(p11;q24) с участием локуса к-цепи иммуноглобулинов. В результате этих хромосомных транслокаций ген c-MYC переходит под контроль мощных промоторов иммуноглобулиновых генов, что приводит к образованию белка, обладающего трансформирующим онкогенным потенциалом и играющего ключевую роль в патогенезе ЛБ.[1,10].

Однако, как полагают, только перестройка гена *c-MYC* не является достаточной для опухолевой трансформации и представляет собой лишь инициирующее событие. Для завершения лимфомагенеза необходим ряд дополнительных факторов, в том числе мутации *c-MYC*, большинство из которых затрагивают функциональные домены *c-MYC*, что приводит к повышению его онкогенного потенциала через разные механизмы, включая повышение стабильности белка и усиление его транскрипционной и трансформирующей активностей [7, 9].

Существенную роль в регуляции онкогенной активности c-MYC играет ядрышковый белок нуклеофозмин, который в условиях сверхэкспрессии взаимодйствует с c-MYC и усиливает индуцированную им пролиферативную и трансформирующую активность [4,5,6,].

Целью работы являлось исследование экспрессии ядрышкового белка нуклеофозмина (NPM) в клетках спорадической лимфомы Бер-

китта (ЛБ) и анализ путей его взаимодействия с c-MYC и компонентами онкогенного сигнального пути PI3K/Akt, играющего существенную роль в патогенезе ЛБ.

Методы исследования. Диагноз ЛБ устанавливали на основании морфологических и цитогенетических исследований в соответствии с требованиями классификации ВОЗ. Для выявления транслокаций t(8;14)(q24;q32), характерных для ЛБ, проведено цитогенетическое исследование с использованием ДНК-зондов Dual Color Break-apart LSI MYC, Dual Fusion IGH/MYC:CEP 8,Vysis. Иммуногистохимическое исследование NPM проводили с применением моноклональных антител (фирма "EPITOMICS", клон EPI1848 Y). Иммуногистохимическую реакцию оценивали как умеренную (++), высокую (+++) и очень высокую (++++). Количество клеток с разной интенсивностью реакции выражали в процентах.

Для полной характеристики пролиферативной активности опухолевых клеток наряду с исследованием экспрессии NPM, характеризующего скорость клеточной пролиферации, проводили исследование экспрессии антигена Ki-67, отражающего количество пролиферирующих клеток. Исследование проводили с использованием антител к антигену Ki-67 (фирма "Dako", клон MIB-1). Результат реакции оценивали в 500 клетках и определяли процент окрашенных клеток

Результаты и их обсуждение. Во всех исследованных ЛБ наблюдалась характерная транслокация с участием тяжелых цепей иммуноглобулинов t(8;14)(q24;q32). Опухолевый субстрат был представлен диффузным разрастанием небольших или средних размеров клеток с округлыми ядрами с глыбчатым хроматином, содержащими 2-5 ядрышек и узким ободком пиронинофильной или базофильной цитоплазмой. Клетки плотно прилегали друг к другу, создавая в гистологическом препарате темный фон, на котором располагались многочисленные макрофаги с широкой светлой цитоплазмой, содержащей апоптотические опухолевые клетки.

В большинстве опухолевых клеток (в 80%) наблюдалась гипервысокая экспрессия NPM. В 15% клеток ЛБ зарегистрирована высокая экспрессия белка и в 5% клеток экспрессия была умеренной. Экспрессия NPM наблюдалась в ядрышке и в нуклеоплазме, при этом наиболее

интенсивная экспрессия отмечалась в ядрышках. Иммуногистохимическое исследование антигена Ki-67 установило, что индекс Ki-67 в ЛБ в среднем составлял 97,8±0,84% и находился в пределах 95-100%.

Гиперэкспрессия NPM, регистрируемая в ядрах и ядрышках ЛБ, свидетельствует об интенсивном биогенезе рибосом и активном синтезе белков в клетках ЛБ, а также о высокой пролиферативной активности опухолевых клеток. Усиленной клеточной пролиферации также способствует активированный в клетках ЛБ c-MYC, стимулируя циклин D, транскрипционный фактор E2F и циклин-зависимые киназы (CDK4) и вместе с тем подавляя гены, блокирующие клеточный цикл (p27, p15, p21, p57 и GADD45) [10]. Вместе с тем в условиях сверхэкспрессии NPM и c-MYC, постоянно удерживая клетки в митотическом цикле, приводят к резкому увеличению пролиферативного пула ЛБ, что подтверждается высокими значениями индекса Ki-67, который в наших наблюдениях достигал 95-100%. Таким образом, в клетках ЛБ в результате гиперэкспрессии NPM и постоянно высокой активности c-MYC создаются условия для неконтролируемой клеточной пролиферации.

Известно, что нарушение регуляции c-MYC и его высокая экспрессия, вызванные транслокацией t(8;14), не являются достаточными для полной злокачественной трансформации и для завершения процесса необходимы дополнительные факторы, что объясняется нестабильностью молекулы c-MYC, необходимостью преодоления ингибирующего действия физиологического репрессора BCL6 и подавления апоптотической программы, индуцируемой c-MYC [7,8,9,10].

Одним из таких факторов является белок NPM, который играет существенную роль в стимуляции онкогенной активности c-MYC. Присоединяясь к c-MYC и функционируя как кофактор, NPM стимулирует c-MYC- индуцируемые гиперпролиферацию и трансформацию, а также стимулирует активность генов-мишеней c-MYC [5,6]. Являясь молекулярным шапероном и перемещая c-MYC в ядрышко , NPM стимулирует регулируемую c-MYC транскрипцию рибосомных генов и последующие стадии биогенеза рибосом и синтеза белка, необходимого для роста клеток [6]. NPM в клетках ЛБ может осуществлять онкогенное действие через c-MYC зависимые пути и образуя NPM-c-MYC онкогенный путь, включается в молекулярные механизмы, через которые c-MYC

активирует гены-мишени, регулирующие пролиферативную активность, трансформацию, репликацию и апоптоз [4]. В условиях сверхэкспрессии NPM контролирует функции c-MYC, используя два разных пути: путь стимуляции онкогенной активности при непосредственном взаимодействии с c-MYC, действуя как кофактор и путь повышения трансформирующей активности c-MYC в результате подавления p53-зависимого и p53-независимого c-MYC- индуцированного апоптоза [5].

Одним из проявлений онкогенных свойств NPM и c-MYC является их способность включаться в механизмы активации PI3K/Akt онкогенного пути, играющего важную роль в патогенезе ЛБ [10]. Активированный c-MYC включается в регуляцию экспрессии кластера генов малых интерфирирующих РНК mir-17-92, ключевой компонент которых mir-19 подавляет активность фосфатазы PTEN, являющейся антагонистом фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и ее эффекторной молекулы Akt [9,10]. В результате активированная Akt фосфорилирует ряд эффекторных молекул, включая MDM2, GSK3ß, FOXO, BAD, каспазу-9, p21, p27, mTOR, регулирующих рост и пролиферацию клеток, их выживаемость, миграцию и дифференцировку [10]. Кроме того NPM может непосредственно взаимодействовать с Akt, образуя комплекс NPM-Akt, через который Akt осуществляет онкогенное действие.

Заключение. В клетках спорадической лимфомы Беркитта с транслокацией t(8;14)(q24;q32) выявлены высокая экспрессия белка нуклеофозмина и высокие значения индекса Ki-67, который достигал 95-100%. Усиленная клеточная пролиферация могла быть связана с действием активированного в клетках лимфомы онкогена c-MYC и являться одним из механизмов агрессивного течения лимфомы. Взаимодействия нуклеофозмина и c-MYC осуществляются по принципу положительной обратной связи. C-MYC, транскрипцинной мишенью которого является нуклеофозмин, способствует высокой экспрессии нуклеофозмина. В свою очередь нуклеофозмин, непосредственно связываясь с c-MYC и действуя как кофактор, играет существенную роль в стимуляции индуцированной c-MYC пролиферативной и трансформирующей активности, а также контролирует активность его генов-мишеней. Усиливая действия друг друга нуклеофозмин и c-MYC вовлекаются в активацию PI3K/Akt онкогенного сигнального пути. Эти данные вносят вклад в по-

нимание повышенной агрессивности лимфомы Беркитта и позволяют оценить роль нуклеофозмина и c-MYC в патогенезе лимфомы Беркитта.

Литература

1. Валиев Т.Т., Барях Е.А. Эволюция взглядов на диагностику и лечение лимфомы Беркитта / / Клиническая онкогематологи-2014.-Т.7, N1.-С.46-56.
2. Пробатова Н.А. Морфологические особенности лимфом в классификации ВОЗ (В-клеточные опухоли) // Руководство по иммунологической диагностике опухолей человека / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина.- Казань, 2012.-С.274-282.
3. Grisendi S., Mecucci C., Falini B. , Pandolfi P.P. Nucleophosmin and cancer // Nature Reviews Cancer.-2006.-V.6.-P.493-505.
4. Kim J.Y.,Cho Y.E., Park J.H.The nucleolar protein GLTSCR2 is an Upstream negative regulator of the oncogenic Nucleophosmin-MYC axis //Am. J. Pathology.-2015.-V.185, N7.-P.2061-2068.
5. Li Z., Boone D., Hann S.R. Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation //PNAS.-2008.-V.105, N.48.- P.18794-18799.
6. Li Z., Hann S.R. Nucleophosmin is essential for c-Myc nucleolar localization and c-Myc-mediated rDNA transcription // Oncogene.-2013.-V. 32, N 15.-P.1988-1994.
7. Ott G., Rosenwald A., Campo E. Understanding *MYC*-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification //Blood.-2013.-V.122,N24.-P.3884-3891.
8. Sander S.,Calado D.P., Srinivasan L., Kochert K., Zhang B., Rosolovski M., Rodig S., Holzmann K., Stilgenbauer S., Siebert R., Billinger L.,and Rajewsky K.Synergy between PI3K signaling and in Burkitt lymphomagenesis // Cancer Cell.-2012.-V.22,N2.-P.167-179.
9. Schmitz R., Young R.M., Ceribelli M. et al. Burkitt lylmphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics //Nature.-2012.-V.490, N 7418.-P.116-120.
10. Spender L.C., Inman G.J. Developments in Burkitt´s lymphoma: novel cooperations in oncogenic MYC signaling //Cancer Management and Research.-2014.-6.-P.27-38.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РИСКА ФОРМИРОВАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОЙ ПАТОЛОГИИ У ЖИТЕЛЕЙ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Викторова Т.В.[1, 2], Данилко К.В.[1], Корытина Г.Ф.[2], Измайлова С.М.[1], Ахмадишина Л.З.[2], Кочетова О.В.[2], Целоусова О.С.[2], Исхакова Г.М.[1], Каримов Д.О.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Уфа, России;

[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия

t_vict@mail.ru

Резюме

Цель работы заключалась в поиске взаимосвязи между вариантами генетического полиморфизма и индивидуальной предрасположенностью к развитию экологически обусловленной патологии у населения Республики Башкортостан. Молекулярно-генетические исследования проведены у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, хроническими бронхо-легочными заболеваниями у детей, раком мочевого пузыря, хроническим лимфолейкозом и в соответствующих группах сравнения (практически здоровые индивиды). На образцах ДНК, выделенных из лимфоцитов периферической венозной крови, методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК и рестрикционного анализа изучены полиморфные локусы генов-кандидатов: биотрансформации ксенобиотиков, антиоксидантов, цитохрома Р450, матриксных металлопротеаз, медиаторов воспаления и некоторых онкогенов. Выявлены молекулярно-генетические маркеры, ассоциированные с повышенным риском развития хронической обструктивной болезни легких, хронических бронхо-легочных заболеваний у детей, рака мочевого пузыря и хронического лимфолейкоза. Показана роль

генетического полиморфизма в связи с клиническими формами, тяжестью течения и эффективности терапии.

Ключевые слова: гены-кандидаты, полиморфные локусы, ассоциация, хроническая обструктивная болезнь легких, хронические бронхо-легочные заболевания у детей, рак мочевого пузыря, хронический лимфолейкоз.

Abstract

The aim of our study was to find the relationship between variants of genetic polymorphisms and individual predisposition to the environmental pathology in the Bashkortostan population of Russia. Molecular genetic studies were carried out in patients with chronic obstructive pulmonary disease, chronic broncho-pulmonary diseases in children, bladder cancer, chronic lymphocytic leukemia and in the respective comparison groups (healthy individuals). Polymorphic loci of candidate genes: biotransformation of xenobiotics, antioxidants, cytochrome P450, matrix metalloproteases, mediators of inflammation and some oncogenes were studied on DNA samples isolated from lymphocytes of peripheral venous blood, by polymerase chain reaction of DNA synthesis and restriction analysis. Molecular genetic markers associated with an increased risk of developing chronic obstructive pulmonary disease, chronic bronchopulmonary diseases in children, bladder cancer, and chronic lymphocytic leukemia have been identified. The role of genetic polymorphism in connection with clinical forms, the severity of the course and the effectiveness of therapy is shown.

Key words: gene-candidate, polymorphic loci, association, chronic obstructive pulmonary disease, chronic broncho-inflammation of the fetus, cancer of the urinary bladder, chronic lymphoeleicosis

Введение. Поиск генетических маркеров индивидуальной предрасположенности к клиническим формам заболеваний, вариантам течения и эффективности терапии является одним из актуальных направлений развития персонализированной медицины. Понимание природы многофакторных заболеваний человека во многом зависит от выявления особенностей генома, создающих предпосылки для

формирования патологического фенотипа [1]. Одним из наиболее информативных подходов к выявлению генетических маркеров является молекулярно-генетический анализ генов-кандидатов, продукты которых вовлечены в патогенез многофакторного заболевания [2].

Цель работы заключалась в поиске взаимосвязи между вариантами генетического полиморфизма и индивидуальной предрасположенностью к развитию экологически обусловленной патологии у населения Республики Башкортостан.

Материалы и методы исследования. Молекулярно-генетические исследования проведены у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, ХОБЛ (N=391), хроническими бронхо-легочными заболеваниями у детей, ХБЛЗ (N=257), раком мочевого пузыря, РМП (N=300), хроническим лимфолейкозом ХЛЛ (N=124) и в соответствующих группах сравнения (практически здоровые индивиды, N=1346). Материалом для исследований служили образцы ДНК, полученные от пациентов с установленными диагнозами стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [3]. Анализ полиморфных локусов генов-кандидатов проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК (ПЦР), ПДРФ-анализа (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов). Исследования проводились в ЦНИЛ, лаборатории клеточных культур и на кафедрах БГМУ. Анализ уровня экспрессии проводили методом мультиплексной (ПЦР) с детекцией в реальном времени.

Статистическую обработку результатов осуществляли методами непараметрической статистики с использованием программы SNPStats. Для изучения распределения частот генотипов и аллелей использовали метод χ^2 и метод Фишера. Для изучения равновесного распределения частот генотипов в исследуемых выборках использовали формулу Харди-Вайнберга. Различия между сравниваемыми группами считали достоверными при $p>0,05$.

Результаты и их обсуждение. При анализе полиморфных локусов генов системы цитохрома Р450, ферментов биотрансформации ксенобиотиков, антиоксидантной защиты, системы протеолиза и медиаторов воспаления выявлены генетические маркеры, ассоциированные с предрасположенностью к ХОБЛ и ХБЛЗ, а также с повышенным риском ранней манифестации ХОБЛ, тяжестью течения и развитием осложнений в виде эмфиземы легких.

Нами проведено изучение генов ключевых систем онкогенеза при раке мочевого пузыря (РМП). При анализе 25 полиморфных локусов, ассоциированных с риском развития РМП, для 10 полиморфных локусов выявлены генотипы повышенного риска развития заболевания. Молекулярно-генетическими маркерами предрасположенности к развитию РМП являются полиморфные варианты генов CYP1A1 (rs1048943), CYP1A2 (rs35694136), ARNT (rs2228099), XRCC1 (rs25487, rs25489), MMP2 (rs2285053). Установлены генетические маркеры риска развития РМП и мышечно-инвазивной формы заболевания. Маркерами развития неблагоприятной мышечно-инвазивной формы РМП являются полиморфные локусы генов CYP1A1 (rs1048943), CYP1A2 (rs35694136), GSTP1 (rs1695), XRCC1 (rs25487). Генетическими маркерами прогноза риска лимфогенного метастазирования РМП являются полиморфные локусы генов CYP1A1 (rs1048943), CYP1A2 (rs35694136; rs762551), GSTP1 (rs1695); AHR (c.1661G>A); MMP2 (rs2285053) и MMP9 (rs17576) [4].

В результате исследования выявлены маркеры повышенного риска развития хронического лимфолейкоза. Установлено, что генотип GG полиморфного локуса 309T>G гена MDM2 является прогностическим маркером агрессивной формы хронического лимфолейкоза. Проведен корреляционный анализ вариантов генетического полиморфизма с кривыми выживаемости при ХЛЛ. Показано, что с худшим прогнозом выживаемости ассоциированы генотип GG убиквитин-зависимой лигазы белка p53 *MDM2(*309T>G) и генотип AG фактора некроза опухолей альфа TNFa(-308G>A) [5]. Для 6 генов изучен уровень экспрессии и выявлено существенное снижение уровня экспрессии для гена p53 – известного супрессора опухолевого роста. Напротив, для генов убиквитин-зависимой лигазы белка p53 (MDM2), фактора некроза опухолей альфа (TNFa) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) установлено увеличение уровня экспрессии при ХЛЛ. Изучено распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов у больных хроническим лимфолейкозом в зависимости от ответа на химиотерапию. Показано, что положительный ответ на химиотерапию FC и FCR наблюдается у пациентов с гомозиготным генотипом CC локуса фактора роста эндотелия сосудов VEGF, в то же время отсутствие ответа на химиоте-

рапию при ХЛЛ наблюдается у пациентов с генотипами CT и TT локуса фактора роста эндотелия сосудов VEGF [6]. У больных ХЛЛ было показано увеличение уровня экспрессии генов MDM2, VEGF и снижение уровня экспрессии гена TP53.

Результаты наших исследований позволяют не только оценить роль генетических полиморфизмов в формировании экологически обусловленных заболеваний, но и разработать принципы молекулярного скрининга в качестве важного прогностического теста для выделения групп повышенного и высокого генетического риска. Это будет существенным шагом к развитию персонализированной медицины, как одного из основных направлений Молекулярной Медицины XXI века.

Выводы.

1. Выявлены молекулярно-генетические маркеры, ассоциированные с повышенным риском развития хронической обструктивной болезни легких, хронических бронхо-легочных заболеваний у детей, рака мочевого пузыря и хронического лимфолейкоза.
2. Показана роль генетического полиморфизма в связи с клиническими формами, тяжестью течения и эффективности терапии.

Литература

1. Пузырев В.П., Фрейдин М.Б. Генетический взгляд на феномен сочетанных заболеваний человека //*Acta Naturae*. – 2009. – V.3. P. 57–63.
2. Иванов В.И. Геномика – медицине / Под ред. В. И. Иванова и Л. Л. Киселева – М.: Академкнига, 2005. – 392 с.
3. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. Methods // Mol Biol. – 1985. – V.2. – P.31–34.
4. Способ прогнозирования развития рецидивного инвазивного рака мочевого пузыря // Патент РФ на изобретение № 2393772. Опубликовано 10.07.2010.
5. Способ прогнозирования «тлеющей» формы хронического лимфолейкоза // Патент РФ на изобретение № 2496110. Опубликовано 20.10.13.
6. Способ прогнозирования Способ прогнозирования ответа на химиотерапию при хроническом лимфолейкозе // Патент РФ на изобретение № 2495427. Опубликовано 10.10.13.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА АСЦИДИИ *HALOCYNTHIA AURANTIUM* НА РАЗВИТИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА

Пономарева Т.И, Добряков Ю.И., Добряков Е.Ю.
ФГБУН Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток, Россия
pti.50@yandex.ru

Резюме

Исследовали действие экстракта из асцидии пурпурной *Halocynthia aurantium* (ЭА) на оксидантную и антиоксидантную активности крови крыс при моделировании хронического токсического гепатита введением тетрахлорметана. Показано, что применение ЭА на фоне продолжающейся интоксикации ксенобиотиком способствовало значительному снижению уровня малонового диальдегида в эритроцитах, стимулировало антиоксидантную активность крови и нормализовало состояние печени. Гепатопротекторное действие ЭА сопоставимо с эффектом эссенциале.

Ключевые слова: экстракт асцидии *Halochynthia aurantium,* гепатит, тетрахлорметан, оксид азота, малоновый диальдегид

INFLUENCE OF THE HALOCYNTHIA AURANTIUM ASYCIDA EXTRACT ON DEVELOPMENT OF CHRONIC TOXIC HEPATITIS

Ponomareva T.I., Dobryakov Yu.I., Dobryakov E.Yu.
V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute Far Eastern Branch RAS, Vladivostok, Russia

Abstract

The effect of the extract from ascidia *Halocynthia aurantium* (EA) on oxidative and antioxidant activity of rat blood during the modeling of chronic toxic hepatitis by the introduction of carbon tetrachloride. It was shown

that administration of EA on the background of continuing intoxication with xenobiotic promoted to the significant decrease in the level of malonic dialdehyde in erythrocytes, stimulated the antioxidant activity of the blood and normalized the liver. The hepatoprotective effect of EA is comparable to the effect of essential.

Key words: extract of ascidia Halochynthia aurantium, hepatitis, carbon tetrachloride, nitric oxide, malonic dialdehyde

Введение. Ухудшение экологической обстановки, в частности, растущее загрязнение окружающей среды химическими веществами приводит к росту гепатопатологии среди населения, поскольку основным барьером, нейтрализующим токсические продукты в организме человека и животных, является печень. Несмотря на определенные успехи в создании фармакологических средств, повышающих резистентность печени к действию химических агентов и нормализующих ее метаболизм в условиях напряжения детоксицирующей функции, вопрос создания препаратов с подобными свойствами, по-прежнему актуален. В последние десятилетия внимание исследователей привлекают морские биологические ресурсы, отдельные представители которых являются богатым источником биологически активных веществ. Фармакологические эффекты экстракта из тканей *Halochynthia aurantium* связаны с содержащимися в них соединениями, обладающими разносторонней биологической активностью, в том числе стресс-протективной, антиоксидантной, антитоксической, гемостимулирующей, а также иммуномодулирующим действием [1,6,7]. Наличие в экстракте незаменимых, аминокислот, фосфолипидов, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, каротиноидов, простагландинов, микро- и макроэлементов [4] позволяет считать перспективным создание на его основе нового эффективного гепатопротекторного препарата.

Целью работы явилось изучение эффектов экстракта из асцидии *Halocynthia aurantium* (ЭА) на показатели оксидантной и антиоксидантной активности периферической крови крыс при экспериментальном хроническом гепатите.

Методы исследования. Эксперименты проведены в зимний период на крысах линии Вистар (32 особи массой 220 ± 10 г, самцы), содер-

жащихся в виварии на стандартной диете и свободном доступе к воде и пище при естественном световом режиме, и температуре 20-22^0. Было сформировано 4 группы по 8 животных: 1-я группа – интактные крысы; животным 2 – 4-ой групп в течение 4 недель дважды в неделю внутрибрюшинно вводили тетрахлорметан (ТМ) в виде 50% раствора в оливковом масле в дозе 1,0 мл/кг массы. [3]. Крысы 3-ей и 4-ой групп, начиная со дня введения ТМ, получали перорально три раза в неделю лечение: группа 3 – ЭА (35 мг/кг), группа 4 – препарат сравнения эссенциале Н («Sanofi-Aventis», Германия 75 мг/кг), животные группы 2 аналогичным образом получали физиологический раствор. ЭА – комплекс биологически активных веществ, основными структурными компонентами которого являются фосфолипиды, свободные аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты n-3, каротиноиды [4], доза 35 мг/кг составляет 1/100 $ЛД_{50}$. Исследования с использованием животных проведены в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Протокол исследования согласован с этическим комитетом ТОИ ДВО РАН. Животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом на 15-е и 30-е сутки.

Степень жировой дистрофии печени определяли по 5-балльной шкале [3]. Малоновый диальдегид (МДА) определяли в эритроцитах [5] и плазме крови [3]. Для определения в сыворотке крови уровня азота (NO), общей оксидантной (ООА) и общей антиоксидантной активности (ОАА) применяли колориметрический метод [5], модифицированный в лаборатории неспецифического иммунитета ТИБОХ ДВО РАН. Для оценки ООА в качестве красителя использовали пигмент плоского морского ежа – эхинохром, ОАА измеряли по разрушению окислителя эхинохрома – хлорамина В. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ STATISTICA для Windows.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований показано, что на 15 сутки токсического воздействия в плазме крови животных (группа ТМ), отмечалась тенденция к снижению уровня МДА, которая сохранялась до 30 суток. Под влиянием ЭА через 2 недели понижение концентрации МДА было достоверным по сравнению

с группой интактного контроля (p<0,05), а к 30 суткам этот показатель восстанавливался до контрольных значений. Концентрация МДА в эритроцитах животных группы ТМ также имела тенденцию к снижению, которая сохранялась и к 30 суткам. Под влиянием ЭА на 15 сутки этот показатель был на уровне контроля и достоверно снижен к концу эксперимента, также, как и в группе сравнения ТМ+эссенциале (p<0,05).

Значения ООА на 15 сутки существенно не отличались от показателей контрольных крыс во всех экспериментальных группах. Вместе с тем, к 30 суткам в группе с экстрактом зарегистрировано достоверное снижение этого показателя (p<0,05), как по отношению к животным получающим только ТМ, так и к интактным животным.

ОАА через 14 суток эксперимента была повышена в 1,2 раза в экспериментальных группах (ТМ и ТМ + ЭА). К 30 суткам под влиянием ЭА рост ОАА был достоверен (p<0,01) по сравнению с контрольными и животными группы ТМ.

Тенденция к росту уровня оксида азота (NO) зарегистрирована через 2 недели во всех группах, которая сохранялась до конца эксперимента в группе ТМ+ эссенциале, при достоверном росте в группе ТМ (в 1,4 раза). У животных под влиянием ЭА к 30 суткам уровень NO нормализовался.

Уровень свободных радикалов через 2 недели эксперимента во всех группах имел тенденцию к снижению по сравнению с интактными крысами, а к 30 суткам не отличался от контроля.

Таким образом, результаты о содержании МДА в плазме и эритроцитах, уровне свободных радикалов и ООА свидетельствуют, что ТМ не оказывал достоверного влияния на активность перекисного окисления липидов (ПОЛ). Также незначительным было влияние токсиканта и на ОАА. По-видимому, это связано со слабой выраженностью повреждений в печени в данном эксперименте по сравнению с контрольными животными. По данным гистологического исследования у контрольных крыс была зарегистрирована слабая жировая дистрофия печени, и умеренная – при действии ТМ. Известно, что уровень ПОЛ зависит от степени выраженности патологического процесса

[8], и его максимальное увеличение отмечается при тяжелой степени гепатитов. Также показано, что наряду с развивающимися патологическими процессами в печени при хроническом токсическом гепатите

протекают регенерационные процессы, от которых зависит восстановление и поддержание функций пораженной печени [10].

Известно, что оксид азота является одним из ранних провоспалительных медиаторов, запускающих целый ряд патологических процессов. Показано, что ТМ вызывал достоверный рост концентрации NO по сравнению с его уровнем в контроле (в 1,4 раза). Сравнение различных показателей, характеризующих оксидантно-антиоксидантную систему крови крыс в эксперименте, свидетельствует, что рост NO является наиболее достоверным показателем изменений в этой системе. Это предположение согласуется с данными о корреляции уровня оксида азота и выраженностью повреждений печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С [9]. Повышение уровня NO в случае умеренно выраженного гепатита в данной работе, по-видимому, является компенсаторным и сопровождается снижением МДА в эритроцитах, и вероятно, в гепатоцитах [2]. При умеренных гепатитах оксид азота может снижать активность ПОЛ, поскольку известно, что с развитием окислительного стресса он может выступать в роли как про-, так и антиоксиданта [9].

Применение ЭА на фоне изменений, развивающихся у животных под влиянием ТМ, способствовало достоверному росту антиоксидантной активности, ограничивая процессы ПОЛ. Обращают на себя внимание значительные изменения уровня МДА в эритроцитах леченых животных, поскольку существует прямая корреляция между изменениями свойств мембран эритроцитов и цитоплазматических мембран гепатоцитов [10]. Через 30 суток от начала эксперимента концентрация МДА в этих группах, была достоверно снижена по сравнению с контрольными животными. Причем, под влиянием ЭА даже более значительно, чем в группе, получающей эссенциале. При этом уровень жировой дистрофии под действием ЭА и эссенциале снижался до уровня контроля. Таким образом, снижение уровня МДА в эритроцитах и сыворотке при применении ЭА, по-видимому, отражает процессы стабилизации мембран гепатоцитов. Следует отметить, что ЭА является уникальным препаратом, представляющим собой сложную композицию природных веществ, биологические свойства которых могут дополнять друг друга. Так, жирнокислотный состав фосфолипидов экстракта асци-

дии отличается высокой степенью ненасыщенности и содержит в своем составе ПНЖК семейства n-3, необходимые для преобразования лизофосфолипидов в основные структурные компоненты мембран [1,4]. Каротиноиды же, входящие в состав экстракта, обладают антиоксидантной и мембранотропной активностью, способны связываться с фосфолипидами и стабилизировать структуру мембран [6], аминокислоты могут быть охарактеризованы как стимуляторы регенерации паренхимы печени.

Заключение. Таким образом, применение ЭА при развитии экспериментального хронического ТМ-гепатита сопровождалось выраженным гепатозащитным действием, которое проявлялось в ограничении ПОЛ и нормализации морфофункционального состояния печени. Восстановительное действие ЭА по некоторым показателям оказалось более эффективным по сравнению с таковым у препарата сравнения эссенциале. По мнению авторов, основной причиной наблюдаемых различий является то, что биологической активности полиненасыщенного фосфатидилхолина из соевых бобов, входящего в состав эссенциале, противопоставлен многокомпонентный комплекс биологически активных соединений экстракта *Halocynthia aurantium.*

Авторы выражают благодарность старшему инженеру Стасенко Н.Я. за оказание квалифицированной помощи в проведении экспериментов.

Литература

1. Добряков Ю.И., Добряков Е.Ю., Пономарева Т.И. Исследование фармакологических свойств экстракта из морского гидробионта – асцидии пурпурной (*Halocynthia aurantium*) // Дальневосточные моря России – М.: Наука, 2007. – Кн.2. – С. 637-657.
2. Долматова Л.С., Добряков Ю.И., Добряков Е.Ю., Богданович Р.Н. Экстракты из дальневосточных видов голотурий «Пентакан» снижает уровень пероксидации липидов в мембранах клеток периферической крови и восстанавливает гепатоциты у крыс при экспериментальном хроническом гепатите // Здоровье. Медицинская экология. Наука – 2009. – № 4-5. – С. 41-45.
3. Ипатова О.М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике – М.: Изд-во ГУ НИИ БМХ РАМН, 2005. – 318 с.

4. Кушнерова Н.Ф., Добряков Ю.И., Янькова В.И. Химический состав спиртовых извлечений из туники асцидии пурпурной *Halocynthia aurantium* // Валеология / – Владивосток: Дальнаука, 2000. – С. 151-155.
5. Новгородцева Т.П., Эндакова Э.Ф., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров в системе «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» в биологических жидкостях / – Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2003. – 80 с.
6. Пивненко Т.Н., Моторя Е.С., Задорожный П.А., Запорожец Т.С. Новые природные каротиноиды из дальневосточной асцидии в качестве иммуностимуляторов и антиоксидантов //Аллергология и иммунология – 2007. – Т. 8, № 3. – С. 339-343.
7. Пономарева Т.И., Добряков Ю.И. Исследование иммунных свойств хаурантина при иммуносупрессии в эксперименте // Тихоокеанский медицинский журнал – 2009. – № 3. – С. 52-54.
8. Ратникова Л.И., Мельников И.В. Значение оксида азота в повреждении гепатоцитов при патологии печени // Эпидемиология и инфекционные болезни – 2002. – № 6. – С. 50-54.
9. Речник В.Н., Шульдяков А.А., Савинова Г.А. Параметры перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у больных хроническим гепатитом С на фоне лечения ремаксолом // Фундаментальные исследования – 2008. – № 3. – С. 128-132.
10. Удут В.В., Венгеровский А.И., Коршунов Д.А., Каркищенко Н.Н. Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на биоэнергетику и перекисное окисление липидов печени при экспериментальной патологии, вызванной парацетамолом // Биомедицина – 2012. – № 1. – С. 120-127.

II.
МИКРОЦИРКУЛЯЦИЯ, ГЕМАТОЛОГИЯ, РЕОЛОГИЯ
II.
MICROCIRCULATION, HEMATOLOGY, RHEOLOGY

СОСТОЯНИЕ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИЕЙ КАК ОДИН ИЗ ФАКТОРОВ ДОЛГОЛЕТИЯ

Халепо О. В.[1], Молотков О. В.[1],
Молоткова С. А.[1],Корчигина Н. В.[2],
Захаров И. А.[1], Прянчиков С. Н.[1], Додусов В. В.[1]
[1]ФГБОУ ВО Смоленский государственный медицинский университет Минздрава России, Смоленск, Россия
[2]СОГАУ«Геронтологический центр «Вишенки», Смоленск, Россия
halepo71@mail.ru

Резюме

У 56 больных с хроническими сердечно-сосудистыми заболеваниями пожилого и старческого возраста методом лазерной допплеровской флоуметрии были изучены состояние микроциркуляции, механизмы ее регуляции и способность микрососудов к эндотелий-независимой и эндотелий-зависимой вазодилатации. Выявлено повышение уровня перфузии и механизмов контроля микрогемодинамики, резкое угнетение способности микрососудов к эндотелий-зависимой и эндотелий-независимой вазодилатации при активизации активных и пассивных механизмов регуляции, и прежде всего нарастании эндотелиальной активности микрососудов.

Ключевые слова: микроциркуляция, лазерная допплеровская флоуметрия, эндотелий-независимая вазодилатация, эндотелий-зависимая вазодилатация, ишемическая болезнь сердца, постинфарктный кардиосклероз, артериальная гипертензия, пожилой и старческий возраст, долголетие.

THE STATE OF MICROCIRCULATION IN PATIENTS OF AN ELDERLY AND SENIOR AGE WITH CARDIOVASCULAR PATHOLOGY AS ONE OF THE FACTORS OF LONGEVITY

Khalepo O.V.[1], Molotkov O.V.[1], Molotkova S.A.[1], Korchigina N.V.[2], Zakharov I.A.[1], Pryanchikov S.N.[1], Dodusov V.V.[1]

[1]Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia
[2]Gerontological center "Vishenky", Smolensk, Smolensk, Russia
halepo71@mail.ru

Abstract

In the study in 56 patients with the cardiovascular system chronic diseases of the elderly and senior age, the state of microcirculation, the mechanisms of its regulation and the ability of the skin microvessels to endothelium-independent and endothelium-dependent vasodilation by the method of Laser Doppler Flowmetry were investigatied. The initial increase in the level of perfusion and mechanisms of control of microhemodynamics, depression of the ability of microvessels to endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation with activation of active and passive regulatory mechanisms, and especially the increase in endothelial activity of microvessels were revealed.

Keywords:microcirculation, Laser Doppler Flowmetry, endothelium-independent vasodilation, endothelium-dependent vasodilation, ischemic heart disease, postinfarction cardiosclerosis, arterial hypertension, elderly and senile age, longevity.

Введение. По данным Федеральной службы государственной статистики в 2016 году средняя продолжительность жизни в России составила 77,3 года у женщин и 67 лет у мужчин, что существенно меньше, чем во многих развитых странах [5]. Однако в некоторых регионах, например в Северо-Кавказском федеральном округе, процент лиц старческого возраста (75-90 лет) и долгожителей (старше 90 лет) высок. На Кавказе проживают 42% всех лиц старше ста лет, причем особенно высок уровень долголетия в Абхазии и Азербайджане. У коренного

населения этих регионов наблюдается исторически повышенная концентрация долголетних людей, названная феноменом группового долгожительства, который определяется целым рядом этнопсихологических, генетических факторов, типом питания, физической активностью и другими особенностями образа жизни [1]. Однако основные физиологические механизмы, определяющие приспособление организма к старениюи возникающим к этому возрасту заболеваниям, и определяющие длительность жизни остаются до конца не выясненными.

Известно, что первое место среди причин смертности занимают болезни сердечно-сосудистой системы, причем основной причиной смертности долгожителей различных регионов также является, в основном, кардиоваскулярная патология, то есть, именно состояние сердечно-сосудистой системы во многом определяет уровень заболеваемости и влияет на продолжительность жизни как у лиц среднего возраста, так и в последующие возрастные периоды.

Согласно современным представлениям, 99% всех кровеносных сосудов относятся к системе микроциркуляции, которая реализует в органах и тканях транспортную функцию крови и обеспечивает транскапиллярный обмен, что позволяет считать ееодним из наиболее важных в функциональном отношении отделов кровеносной системы [6].

К настоящему времени сформировалось представление о микрососудистом русле, как о сложной системе, обеспечивающей транспорт крови и лимфы, перенос газов, воды, микро- и макромолекул через стенки капилляров и движение веществ в пространстве, окружающем капилляры.

Установлено, что микроциркуляторное русло находится под сложным многофакторным контролем со стороны нервных, гуморальных и местных факторов, в том числе выделяемых эндотелиоцитами [2,4,6].

Исследования, посвященные измененияпериферического кровообращения у больных различной патологией, прежде всего атеросклерозом, гипертонической болезнью, сахарным диабетом [2,3,4,7] в значительной степени разрознены, в них практически не используется комплексный подход, основанный на изучении состояния микроциркуляторного руслаи механизмов его регуляции.

Известно, что тканевой метаболизм определяется не только кровенаполнением и особенностями микрогемодинамики, состоянием

стенки микрососудов, но и резервными возможностями системы периферического кровообращения. В этой связи особо важным представляется вопрос о компенсаторных резервах системы микроциркуляции и ее регуляторных механизмов, что позволяет справляться с повышенными требованиями, предъявляемыми к системе периферического кровообращения в условиях разнообразной патологии и старения. Однако, вопрос об объективных, доступных и достоверных способах оценки компенсаторных резервов системы микроциркуляции и механизмов ее регуляции на сегодняшний день остается открытым.

В настоящее время в литературе имеется описание целого ряда нагрузочных проб на микроциркуляторное русло, позволяющих в процессе вазоконстрикции или вазодилатации, вызванных различными воздействиями (тепловым, холодовым, ортостатическим, электростимуляционным и т.д.) либо введением фармакологических агентов, оценить резервные возможности системы периферического кровообращения и механизмов ее регуляции [2,3,4].

С нашей точки зрения именно нагрузочные пробы позволяют наиболее объективно оценить состояние микроциркуляторного русла, во многом нивелируя индивидуальные различия, характерные для системы периферического кровообращения и затрудняющие выявление признаков расстройств при различных заболеваниях.

Резервные возможности системы периферического кровообращения длительное время могут компенсировать действие факторов внешней и внутренней среды, обеспечивают адаптацию и, в конечном итоге, служат основой механизмов гомеостаза. Однако, при длительных неблагоприятных воздействиях возможно изменение ее функциональной активности. В настоящее время в литературе появляются единичные работы, свидетельствующие, что оптимальное состояние капиллярного кровотока, которое достигается благодаря сбалансированности регуляторных влияний, в частности уровня адреномедуллина, продуцируемого преимущественно эндотелиальными клетками сосудов, является основой долголетия [8].

Однако до настоящего времени основные факторы, обеспечивающие адаптацию системы периферического кровообращения, центральных и местных механизмов регуляции к условиям формирования

и развития сердечно-сосудистой патологии в пожилом, старческом возрасте и у долгожителей до конца не выявлены.

Целью работы было выявить особенности состояния микроциркуляции, механизмов ее регуляции и их резервные возможности у лиц пожилого и старческого возраста с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Методы исследования. Были обследованы пациенты в возрасте от 62 до 90 лет (пожилой и старческий возраст), находящиеся на стационарном социальном обслуживании в геронтологическом центре «Вишенки», имеющие хронические заболевания сердечно-сосудистой системы и получающие стандартную терапию, которые были разделены на 3 группы.

В первую группу (n=4) вошли больные с постинфарктным кардиосклерозом (ПИК) (не менее 5 лет после перенесенного инфаркта миокарда). Во вторую группу (n=18) были включены пациенты с такими формами ишемической болезни сердца (ИБС), как атеросклеротический кардиосклероз и стабильная стенокардия напряжения II и III функционального класса. Третью группу (n=20) составили больные с атеросклеротическим кардиосклерозом и стабильной стенокардией напряжения II и III функционального класса в комбинации с артериальной гипертензией (АГ). Подчеркнем, что уровень АД на момент обследования у таких пациентов не превышал 140/90 мм рт. ст. на фоне гипотензивной терапии. Четвертую контрольную группу (n=14) составили пациенты того же возраста без признаков тяжелой хронической патологии. В исследование не включали лиц с АГ Ш степени, облитерирующим атеросклерозом, с сопутствующими заболеваниями, обуславливающими инвалидизацию больных.

Состояние микроциркуляции в кожных покровах изучали методом лазерной допплеровской флоуметрии с помощью аппарата ЛАКК-М. Функциональные нагрузочные пробы выполняли с помощью блока «ЛАКК-Тест» (НПП «Лазма», Россия). Базальный кровоток регистрировали в течение 15 минут в зоне Захарьина–Геда для сердца на правом предплечье. Исследование проводили в условиях, рекомендованных группой стандартизации ЛДФ European Contact Dermatitis Society (1994) [2,3]. Оценивали показатели перфузии: показатель микроциркуляции (М) и коэффициент вариации (Kv).

Вейвлет-преобразование ЛДФ-грамм [9,10] позволило оценить влияние отдельных механизмов регуляции микроциркуляции на тонус микрососудов. Показатели нейрогенного тонуса прекапиллярных резистивных микрососудов (НТ), миогенного тонуса метартериол и прекапиллярных сфинктеров (МТ) и эндотелиально-зависимого компонента тонуса (ЭЗКТ), в соответствии с литературными данными характеризуют активные механизмы контроля микрогемодинамики [2], а максимальная амплитуда колебаний кровотока в диапазоне сердечных (СР) и дыхательных (ДР) ритмов отражает состояние артериального притока и венозного оттока, то есть пассивных механизмов регуляции.

Для анализа компенсаторных возможностей функции эндотелия изучали микрососудистые реакции в ответ на локальное ионофоретическое введение 1% раствора натрия нитропруссида, экзогенного донатора NO, вызывающего расслабление гладкомышечных клеток сосудов (эндотелий-независимую вазодилатацию - ЭНВД) и 1% раствора ацетилхолина, активирующего эндотелий-зависимую вазодилатацию (ЭЗВД), за счет стимуляции высвобождения NO клетками эндотелия [2].

В каждом случае оценивали амплитуду прироста величины перфузии (ΔПМ). Для изучения механизмов регуляции микрогемодинамики фрагмент допплерограммы, соответствующий периоду вазодилатации, после удаления низкочастотной составляющей подвергался Вейвлет-преобразованию, что позволило оценить влияние отдельных механизмов на тонус микрососудов (НТ, МТ, ЭЗКТ, а также вклад ДР и СР) [9,10].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы «Statistica 10,0» с использованием параметрических и непараметрических критериев.

Результаты и их обсуждение. Полученные результаты свидетельствуют, что у пациентов с ПИК (1 группа) М был больше, чем в контрольной группе на 21%, а Kv, характеризующий вазомоторную активность микрососудов, превышал контрольные значения в 1,9 раза ($p<0,05$ в обоих случаях).

Анализ показателей, характеризующих механизмы регуляции микрогемодинамики у таких больных показал (рис.1), что были увеличены как активные механизмы (НТ и МТ были больше, чем в контроле в

1,4 раза, p<0,05 в обоих случаях), так и пассивные механизмы контроля, характеризующие состояние артериального притока и венозного оттока из микроциркуляторного русла (СР и ДР превышали контрольные показатели соответственно в 1,7 раза и в 1,5 раза, p<0,05 в обоих случаях).

У больных 2 группы (различные формы ИБС) и 3 группы (ИБС+АГ) М был больше, чем в контрольной группе соответственно на 32% и 22% (p<0,05 в обоих случаях), а вазомоторная активность микрососудов не изменялась.

Изучение показателей, характеризующих механизмы регуляции микроциркуляции, показало (рис.1), что у пациентов с ИБС (2 группа) и ИБС+АГ (3 группа) уровень активных механизмов регуляции (НТ, МТ и ЭЗКТ) статистически значимо не различался с контрольными значениями, а показатели пассивных механизмов контроля были увеличены. Амплитуда СР у пациентов 2 и 3 группы была больше, чем в контрольной группе в 1,8 раза, а амплитуда ДР – соответственно в 1,5 раза и 1,8 раза (p<0,05 во всех случаях).

Анализ результатов нагрузочных проб показал, что у больных с ПИК (1 группа) способность микрососудов к ЭНВД и ЭЗВД практически полностью отсутствовала, однако, изменения механизмов регуляции микрогемодинамики в эти периоды были значительны и носили однонаправленный характер.

Среди активных механизмов регуляции обнаружено, что величина НТ и ЭЗКТ у таких больных были больше, чем в контроле при ЭНВД в 1,6 раза и 3,4 раза, а при ЭЗВД – в 1,3 раза и 2,5 раза соответственно (p<0,05 во всех случаях).

Выявлено повышение вклада пассивных механизмов регуляции микроциркуляции как в период ЭНВД, так и при ЭЗВД. Амплитуда СР и ДР у больных ПИК была больше, чем в контроле при ЭНВД в 1,7 раза и 2 раза, а при ЭЗВД – в 1,8 раза и 1,5 раза соответственно (p<0,05 во всех случаях).

У больных с ИБС (2 группа) и ИБС+АГ (3 группа) микрососуды также практически утратили способность в ЭНВД и ЭЗВД, однако в эти периоды выявлено существенное нарастание механизмов регуляции микрогемодинамики, как активных, так и пассивных.

У больных 2 группы показатели НТ и ЭЗКТ были больше, чем в контроле в период ЭНВД в 1,5 раза и 2,9 раза, а при ЭЗВД в 1,4 раза и 2 раза соответственно ($p<0,05$ во всех случаях). Среди пассивных механизмов регуляции у больных с ИБС обнаружено, что амплитуда ДР в период ЭНВД была больше, чем в контрольной группе в 1,4 раза ($p<0,05$).

У пациентов 3 группы период ЭНВД характеризовался нарастанием НТ и ЭЗКТ, по сравнению с контролем соответственно в 1,4 раза и в 2,6 раза при увеличении амплитуды ДР в 1,4 раза ($p<0,05$ во всех случаях). В период ЭЗВД у больных с ИБС+АГ выявлено увеличение ЭЗКТ в 2,1 раза ($p<0,05$).

Таким образом, было обнаружено, что у пациентов с ПИК, ИБС и ИБС+АГ исходное состояние микроциркуляции характеризовалось повышением перфузии. Но если у пациентов с ПИК активизация микрогемодинамики происходила за счет нарастания выраженности как активных, так и пассивных механизмов регуляции, то у пациентов с такими формами ИБС как атеросклеротический кардиосклероз и стабильная стенокардия напряжения более высокий уровень кровоснабжения тканей на уровне микроциркуляторного русла обеспечивался преимущественно пассивными механизмами контроля – увеличением артериального притока и венозного оттока.

Способность микрососудов к ЭНВД и ЭЗВД практически полностью отсутствовала у всех обследованных пациентов (1, 2 и 3 группы), что может быть связано с длительным приемом нитратсодержащих лекарственных средств, однако в период ионофоретического введения фармакологических агентов у всех больных обнаружена значительная активизация механизмов регуляции микрогемодинамики, по сравнению со здоровыми лицами.

Особенно важным представляется тот факт, что у всех больных хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы пожилого и старческого возраста в период введения стимуляторов ЭНВД и ЭЗВД происходила очень значительная активизация эндотелиальной активности, о чем свидетельствуют значения показателя ЭЗКТ (рис.2), которые оказались в разы больше, чем у лиц контрольной группы.

Заключение. Принимая во внимание особенности контингента обследованных людей, длительное время страдающих различными фор-

мами сердечнососудистой патологии (пожилой и старческий возраст), можно полагать, что повышение активности микрогемодинамики за счет активных и пассивных механизмов регуляции является одним из механизмов адаптации системы периферического кровообращения к последствиям перенесенного инфаркта миокарда и другим хроническим заболеваниям сердечно-сосудистой системы, позволяющим вести достаточно активный образ жизни. Хотя этот вопрос и требует дальнейшего изучения.

Мы полагаем, что выраженная активизация механизмов регуляции микроциркуляции, и прежде всего эндотелиальной активности, у этой категории обследованных больных с ПИК, другими хроническими формами ИБС и АГ на нагрузочные пробы (ЭНВД и ЭЗВД) может свидетельствовать о сохранности компенсаторных резервов периферического кровообращения и значительном вкладе функции эндотелия в поддержание тканевого гомеостаза.

В связи с этим, оптимальное состояние системы периферического кровообращения, механизмов ее регуляции при сохранности их компенсаторных резервов можно рассматривать как один из факторов, определяющих продолжительность жизни пациентов при наличии хронических сердечно-сосудистых заболеваний.

В заключение можно высказать предположение, что оценка состояния микроциркуляции, механизмов ее регуляции с использованием функциональных нагрузочных проб является информативным диагностическим методом, позволяющим оценить уровень ее резервных возможностей в плане не только прогноза особенностей течения различной патологии, в том числе и сердечнососудистой системы, но и длительности жизни больных.

Литература

1. Григулевич Н.И., Дубова Н.А., Соловьева Л.Т., Ямсков А.Н. Социально-культурные и демографические особенности современного абхазского сельского населения // Полевые исследования Института этнологии и антропологии 2004 / Отв. ред. З.П. Соколова. – М.: Наука, 2006. – С.14-33.

2. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информация, нелинейность (руководство для врачей). М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2013. – 496 с.
3. Маколкин В.И., Подзолков В.И., Бранько В.В. и др. Микроциркуляция в кардиологии. – М, 2004. – 136 с.
4. Микроциркуляция и функция эндотелия: теоретические основы, принципы диагностики нарушений, значение для клинической практики: научно-методическое пособие / Под ред. О.В.Молоткова, О.В.Халепо. – Смоленск, 2015. – 111 с.
5. Федеральная служба государственной статистики URL:http://www.gks.ru/dbscripts/cbsd/dbinet.cgi?pl=2415003
6. Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция. – М., Медицина, 1984. – 430 с.
7. Meyer J. – U., Borgstrom P., Lindbom L. et al. // Microvasc. Res. – 1988. – V.35, N2. – P.193-203.
8. Di Somma S. Good microcirculation in dicates increased lifespan. URL:http://www.eurekalert.org/pub_releases/2016-09/sg-gmi_1090216.php
9. Stefanovska A., Bracic M. Contemporary Physics. – 1999. – T.40, N1. – P.31-35.
10. Stefanovska A., Bracic M., Kvernmo H.D. – IEEE Trans. Biomed. Eng. 1999. – T.46, N10. – P. 1230–1239.

КОРРЕЛЯЦИЯ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРОВИ С УРОВНЕМ ГЕМАТОКРИТА У ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Ахуба Л.О.
Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, г. Сухум, Республика Абхазия
lara_ahuba@mail.ru

Резюме

Работа посвящена изучению корреляционной зависимости вязкости крови от уровня гематокрита и проявлениям гиповискозных тенденций. Был проведен сравнительный анализ вискозиметрических

кривых в трех группах, отличавшихся по уровню гематокрита. Были отобраны доноры и больные с хроническим миело- и лимфолейкозом. Была выявлена сильная зависимость от уровня гематокрита, с тенденцией к снижению зависимости вязкости крови от скорости сдвига при максимально низких значениях гематокрита.

Ключевые слова: реология, вязкость крови, гематокрит, гематология.

CORRELATION OF THE HEMODYNAMIC PROPERTIES OF BLOOD WITH THE LEVEL OF HEMATOCRYT IN HEMATOLOGICAL PATIENTS

Akhuba L. O.
Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Academy of Sciences of Abkhazia, Sukhum, Republic of Abkhazia
lara_ahuba@mail.ru

Abstract

The work is devoted to the study of the correlation dependence of blood viscosity on the level of hematocrit and manifestations of hypovisual trends. A comparative analysis of viscosimetric curves was carried out in three groups differing in the level of hematocrit. Donors and patients with chronic myelo- and lymphocytic leukemia were selected. A strong dependence on the level of hematocrit was revealed, with a tendency to reduce the dependence of blood viscosity on shear rate at the lowest values of hematocrit.

Key words: rheology, blood viscosity, hematocrit, hematology.

Для полного понимания физических характеристик крови нам необходимо обратиться к основным понятиям реологии – разделу физики, изучающему способность жидкостей к деформации и текучести.

С точки зрения физики основное значения для характеристики крови играют скорость сдвига и напряжение сдвига – две величины, позволяющие дать оценку упругости этой жидкости, при континуальном подходе (понятие о «сплошной среде»). В то же время кровь является сложной

средой, характеризующейся большим числом составляющих элементов. При этом если разделить ее на 2 основные фазы: плазма и форменные элементы, то становится ясным, что каждая из этих фаз может характеризоваться различной степенью влияния на вязкость крови. Чистая плазма ведет себя подобно растворам высоких полимеров, так как представляет собой водный раствор различных неорганических солей и сложных высокомолекулярных соединений (липопротеины различной плотности, фибриноген и другие крупные грубодисперсные молекулы). При этом большое влияние на деформационные свойства крови оказывают форменные элементы, так как для них характерны собственные деформационные характеристики, определенная ориентация относительно стенок сосудов и друг друга, влияющая и на взаимное проникновение сред (плазма - форменные элементы). Таким образом, текучесть крови, как и вязкость, находятся под влиянием множества составляющих. Все их оценить одновременно не представляется нам возможным. В нашей работе мы хотим уделить внимание зависимости вязкости крови от гематокрита при его различных изменениях. Так как основное свойство крови – псевдопластичность – уменьшение вязкости при увеличении скорости течения, и мы будем давать оценку по вискозиметрической кривой (по оси х – скорость сджвига, по оси у - вязкость крови).

Материалы и методы:

– измерение вязкости крови асимптотической, на разных скоростях сдвига от 0,08 до 100 $с^{-1}$ на приборе LowContraves (LSC);

– уровень гематокрита определяли Унифицированным методом определения общего объема эритроцитов с помощью микроцентрифуги.

Цель работы: оценить взаимосвязь гемодинамических свойств крови с уровнем гематокрита у гематологических больных.

Результаты:

При определении гематокрита, были выделены следующие группы:

1. Группа больных с гематокритом 0,30 – 0, 35 л/л, в нее вошли больные хроническим лимфолейкозом и больные хроническим миелолейкозом в стадию ремиссии (n=10);

2. Группа больных с гематокритом 0,10-0,29 л/л, в которую вошли больные в развернутую стадию болезни; Группа больных эритремией и эритроцитозом с гематокритом от 0,47 до 0,65 л/л (n=10);

3. Группа доноров, у которых гематокрит составил 0,35-0,45 л/л (n=10).

Во всех группах на приборе на приборе LSC определяли вязкость крови на разных скоростях сдвига с построением вискозиметрических кривых. На рисунке один представлена вискозиметрическая кривая, построенная на показателях вязкости крови доноров, с нормальным гематокритом. Здесь прослеживается четкая зависимость вязкости крови от скорости сдвига. При анализе вязкости крови в трех группах, разделенных в зависимости от уровня гематокрита, наблюдались ярко выраженные отличия в построении вискозиметрических кривых (рис.2). Из рисунка видно, что при наиболее низких значениях гематокрита (в группе 2) кривая имеет наименьший угол наклона и теряет свойства гиперболы, приближаясь к прямой. В таблице 1 мы представляем данные вязкости крови на всех скоростях сдвига. Вязкость крови у больных первой группы была изменена относительно донорской. Так на низких скоростях сдвига, соответствующих скоростям в микроциркуляторном русле, она статистически значимо снижена ($p< 0,05$) с 52,0±5,7 мПа·с у доноров до 32,8±4,46 мПа·с у больных хроническим миелолейкозом первой группы. А при повышении скорости сдвига эти различия сглаживаются, так асимптотическая вязкость у больных на этой стадии болезни не изменена и составляет 3,5±0,26 мПа·с, в то время как у доноров - 3,7±0,13 мПа·с ($p>0,05$). В терминальной стадии наблюдаются еще более выраженные гиповискозные явления. Причем они наблюдаются на всех скоростях сдвига (снижение вязкости крови на 70--80%), включая и асимптотическую вязкость крови (на 44%) в сравнении с аналогичными показателями крови доноров. Так на низких скоростях сдвига у больных второй группы вязкость крови составляет 5,7 ± 1,05 мПа·с (< 0,001), а асимптотическая вязкость крови в отличии от больных первой группы также снижена до2,1±0,13 мПа·с ($p< 0,001$).

Следует отметить, что на низких скоростях сдвига выявлены достоверные отличия в трех группах. У больных с низким гематокритом эти изменения наиболее выражены: в 9 раз снижена вязкость крови при низких скоростях сдвига относительно 3й группы, и в 6 раз относительно 1й группы. В то время как асимптотическая вязкость крови незначительно отличается у этих больных от показателей доноров.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что микрогемореологические нарушения, характеризующиеся гиповискозными изменениями, у гематологических больных независимо от

стадии заболевания выявляются на низких скоростях сдвига, соответствующих току крови в микроциркуляторном русле. Так же следует отметить выраженную корреляционную зависимость вязкости крови от уровня гематокрита. Эти изменения характерны для всех, но наиболее выражены у больных в терминальную стадию болезни, что связано с падением гематокрита в этот период, соответственно уменьшением количества форменных элементов. Именно в этой группе наблюдаются снижение вязкости крови на всех скоростях сдвига. Следует обратить внимание на снижение вязкости крови при низких скоростях сдвига даже в группе больных с нормальным гематокритом, однако угол наклона гиперболоидной вискозиметрической кривой у них уменьшен незначительно относительно донорской. Выявленные нарушения реологических свойств крови свидетельствуют о гиповискозном синдроме у *этих больных в зависимости от уровня гематокрита.*

Рис.1. Вискозиметрическая кривая группы доноров с нормальным гематокритом (n=30).

Таблица 1. Вязкость крови больных хроническим миелолейкозом и лимфолейкозом с различным гематокритом и доноров на различных скоростях сдвига.

Скорость сдвига, $с^{-1}$	I группа (n=7)	II группа (n=7)	III группа (n=7)
0,10	34,8±7,46	5,7 ± 1,05	52,0±5,7
0,14	31,1±6,25	5,6 ± 0,94	46,2±5,04
0,19	27,8±5,18	5,3 ± 0,88	41,6±4,93
0,25	24,8±4,40	5,0 ± 0,80	36,7±4,01
0,35	22,2±3,81	4,7±0,72	32,3±3,34
0,47	20,1±3,26	4,4±0,67	28,9±2,60
0,64	17,8±2,72	4,2±0,62	25,1±2,22
0,87	15,8±2,34	4,0±0,57	21,8±1,87
1,18	14,1±1,99	3,8±0.53	19,2±1,60
1,60	12,7±1,74	3,9±0,51	16,6±1,34
2,18	11,3±1,48	3,6±0,46	14,5±1,12
3,0	10,1±1,34	3,4±0,41	12,7±0,95
4,0	9,1±1,17	3,2±0,41	11,2±0,83
5,5	8,2±1,02	3,1±0,36	10,0±0,70
7,4	7,4±0,87	2,9±0,32	8,9±0,59
10,1	6,7±0,76	2,8±0,29	8,0±0,51
13,7	6,1±0,67	2,7±0,27	7,2±0,43
18,7	5,6±0,59	2,6±0,25	6,5±0,37
25,4	5,1±0,52	2,6±0,24	5,9±0,30
34,5	4,7±0,44	2,5±0,22	5,4±0,25
46,9	4,4±0,40	2,4±0,20	4,9±0,20
66,1	3,9±0,33	2,2±0,18	4,3±0,16
86,6	3,8±0,31	2,2±0,15	4,1±0,15
117,7	3,5±0,26	2,1±0,13	3,7±0,13

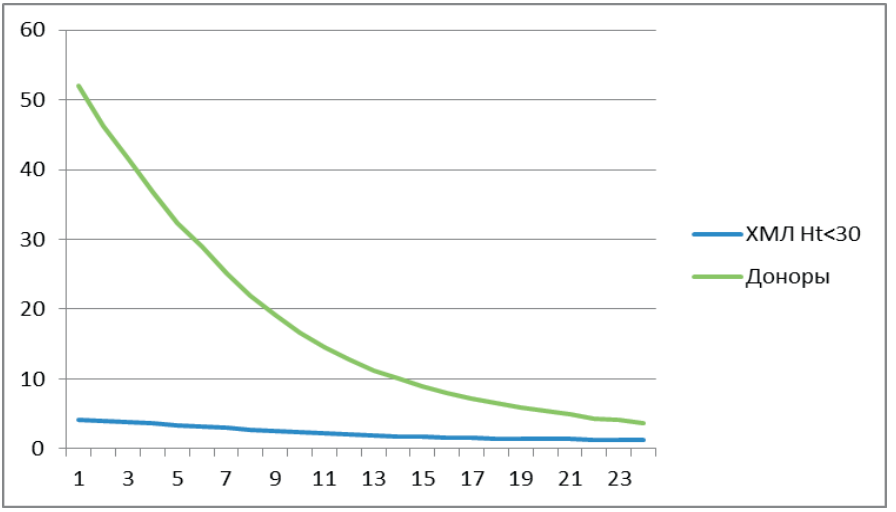


Рис.2. Вискозиметрические кривые больных второй группы и доноров.

Литература

1. Куртова А.В., Русанова Е.Б. Слободнюк К.Е., Горчакова М.В., Зуева Е.Е. - Диагностика острых лейкозов методом проточной цитометрии в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. Опухолей гемопоэтических и лимфоидных тканей. - *Клиническая онкогематология*. 2009, 3: 232–6.
2. Шиффман Ф.Дж., ред. Патофизиология крови. М.-СПб.: БИНОМ – Невский диалект; 2000.
3. Справочник терапевта : в 2 томах / [Н. П. Бочков, А. И. Воробьев, В. А. Насонова ; под ред. Н. Р. Палеева]. - Москва : АСТ, 1999 - ч.2, гл. 17 - Воробьев А.И. - Гемобластозы, 403–4.
4. Мамаев А.Н., Ефремова О.В., Елыкомов В.А., Костюченко Г.И., Косинова М.В., Волощенко Л.Г., Митрофанова Г.А. Маркеры тромбофилического состояния и особенности системы гемостаза при лечении хронического миелолейкоза иматиниба мезилатом. *Гематология и трансфузиология.* 2012; 57(5): 24 – 8.
5. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови. М.: Медицина; 1982.
6. Френкель М.А. Современная диагностика миелопролиферативных новообразований (классификация ВОЗ, 2008 г.). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 1: 43–9.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЛАЗЕРНОЙ ДОППЛЕРОВСКОЙ ФЛОУМЕТРИИ В НЕИНВАЗИВНОЙ ОЦЕНКЕ КОЖНОЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Куликов Д.А., Глазков А.А., Куликова П.А., Ковалева Ю.А.
ГБУЗ МО МОНИКИ им М.Ф. Владимирского, Москва, Россия
d.kulikov@monikiweb.ru

Резюме

Были проанализированы проблемы, препятствующие внедрению метода лазерной допплеровской флоуметрии в клиническую практику и разработаны подходы к решению этих проблем. Был создан алгоритм обследования, который позволил не только выявлять различия между группами, но и проводить обратную классификацию обследуемых с высокими значениями чувствительности и специфичности.

Ключевые слова: кожная микроциркуляция крови, лазерная допплеровская флоуметрия, сахарный диабет, неинвазивная диагностика, функциональные пробы.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF LASER DOPPLER FLOWMETRY IN NON-INVASIVE ASSESSMENT OF CUTANEOUS MICROCIRCULATION IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

Kulikov D.A., Glazkov A.A., Kulikova P.A., Kovaleva Yu.A.
Moscow Regional Research and Clinical Institute n.a. M.F. Vladimirsky, Moscow, Russia
d.kulikov@monikiweb.ru

Abstract

The problems that prevent the implementation of the laser Doppler flowmetry method into clinical practice and the approaches to solving these problems have been analyzed. We created the examination algorithm

allowed not only to identify differences between groups, but also to conduct a reverse classification of the subjects with high sensitivity and specificity.

Key words:skin microcirculation, laser Doppler flowmetry, diabetes mellitus, non-invasive diagnostics, functional tests.

Введение. Первое использование метода лазерной допплеровской флоуметрии для оценки микроциркуляции крови датируется 1972 годом, когда C. Riva и соавт. измерили перфузию сетчатки кролика [1, 2]. В медицинской практике метод впервые был применен в 1980х годах. Так, например, в 1982 году Tenland с соавт. проделали большую работу по адаптации метода для измерения кожной микроциркуляции крови [3], а Swiontkowski и соавт. в 1985 году применили ЛДФ для измерения перфузии костного мозга [4].

Основным преимуществом метода является возможность проведения неинвазивных измерений [5]. Физическая основа работы ЛДФ лежит в зондировании ткани лазерным излучением, регистрации отраженного сигнала и анализе происходящего допплеровского сдвига частоты излучения, рассеянного при взаимодействии с движущимися эритроцитами. Глубина анализируемой ткани составляет в среднем около 1 мм (для диапазона от зеленой до инфракрасной длины волны толщина зондируемого слоя ткани может составлять от 0,5 до 2 мм). Этот слой зондирования может содержать в зависимости от типа ткани следующие звенья гемомикроциркуляторного русла: артериолы, терминальные артериолы, капилляры, посткапиллярные венулы, венулы и артериоло-венулярные анастомозы. Анализируемый конечный параметр называют перфузией. Он измеряется в относительных или перфузионных единицах и прямо пропорционален количеству эритроцитов и их средней скорости [6].

Несмотря на отсутствие стандартизации, высокую чувствительность к условиям проведения экспериментов и большую вариабельность метода, интерес ученых к ЛДФ не перестает угасать. Неинвазивность и возможность оценки функционального состояния микроциркуляторной сети с помощью проб сделали этот метод наиболее распространенным способом оценки микроциркуляции [7, 8]. Особенно актуальным применение ЛДФ видится в изучении болезней, патогенез которых неразрывно связан с микроциркуляторными нарушениями.

Примером такого заболевания является сахарный диабет. С использованием метода лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ) опубликовано множество статистически значимых результатов научных исследований [9, 10], говорящих о том, что изменения кожной микроциркуляции предшествуют развитию осложнений сахарного диабета 2 типа (СД 2), могут выявляться до манифестации заболевания. При этом, несмотря на перспективные результаты работ, метод отсутствует в клинической практике. Основной причиной этому является его недостаточная диагностическая и прогностическая ценность: ЛДФ хорошо выявляет различия между группами, но плохо работает для обследования единичного пациента и принятия клинического решения.

Цель работы: разработка подходов, повышающих диагностическую ценность оценки кожной микроциркуляции крови у пациентов с сахарным диабетом 2 типа методом лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ).

Материалы и методы. За время работы обследовали 319 человек: здоровые добровольцы, пациенты с сахарным диабетом 1 и 2 типов, лица с нарушениями углеводного обмена другой этиологии, больные артериальной гипертензией и др. На данной группе пациентов отрабатывались алгоритмы проведения функциональных проб, создавались способы пострегистрационной обработки данных. Регистрацию параметров кожной микроциркуляции проводили с применением диагностических комплексов ЛАКК-01, ЛАКК-02, ЛАКК-ТЕСТ, ЛАКК-М (НПП «ЛАЗМА»).

Изучение чувствительности и специфичности комбинированной окклюзионно-тепловой пробы проводили на 12 молодых условно здоровых добровольцах (8 женщин и 4 мужчины) и 54 пациентах (46 женщин и 8 мужчин) с сахарным диабетом 2 типа с длительным стажем заболевания. Исследуемая и контрольная группы не были сопоставимы по возрасту т.к. в данном случае была поставлена задача поиска микроциркуляторных различий в заведомо различающихся группах.

Исследование кожной микроциркуляции на этой группе проводили с применением комплексов неинвазивной диагностики ЛАКК-02 и ЛАКК-ТЕСТ (НПП «Лазма») после 15-минутной адаптации обследуемого к условиям лаборатории. Перед проведением пробы на левой руке

проводили измерение артериального давления. Кожную микроциркуляцию крови регистрировали на тыльной поверхности предплечья правой руки на 4 см проксимальнее лучезапястного сустава по срединной линии. В течение 120 секунд регистрировали базовые параметры кровотока при температуре 32,2 °С, после чего место наложения датчика на максимальной скорости нагревали до температуры 42 °С. На 420 секунде исследования с помощью манжеты для измерения давления проводили временную (120 секунд) окклюзию кровотока, нагнетая в манжете давление выше систолического на 50 мм.рт.ст. После снятия окклюзии регистрацию параметров кровотока продолжали в течение 180 секунд. Общее время пробы составляло 720 секунд. Алгоритм обследования приведен на рисунке 1.

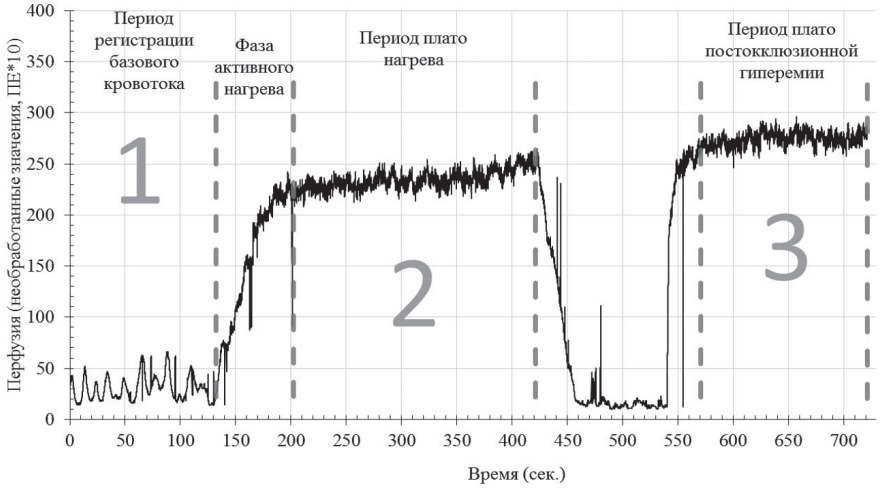


Рисунок 1. *Схема проведения обследования на примере результатов измерения здорового человека*

Статистический анализ полученных данных проводили в программе Statistica 13.2 (Dellinc., USA). Для описания количественных данных рассчитывали медианы и квартили. Сравнение количественных переменных в двух группах проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Для анализа диагностической значимости параметров микроциркуля-

ции был проведен ROC-анализ для обратной классификации пациентов по группам.

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы был проведен анализ литературных данных, определены причины, ограничивающие клиническое использование ЛДФ. В большинстве публикуемых научных работ статистическая значимость (и мощность исследования) достигается не за счет увеличения величины различий, но за счет включения большего числа испытуемых в исследование. Рассмотрим гипотетический пример результатов научной работы, в которой проводили сравнение двух групп по 20 человек. Допустим, что в первой группе средний уровень перфузии составил 6,1±1 ПЕ, а во второй группе – 7,1±1 ПЕ. Значение p, рассчитанное с использованием двустороннего критерия Стьюдента составляет 0,0032, что свидетельствует о значимости наблюдаемых различий. Если в группы включить по 30, 40, 50 человек, уровень статистической значимости вырастет еще сильнее. Но величина «p» не отражает практической значимости результатов такого исследования. Если посмотреть на функции распределения, построенные на основании этих выборок (рисунок 2), то можно увидеть, что площадь их перекрытия слишком велика (более 60%) для того, чтобы использовать данные различия в диагностических целях.

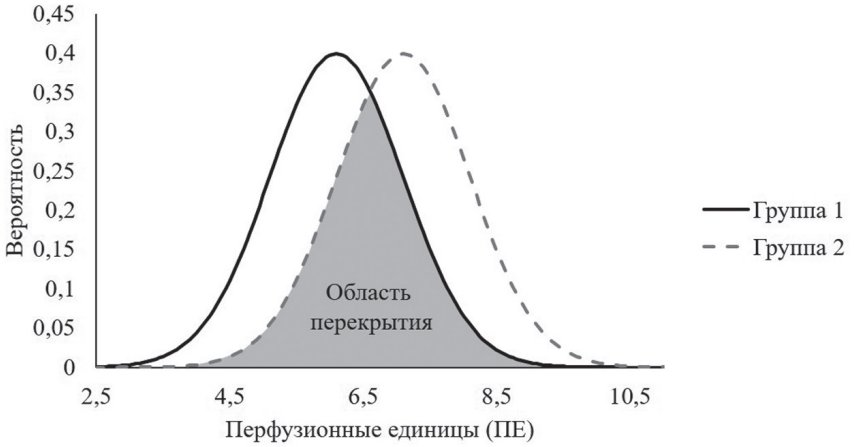


Рисунок 2. *Функции распределения по результатам гипотетического эксперимента со сравнением двух групп*

Похожая ситуация, к сожалению, наблюдается в большинстве публикуемых работ. Существует два способа уменьшения площади перекрытия данных распределений: снижение дисперсий (разброса) и увеличение различий (расстояния) между ними. Мы определили подходы, которые смогут снизить дисперсию в группах и увеличить величину различий между нормой и патологией:

1. применение функциональных проб (в частности, проб с комбинированным воздействием)
2. дополнительная математическая обработка результатов измерений (например, переход в область «относительных значений») и расчет диагностических коэффициентов

Первый подход применяется в большинстве исследований, однако, к сожалению, проб не всегда достаточно для достижения диагностической значимости.

Нами был разработан алгоритм проведения комбинированной окклюзионно-тепловой пробы (описание приведено в материалах и методах). По результатам проведения пробы анализировались следующие параметры: медиана микроциркуляции за период регистрации базового кровотока (период 1) (в перфузионных единицах - ПЕ), медиана микроциркуляции за период плато нагрева (период 2) (в ПЕ), медиана микроциркуляции за период посткокклюзионной гиперемии (период 3) (в ПЕ), а также разности значений между периодами плато.

Статистически значимые различия были выявлены по всем параметрам, кроме разности 3 и 2 периодов пробы. Наибольшая величина различий наблюдалась по параметру «разность периодов 2 и-1»: 9,35 [7,3; 12] ПЕ в исследуемой и 16,45 [14,05; 21,15] ПЕ в контрольной группе ($p<0,001$, критерий Манна-Уитни).

Для этого параметра был проведен ROC-анализ. Площадь под кривой (AUC) с двусторонним 95% доверительным интервалом составила 0,836 (0,704-0,969), что говорит о том, что этот параметр может позволить достигать значений чувствительности и специфичности теста более, чем в 80%.

Выводы. В ходе текущего исследования были разработаны подходы к проведению исследования кожной микроциркуляции с применением новых функциональных проб и алгоритмов пострегистраци-

онной обработки данных. Было показано, что ряд параметров окклюзионно-тепловой пробы позволяет не только выявлять статистически значимые различия между группами, но и с высоким уровнем чувствительности и специфичности проводить обратную классификацию пациентов по группам.

Литература

1. Riva C, Ross B, Benedek GB. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries // Invest Ophthalmol. – 1972. – V.11, №11. –P. 936-944.
2. Swiontkowski MF. Laser Doppler Flowmetry—Development and Clinical Application // The Iowa orthopaedic journal. – 1991. – V.11. – P. 119.
3. Tenland T. On laser Doppler flowmetry: methods and microvascular applications. – 1982.
4. Swiontkowski M, Tepic S, Ganz R, Perren S. Laser Doppler flowmetry for measurement of femoral head blood flow. Experimental investigation and clinical application // Helvetica chirurgica acta. – 1986. – V.53, №1-2. – P. 55.
5. Wright C, Kroner C, Draijer R. Non-invasive methods and stimuli for evaluating the skin's microcirculation. // Journal of pharmacological and toxicological methods. – 2006. – V.54, №.1. – P. 1-25.
6. Крупаткин АИ, Сидоров ВВ. Лазерная допплеровская флоуметрия микроциркуляции крови. Москва: Медицина; 2005. 254 с.
7. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods // Microcirculation. – 2012. – V. 19, №1. – P. 47-64.
8. Shepherd AP, Öberg PÅ. Laser-Doppler blood flowmetry / Springer. – 1990.
9. Wiernsperger N. F., Bouskela E. Microcirculation in insulin resistance and diabetes: more than just a complication // Diabetes Metab. – 2003. – V. 29, № 4. – P. 6s77-6s87.
10. Jan Y. K., Shen S., Foreman R. D., Ennis W. J. Skin blood flow response to locally applied mechanical and thermal stresses in the diabetic foot // Microvasc Res. – 2013. – V. 89. – P. 40-6.

ФАКТОРЫ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ДОСТАВКУ КИСЛОРОДА ТКАНЯМ

Кислухин В.В.
МЕДИСОНИК, Москва, Россия
viktorK08@gmail.com

Резюме

Доставка кислорода к тканям зависит от состояния микроциркуляции. А именно от: (1) Клеточного фактора, Fc, определяющего артериальный гематокрит, Ht_a, через гематокрит всего тела, $Ht_т$ и от (2) Скорости обмена между открытыми и закрытыми микрососудами, R. Цель сообщения: представить методики определения Fc и R. Определение Fc основано на измерении плотности крови ультра-звуковым флуометром. Для получения R используется Лазер-Допплер флоуметрия. В эксперименте было получено, что Fc меняется от 0.65 до 1.0, а R меняется от 0.02 до 2.0 В результате доставка кислорода может меняться в 2-3 раза.

Ключевые слова: микроциркуляция, клеточный фактор, гематокрит, вазомоции, потребление кислорода.

MICROCICULATION'S FACTORS FOR OXYGEN DELIVERY

Kislukhin V.V.
Medisonic, Moscow,Russia
viktorK08@gmail.com

Abstract

Oxygen delivery depends on the state of microcirculation. Specifically on (1) Cell factor, Fc, that governs arterial hematocrit under constancy of red cells within body; (2) Rate of exchange open-close microvessels, R. Aim of a communication: to present methods to measure Fc and R. Fc can be obtained by analysis of blood density recorded by Ultrasound flowmeter. An R can be estimated by Laser-Doppler flowmeter. Experiments reveal that a Fc could be from 0.65 to 1.0, and an R varies from 0.02 to 2.0 Thus delivery can vary up to 3 times.

Key words:microcirculation, cell factor, hematocrit, vasomotion, oxygen consumption.

Введение. Доставка кислорода, O_2, к тканям определяется выражением $DelO_2=1.34*CO*Ht_a*HbO_2$, где CO – сердечный выброс и HbO_2 – доля оксигенированных эритроцитов в артериальной крови (количество растворенного в плазме O_2 опущено). В этом выражении от состояния микроциркуляции зависит только величина артериального гематокрита, Ht_a, Установлено, что при постоянном гематокрите всего тела (Ht_b = [объем эритроцитов]/[обьем крови]) Ht_a может меняться в широких пределах в зависимости от клеточного фактора, Fc ($Ht_a=Fc*Ht_b$). В литературе приводятся значения для Fc от 0.7 до 1.3 [1]. Увеличение Fc ведет к росту Ht_a и значит растет доставка O_2. Отметим, что помимо влияния на доставку O_2, при пониженном Ht_a низкое значение Fc (например 0.7) означает малый обьем эритроцитов в циркуляции, отсюда следует, что возможно назначение эр-массы, а при повышенном Fc (1.3) следует искать способ перевода красных клеток из микроциркуляции в центральную циркуляцию.

Другим фактором, влияющим на доставку O_2, является скорость вазомоций, R. Дело в том, что в покое только малая часть микрососудов перфузируется [2] при этом микрососуды, открытые сейчас, со временем закрываются и открываются другие – сейчас закрытые [3] Возникает перемещение «открытости» по ткани. Показано, что скорость этого перемещения, скорость вазомоций R, может увеличивать потребление O_2, [4]. Действительно ли рост R увеличивает потребление O_2, не ясно, но количество микрососудов, получающих, за единицу времени свежую кровь, при росте R растет.

Цель работы: представить методики определения Fc иR.

Методы исследования. Метод 1 основан на регистрации плотности крови ультразвуковыми датчиками (Transonic Systems Inc, Ithaca, NY, USA). Изменения плотности наблюдаются при введении 0.9% NaCl и при заборе крови, осуществляющихся с постоянной скоростью в течении 1-2мин. Эксперименты с забором крови проводились на крысах и овцах, а инфузии 0.9% NaCl использовались в исследованиях на людях и в эксперементах от крыс до овец.

Типичная запись изменения плотности при заборе крови представлена на Рис 1. Верхняя кривая – поток крови в трубке из которой забирается кровь. Видно изменение потока, связанное с началом и концом забора крови. Нижняя кривая и есть плотность крови. Резкое, болюсное изменение плотности связано с инъекцией физ-раствора и обработка этого изменения дает параметры центральной гемодинамики (сердечный выброс, объем крови и другие [5]). Следующее, плавное изменение плотности связано с забором крови.

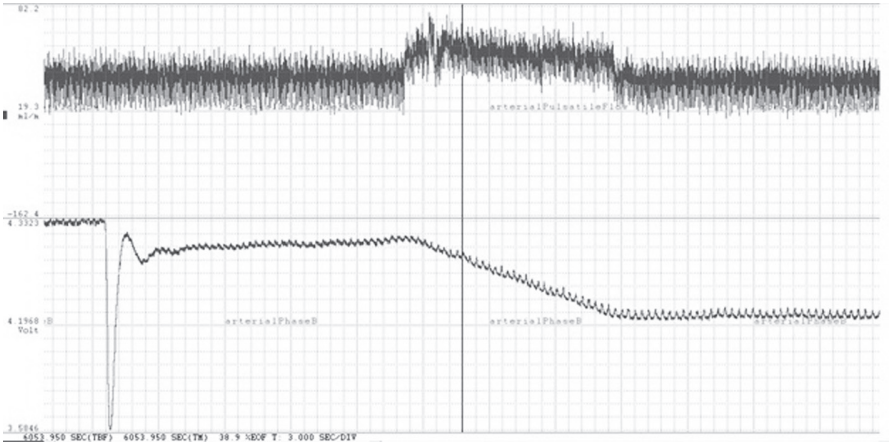


Рис. 1. *Крыса; Инъекция физ-раствора (0.3 мл) и забор 3 мл крови (примерно 10% от ОК)*

Есть две причины для снижения плотности крови: 1. Рефиллинг – разбавление крови тканевой жидкостью; 2. Если центральный гематокрит (венозный или артериальный, Hta) выше гематокрита всего тела (Htb), то забирается более плотная кровь, чем остается в циркуляции.

Так как во всех эксперементах падение плотности начиналось с началом забора крови и прекращалось с прекращением забора крови, то объяснение падения плотности выходом тканевой жидкости не проходит. Рефиллинг – процесс медленный и длящийся дольше чем время забора крови (1 минута). Отметим, что падение плотности крови зависит от Fc, чем меньше Fc тем быстрее будет падать плотность крови. А при Fc = 1 плотность крови будет падать только за счет рефиллинга.

Кривая, аналогичная кривой с Рис. 1, представлена на Рис. 2. Но в данном случае имеет место инфузия физ-раствора.

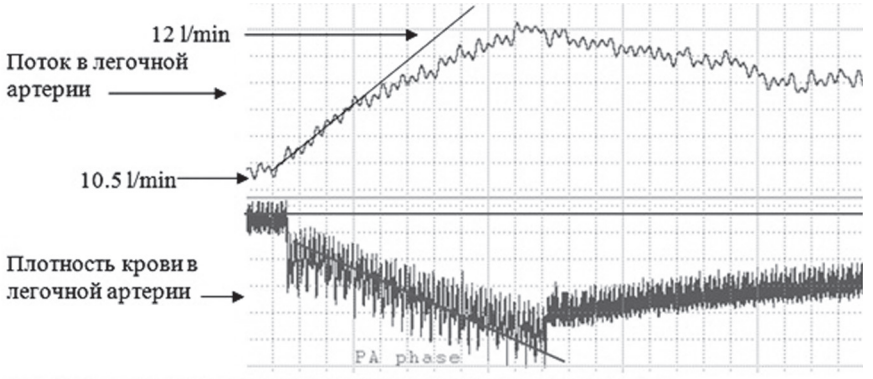


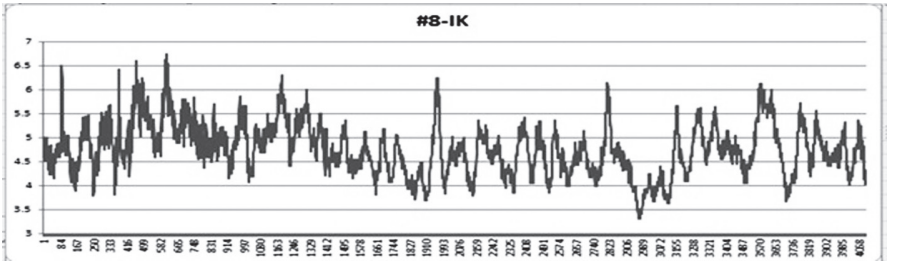
Рис. 2. *Овца, 50 кг. Введение 250 мл 0,9% NaCl в течении минуты*

При инфузии физ-раствора (также как и при заборе крови) характеристикой разведения является тангенс угла падения плотности крови. Одновременно регистрируемый рост кровотока по легочной артерии можно обьяснить тем, что вводимый физ-раствор остается в активной циркуляции. В результате мы имеем две характеристики плавного падения плотности на Рис 1. и 2. Это два тангенса (один забора, другой инфузии) и две скорости: скорость забора крови и скорость инрфузии 0.9% NaCl Клеточный фактор может быть получен из уравнения:

$$\frac{1-Fc}{Fc} = \frac{tnW}{tnInf}\frac{q_{inf}}{q_W}$$

Метод 2. Типичная кривая полученная лазер-допплер флоуметром (ЛДФ) приведена на Рис. 3. Рассеивание света движущимися эритроцитами является источником сигнала при использовании ЛДФ. Величина сигнала пропорциональна кровотоку [6] и, согласно Крогу [1], количеству открытых микрососудов.

Следовательно приведенные флуктуации пропорциональы числу открытых микрососудов. Рассмотрение этих флуктуаций как случайных ведет к обработке ЛДФ-грамм следствием которой является получение скорости вазомоций [7].



Результаты и их обсуждение. В эксперименте было получено, что Fc меняется от 0.65 до 1.0, а R меняется от 0.02 до 2.0 В результате доставка кислорода может меняться в 2-3 раза.

В какой степени Fc является фактором влияющим на доставку кислорода, а в какой степени он важен для кровевосполнительной терапии предстоит выяснить. Отметим, что в эксперименте производился забор крови (0.3 мл/кг) с немедленным её возвращением, что также позволяло получить Fc.

В настоящее время распространено представление, что вариации кровотока, регистрируемые методом ЛДФ, среди прочего являются следствием и многочисленных регуляторных процессов. Выделяют 5 частотных диапазонов, с которыми и связывают регулирующие колебания. Как пишут Крупаткин и Сидоров [8] “Микроциркуляционное русло находится под многоуровневым контролем, включающим в себя эндотелиальные, нейрогенные, собственно миогенные, метаболические механизмы, пульсовые и дыхательные ритмы, которые в совокупности формируют сложные колебательные процессы в микрососудах.” Основное замечание к «управление микроциркуляцией» подходу – пять параметров с относительно простой кривой не смогут войти в клиническую практику. Естественнее предположить, что управлеющим воздействиям подвергаются стохастические характаристики, если требуется перейти к другому состоянию микроциркуляции.

Выводы. Предложены два параметра, характеризующие состояние микроциркуляции: клеточный фактор и скорость вазомоций, а также приведены методы их определения**.**

Литература

1. Gibson J G, 2d J, Peacock WC, Seligman AM, Sack T;**.** Circulating red cell volume measured simulteniously by the radioactive iron and dye methods. Clin. Investigation 25:126, 1946, 848-857
2. Krogh A The Anatomy and Physiology of Capillaries, New York, Hafner Publishing CO, , pp. 270-290; 1959
3. Zweifach **BW**: Functional Behavior of the Microcirculation. Springfield, pp 150-152 1961
4. Kislukhin VV: Regulation of oxygen consumption by vasomotion. Math Biosci. 2004 191(1):101-108
5. Krivitski N Kislukhin V, Thuramalla N; Pediatr Crit Care Med 2008, 9:423-428;
6. Fredriksson I, Fors C and Johansson J, "Laser Doppler Flowmetry - a Theoretical Framework", Department of Biomedical Engineering, Linköping University (2007), www.imt.liu.se/bit/ldf/ldfmain.htm
7. Кислухина ЕВ, Кислухин ВВ, Конорова ИЛ Стохастическая интерпретация лазер-допплеровских флоуграмм // Клиника и Эксперимент: Материалы 10 конференции Микроциркуляция и Гемореология, Ярославль 2015, - С114.
8. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информация, нелинейность (руководство для врачей). – М.: Книжный дом «Либроком». 2013. 496 с.

ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НОРАДРЕНАЛИНА НА НЕЙРОГЕННУЮ ВАЗОРЕАКТИВНОСТЬ, СНИЖЕННУЮ АЦИДОЗОМ

Ярцев В.Н.

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

yartsev@infran.ru

Резюме

В опытах на сегментах хвостовой и брыжеечной артерии крыс изучалось влияние норадреналина в концентрации 0.01-1.0 мкМ на нейрогенную констрикторную реакцию этих сегментов, вызванную их стиму-

ляцией электрическим полем с частотой 10 Гц в контроле, а также после снижения pH раствора с 7.4 до 6.6. Показано, что на фоне ацидоза происходит значительное снижение этой реакции. Норадреналин восстанавливает нейрогенную вазоконстрикцию после ее спонтанного снижения или значительно большего угнетения, вызванного ацидозом.

Ключевые слова: брыжеечная артерия крысы, хвостовая артерия крысы, стимуляция электрическим полем, норадреналин, ацидоз.

RESTORING EFFECT OF NORADRENALINE ON THE NEUROGENIC VASOREACTIVITY DIMINISHED BY ACIDOSIS

Yartsev V.N.
Pavlov Institute of Physiology, Russian Acad. Sci., St. Petersburg, Russia
yartsev@infran.ru

Abstract

The effect of 0.03-1.0 μM noradrenaline on the neurogenic contractile response to electrical field stimulation of the juvenile rat tail artery segment in control conditions and after solution pH decrease from 7.4 to 6.6 was studied. Acidosis was shown to inhibit this response significantly at all frequencies of stimulation used (3, 5, 10, and 40 Hz). Noradrenaline potentiated neurogenic vasoconstriction diminished spontaneously or by low pH. Potentiative effect of noradrenaline in acidic solution was more pronounced.

Key words:rat mesenteric artery, rat tail artery, electrical field stimulation, noradrenaline, acidosis.

Введение. Известно, что различные гормоны, концентрация которых в крови может значительно изменяться при изменении физиологического состояния организма, способны влиять на эффективность нейрогенного контроля локального кровотока. В частности, было показано, что норадреналин, концентрация которого в крови крыс может увеличиваться во время стресса в 6-11 раз [2], угнетает нейрогенную вазоконстрикцию, либо вызывает изменение характера реакции в от-

вет на раздражение периваскулярных нервов с констрикторного на вазодилататорный [8]. Нам удалось найти только одно исследование [9], в котором было обнаружено потенцирующее действие норадреналина на нейрогенное сокращение сосудов. Ранее нами на хвостовой артерии крысы было впервые показано, что величина потенцирующего действия норадреналина на нейрогенную сократительную реакцию кровеносных сосудов зависит не только от концентрации норадреналина, но и от степени предшествующего спонтанного, либо вызванного ацидозом снижения этой реакции [1]. То есть оказалось, что норадреналин обладает способностью восстанавливать сниженную нейрогенную вазореактивность. Интересно было выяснить, способен ли этот гормон оказывать такое же действие на другие кровеносные сосуды.

Целью работы являлось исследование влияния норадреналина на нейрогенную реактивность брыжеечной артерии крысы, сниженную ацидозом и сравнение ее с хвостовой артерией крысы в аналогичных условиях.

Методы исследования. Опыты проводили на самцах крыс линии Вистар весом 100-200 г. Под эфирным наркозом отпрепаровывали хвостовую (n=46) или брыжеечную (n=18) артерию, от которой отрезали кольцевой участок длиной 1.2 мм. Артериальный сегмент помещали на две вольфрамовые иголочки (диаметром 70 мкм каждая), одна из которых была соединена со штоком погружателя микроэлектродов, а вторая – с механотроном 6МХ1С, сигнал от которого усиливался и поступал на самописец КСП-4, регистрирующий изменение натяжения в стенке сегмента. Иголочки с кольцевым участком помещали в проточную термостатируемую (36°С) ванночку объемом 10 мл, заполненную бикарбонатным раствором Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 115, KCl – 4.7, $CaCl_2$ – 2.6, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.2, $NaHCO_3$ – 25, KH_2PO_4 –1.2, глюкоза – 10. pH раствора доводили до значения 7.4 и контролировали в течение всего эксперимента. После адаптации препарата в течение 30 мин при степени растяжения, соответствующей натяжению примерно 0.8 мН, иголочки миографа сводили и затем ступенчато разводили до значения натяжения, при котором наблюдался максимальный ответ сосудистого сегмента на стимуляцию электрическим полем (30 В, 3 мс, в течение 3 с). Электростимуляция с частотой 10 Гц осуществля-

лась с помощью двух платиновых электродов, расположенных на расстоянии 2 мм от сосудистого сегмента. Ранее в опытах с применением тетродотоксина (0.1 мкМ) нами было показано, что в наших методических условиях при используемых параметрах электростимуляции сокращение сосуда происходит, преимущественно, за счет раздражения его нервных волокон. В течение последующих 120 мин сосуд стимулировали через каждые 3 мин, после чего прекращали электростимуляцию и вводили норадреналин битартрат (Sigma, Steinheim, Германия), концентрацию которого кумулятивно увеличивали от 0.01 до 10 мкМ (в ванночке). После достижения максимального (для каждой данной концентрации норадреналина) значения тонического напряжения стенки сосуда проводили электростимуляцию. Серия экспериментов с ацидозом отличались от вышеописанной только тем, что через 90 мин после растяжения сегмента pH раствора снижали с помощью CO_2 с 7.4 до 6.6 и поддерживали на этом уровне до конца эксперимента. Величину первоначального ответа на электростимуляцию через 5-10 мин после растяжения сегмента принимали за 100%.

При статистической обработке результатов достоверность отличий определяли методом парных (в пределах одной группы) или непарных (между группами) сравнений с помощью t-критерия Стьюдента ($P<0.05$).

Результаты и их обсуждение. В первой серии экспериментов, проводившихся на хвостовой артерии при pH 7.4, в большинстве случаев, как и в предыдущих наших работах, в ходе опыта происходило спонтанное снижение величины сократительного, вызванного электростимуляцией ответа, который под действием норадреналина в концентрации 0.1 мкМ восстанавливался до первоначального значения (рис. 1А). В частности, величина сократительного ответа на электростимуляцию, составлявшая в начале опыта 4.3 ± 0.3 мН, через 120 мин падала до 3.3 ± 0.3 мН ($p<0.00005$), а на фоне действия норадреналина в концентрации 0.1 мкМ возрастала до значения 4.5 ± 0.3 мН, которое достоверно не отличалось от первоначального ($p>0.05$). При снижении pH с 7.4 до 6.6 не наблюдалось какого-либо однонаправленного изменения тонического напряжения сосуда, однако нейрогенный ответ существенно уменьшался, достигая через 30 мин (после смены pH)

величины, составляющей 42.5±3.8% от первоначальной (рис. 1А), что было почти в два раза меньше, чем при спонтанном падении ответа в контроле на фоне pH 7.4 (77.6±4.1%). Под действием норадреналина в возрастающей концентрации этот ответ увеличивался, достигая при концентрации 0.5 мкМ значений, полученных при pH 7.4.

В серии экспериментов, проводившихся на брыжеечной артерии при pH 7.4, в ходе опыта не происходило спонтанного снижения величины сократительного ответа, вызванного электростимуляцией, и в этих условиях норадреналин не оказывал никакого потенцирующего действия на нейрогенную сократительную реакцию (рис. 1Б). В частности, величина сократительного ответа на электростимуляцию, составлявшая в начале опыта 0.17±0.01 мН, через 120 мин была равна 0.17±0.02 мН ($p>0.05$), а при максимальном действии норадреналина в концентрации 0.5 мкМ составляла 0.17±0.03 мН и достоверно не отличалась от вышеуказанных значений. При снижении pH с 7.4 до 6.6 не наблюдалось какого-либо однонаправленного изменения тонического напряжения сосуда, однако нейрогенный ответ существенно уменьшался, достигая через 30 мин после смены pH величины, составляющей 57.8±14.1% от первоначальной (рис. 1Б). Под действием норадреналина в возрастающей концентрации этот ответ увеличивался, достигая при концентрации 1.0 мкМ значения (94.3±14.8%), достоверно не отличающегося от значения, полученного в начале опыта. Причем это значение было значительно больше значения (51.6±5.3%, $p<0.05$), полученного при такой же концентрации норадреналина и pH 7.4, т.е. ацидоз в данных условиях увеличивал нейрогенный тонус артерии.

По оси ординат – величина реакции по сравнению с первоначальной величиной, %. Здесь и далее данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего значения. Достоверность отличия: *$p<0.05$, **$p<0.01$ при сравнении с pH 6.6.

При выражении полученных результатов в виде изменения нейрогенного сокращения артерии через 120 минут после растяжения сегмента - по сравнению с первоначальной величиной, а на фоне НА - по сравнению с величиной реакции непосредственно перед введением НА оказалось, что норадреналин в концентрации 0.5 и 1.0 мкМ вызывает возрастание нейрогенного тонуса как хвостовой, так и брыжееч-

ной артерии, которое было достоверно больше в условиях ацидоза, чем в условиях нормального pH (рис. 2А и 2Б).

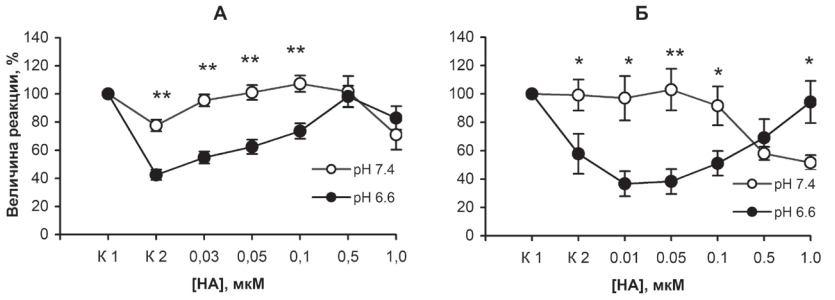


Рис. 1. *Сократительная реакция сегмента хвостовой (А) и брыжеечной (Б) артерии крысы на электростимуляцию через 5-10 мин (К 1) и 120 мин (К 2) после растяжения этого сегмента в контроле, а также на фоне действия норадреналина (НА) при pH 7.4 и 6.6.*

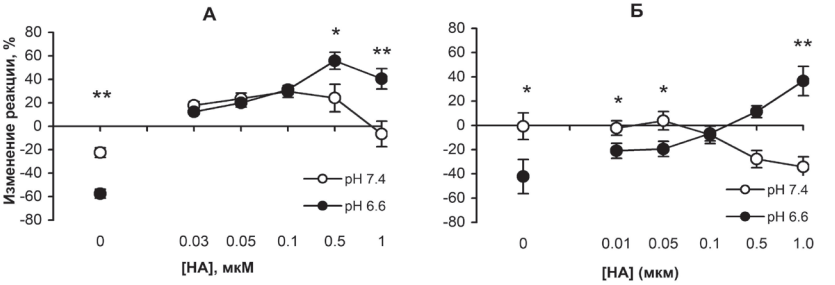


Рис. 2. *Изменение сократительной реакции сегмента хвостовой (А) и брыжеечной (Б) артерии крысы на электростимуляцию до и на фоне действия норадреналина (НА) при pH 7.4 и 6.6.*

По оси ординат – изменение реакции (0 НА - через 120 минут после растяжения сегмента по сравнению с первоначальной величиной, а на фоне НА - по сравнению с величиной реакции непосредственно перед введением НА). Первоначальная величина сократительной ре-

акции принята за 100%. Достоверность отличия: *p<0.05, **p<0.01 при сравнении с pH 6.6.

Проводившиеся ранее другими авторами исследования по изучению действия норадреналина на нейрогенное сокращение кровеносных сосудов довольно немногочисленны. В частности, на артериях человека было показано, что электростимуляция с частотой 2-8 Гц на фоне действия норадреналина в концентрации 0.1-0.3 мкМ вызывает дилатацию желудочно-сальниковой артерии [8]. В литературе нам удалось найти единственную работу, в которой было показано потенцирующее действие норадреналина на нейрогенную констрикцию кровеносных сосудов. Это работа Su (1980), показавшего в опытах на сосудах кролика, что норадреналин в концентрации 0.1 – 1 мкМ значительно увеличивает реакцию брыжеечной артерии на электростимуляцию с частотой 8 Гц, незначительно – плечевой артерии, но уменьшает нейрогенную констрикцию ушной и легочной артерии. Следует заметить, что в указанной выше работе Su потенцирующее действие норадреналина сопровождалось уменьшением его выброса из нервных окончаний и не зависело от обратного захвата норадреналина, а также от пресинаптических β-адренорецепторов. Автор делает вывод о том, что возможным механизмом описанного потенцирующего эффекта норадреналина является частичная деполяризация мембраны сосудистых гладкомышечных клеток, облегчающая нейрогенное сокращение этих клеток. Не исключено, что такой же механизм может лежать в основе описанного нами феномена восстанавливающего действия норадреналина, а происходящая при ацидозе гиперполяризация [6] является причиной того, что только высокие концентрации норадреналина вызывают достаточно большую деполяризацию, облегчающую нейрогенное сокращение.

Снижение pH раствора с 7.4 до 6.6 в наших опытах вызывало значительное уменьшение нейрогенной вазоконстрикции. Несмотря на то, что ацидоз давно считается одним из классических вазодилататорных агентов в метаболическом звене регуляции кровотока, влияние ацидоза на нейрогенный сосудистый тонус практически, не изучено. Имеются лишь сведения о небольшом угнетающем влиянии ацидоза на нейрогенную сократительную реакцию сосудов перфузируемой тонкой кишки [4] и бедренной кости собаки [5]. Кроме того, на изолированной

подкожной вене собаки при ацидозе было обнаружено снижение величины реакции этого сосуда на электростимуляцию его нервов [10]. При изучении этого вопроса нами ранее на изолированной брыжеечной и хвостовой артерии крысы, было впервые показано угнетающее влияние ацидоза на нейрогенную сократительную реакцию этих сосудов, вызванную электростимуляцией с частотой 10 Гц. Это влияние в значительной степени было обусловлено увеличением синтеза NO [1], однако, кроме того, оно могло реализовываться через различные механизмы, связанные с функционированием нервных, эндотелиальных и гладкомышечных клеток [3]. В частности, при ацидозе могло уменьшаться действие выделяющегося вазоконстрикторного медиатора на гладкомышечные клетки сосудов через постсинаптические адренорецепторы [7].

Нами было показано, что при ацидозе потенцирующее действие норадреналина на нейрогенную вазоконстрикцию лучше проявляется при более высоких концентрациях норадреналина. Как известно, состояние ацидоза возникает, в частности, при физической работе, которая сопровождается усилением частоты импульсации в симпатических нервах и повышением концентрации норадреналина. Можно предположить, что обнаруженный нами феномен может иметь значение для перераспределения кровотока от менее жизненно-важных областей, подобных тем, которые питает хвостовая и брыжеечная артерия крысы, к областям, более жизненно-важным в условиях активной работы скелетных мышц.

Выводы.

1. В опытах на сегментах хвостовой и брыжеечной артерии крыс показано, что норадреналин восстанавливает нейрогенную вазоконстрикцию после ее спонтанного или вызванного ацидозом снижения.

2. На фоне ацидоза потенцирующее действие норадреналина на нейрогенную вазоконстрикцию было более значительным и лучше проявлялось при более высоких концентрациях норадреналина, что может иметь значение для перераспределения кровотока в пользу более жизненно-важных областей при мышечной работе, сопровождающей ацидозом и повышением концентрации норадреналина.

Литература

1. Караченцева О.В., Ярцев В.Н., Дворецкий Д.П. Норадреналин способен восстанавливать сниженную нейрогенную вазореактивность // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова – 2008. – Т.94, №1. – С. 37-44.
2. Borovsky V., Herman M., Dunphy G., Caplea A., Ely D. CO2 asphyxia increases plasma norepinephrine in rats via sympathetic nerves // Am. J. Physiol. – 1998. – V.274, N1. – P. R19-22.
3. Celotto A.C., Capellini V.K., Baldo C.F., Dalio M.B., Rodrigues A.J., Evora P.R. Effects of acid-base imbalance on vascular reactivity // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2008. – V.41, N6. – P. 439-445.
4. Chen L.Q., Shepherd A.P. Role of H+ and alpha 2-receptors in escape from sympathetic vasoconstriction // Am. J. Physiol. – 1991. – V.261, N3. – P. H868-873.
5. Davis T.R., Wood M.B. The effects of acidosis and alkalosis on long bone vascular resistance // J. Orthop. Res. – 1993. – V.11, N6). – P. 834-839.
6. Hessellund A., Aalkjaer C., Bek T. Effect of acidosis on isolated porcine retinal vessels // Curr. Eye Res. – 2006. – V.31, N5. – P. 427-434.
7. Ives S.J., Andtbacka R.H., Noyes R.D., Morgan R.G., Gifford J.R., Park S.Y., Symons J.D., Richardson R.S. α1-Adrenergic responsiveness in human skeletal muscle feed arteries: the impact of reducing extracellular pH // Exp. Physiol. – 2013. – V.98, N1. – P. 256-267.
8. Medina P., Segarra G., Peiro M., Flor B., Martinez-Leon J.B., Vila J.M., Lluch S. Influence of nitric oxide on neurogenic contraction and relaxation of the human gastroepiploic artery // Am. J. Hypertens. – 2003. – V.16, N1. – P. 28-32.
9. Su *C.* Potentiative effects of alpha agonistic sympathomimetic amines on vasoconstriction by adrenergic nerve stimulation // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1980. – V.215, N2. – P. 377-381.
10. Verbeuren T.J., Janssens W.J., Vanhoutte P.M. Effects of moderate acidosis on adrenergic neurotransmission in canine saphenous veins // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1978. – V.206, N1. – P. 105-114.

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА И МЕТГЕМОГЛОБИНЕМИЯ

Топунов А.Ф., Космачевская О.В.
Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
aftopunov@yandex.ru

Резюме

Проведено обобщение современных представлений о процессах ферментативного восстановления гемоглобина и гемоглобинподобных белков, а также о свойствах и функционировании ферментов, катализирующих этот процесс. Обсуждается распространение наследственной метгемоглобинемии – заболевания, вызванного недостаточной активностью данных ферментов в организме. Предложены наиболее перспективные направления будущих исследований в данной области, которые могут дать новые важные результаты для объяснения механизмов указанных процессов и для их использования в медицинской диагностике.

Ключевые слова: гемоглобин, кровь, метгемоглобинемия,метгемоглобинредуктаза, цитохром b_5-редуктаза.

METHEMOGLOBINEMIA AND THE ENZYMATIC REDUCTION OF HEMOGLOBIN

Topunov A.F., Kosmachevskaya O.V.
Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation
aftopunov@yandex.ru

Abstract

The generalization of modern ideas on the process of enzymatic reduction of hemoglobin and hemoglobin-like proteins, and on properties

and functioning of the enzymes catalyzing this process, has been done. The spread of hereditary methemoglobinemia – the disease, caused by insufficient activity of these enzymes in the organism is discussing. The most perspective lines of future studies in this field possible to give new important results for description of the named processes and for their use in medical diagnostics have been proposed.

Key words:hemoglobin, blood, methemoglobinemia, methemoglobin reductase, cytochrome b_5 reductase.

Введение. Известно, что гемоглобины (Hb) могут функционировать как кислородсвязывающие и кислородпереносящие белки лишь в физиологически активном восстановленном состоянии, когда железо гема двухвалентно. Необходимы системы, восстанавливающие такие белки, поскольку в живых организмах действуют многочисленные окисляющие факторы. Наиболее важным процессом, необходимым для поддержания кислородпереносящих гемопротеидов в физиологически активном состоянии, является их ферментативное восстановление.

Многими исследователями проводились работы по поиску и выделению редуктаз, восстанавливающих гемоглобины. В то время, как для гемоглобина крови позвоночных такие редуктазы известны давно, ферменты, восстанавливающие миоглобин (Mb) и легоглобин (симбиотический кислородсвязывающий гемопротеид клубеньков бобовых), были выделены существенно позже. По данному вопросу имеется большое количество публикаций, однако в литературе очень мало работ по сравнению этих ферментов. В 1989 г. мы опубликовали обзор, в котором была сделана попытка провести сравнительный анализ данных по ферментам, восстанавливающим гемоглобин, миоглобин и легоглобин из разных организмов [4]. Однако за прошедшие с этого времени почти 30 лет кардинально изменились представления как о распространении гемоглобинов в живой природе, так и об особенностях их функционирования [1]. Даже в организме человека были описаны «новые» гемоглобины: нейро-, цито- и андроглобин, а «старые» (например, Mb) обнаружены в тканях, где ранее их присутствие было неизвестно.

Целью работы было обобщение современных представлений о процессах ферментативного восстановления гемоглобина и гемогло-

бин-подобных белков, о ферментах, катализирующих данный процесс, о распространении метгемоглобинемии – заболевания, вызванного недостаточной активностью этих ферментов в организме, а также обсуждение направлений и перспектив возможных исследований, необходимых для выяснения этих вопросов, в том числе для медицинской диагностики.

Редуктазы, восстанавливающие гемоглобины. Историю изучения редуктаз, восстанавливающих кислородпереносящие гемопротеиды, следует вести с начала исследований метгемоглобинемии — заболевания, связанного с тем, что значительная часть гемоглобина находится в окисленной форме (метгемоглобин, Hb^+), не способной к транспорту кислорода. Еще в 1920-е годы было показано, что метгемоглобин (MetHb) отличается от нормального гемоглобина валентностью железа гема ((II) у нормального, (III) у MetHb), что явилось очень важным фактом для исследования процесса восстановления Hb^+. Была высказана гипотеза, что эритроциты больных метгемоглобинемией недостаточно способны к восстановлению Hb+, который нормально образуещегося в клетках.

В работе Скотта и Гриффита 1959 г. [9] было описано отсутствие фермента, восстанавливающего Hb^+ с NADH в качестве донора электронов, в эритроцитах больных с наследственной метгемоглобинемией. Именно эту работу можно считать началом исследований метгемоглобин-редуктазы (мет-Hb-редуктазы), фермента, восстанавливающего окисленный гемоглобин. Многими исследователями проводились работы по поиску и выделению таких редуктаз. Были выделены как NADH-, так и NADPH-зависимые мет-Hb-редуктазы, как растворимые, таки мембраносвязанные. Мы, как и многие другие исследователи, полагаем, что важнейшую роль в восстановлении гемоглобина играет растворимая NADH-зависимая мет-Hb-редуктаза).

Важным этапом в изучении процесса ферментативного восстановления Hb явилось установление идентичности мет-Hb-редуктазы и цитохром b_5-редуктазы. Было показано, что цитохром b_5-редуктаза эритроцитов способна восстанавливать окисленный Hb^+ при участии NADH как донора электронов и цитохрома b_5 как промежуточного переносчика электронов. Была показана идентичность NADH-мет-Hb-

редуктазы эритроцитов и цитохром b_5-редуктазы других тканей и органов [7]. Мет-Hb-редуктаза и цитохром b_5-редуктаза внесены в номенклатуру ферментов как один и тот же фермент под названием NADH: феррицитохром b_5-оксидоредуктаза (К.Ф.1.6.2.2.). Таким образом, мет-Hb-редуктаза восстанавливает цитохром b_5, который, уже неэнзиматически, восстанавливает Hb^+.

Было высказано предположение, что при восстановлении миоглобина цитохром b_5 также может функционировать как физиологический переносчик электронов. Действительно, было показано, что мет-Mb-редуктаза сердечной мышцы является НАДН-цитохром b_5-редуктазой, восстанавливающей Mb^+ с участием цитохрома b_5 в качестве переносчика электронов. Нами было показано, что и восстановление легоглобина может идти через цитохром b_5.

Механизм восстановления Mb^+ аналогичен механизму восстановления Hb^+ растворимой мет-Hb-редуктазой. Было показано что растворимый цитохром b_5 восстанавливает метгемоглобин до активного Hb через межбелковый электронтранспортный комплекс, и аналогичная реакция проходит с миоглобином. Поведение таких комплексов подчиняется правилу динамического докинга: слабосвязанные белок-белковые комплексы должны осуществлять быстрый электронный обмен, но только немногие из возможных комплексов могут быть активными. В случае восстановления Hb^+ и Mb^+ только один из возможных комплексов может осуществлять необходимую реакцию [10].

Метгемоглобинемия. Как было отмечено выше, такое заболевание, как метгемоглобинемия, связано с тем, что значительная часть Hb находится в окисленном состоянии и не способна переносить кислород. При этом заболевании содержание MetHb в крови превышает физиологическую норму (1–2% от общего Hb). Повышение его доли до 10% обычно не дает клинических проявлений. При 10–20% появляется цианоз слизистых и кожных покровов, общая слабость, недомогание, головные боли, 30–50% – боли в сердце, одышка, резко выраженный цианоз, повышенная вязкость крови. Содержание MetHb >70% летально.

Метгемоглобинемия может быть вызвана действием многих химикатов, в том числе лекарств, связана с различными заболеваниями, а также может иметь место без явной причины. В 1930-е годы было вы-

сказано предположение о возможности существования наследственной врожденной метгемоглобинемии. Выполнены работы, в которых изучали проявление наследственной метгемоглобинемии у представителей одной и той же семьи. Есть и достаточно известные отдельные семьи с наследственной метгемоглобинемией, описанные как в научной, так и в популярной литературе. В качестве примеров можно привести так называемых «голубых Фугатов» (blue Fugates) из штата Кентукки (США) и «голубых людей из Лургана» (blue men of Lurgan) (Северная Ирландия) [5].

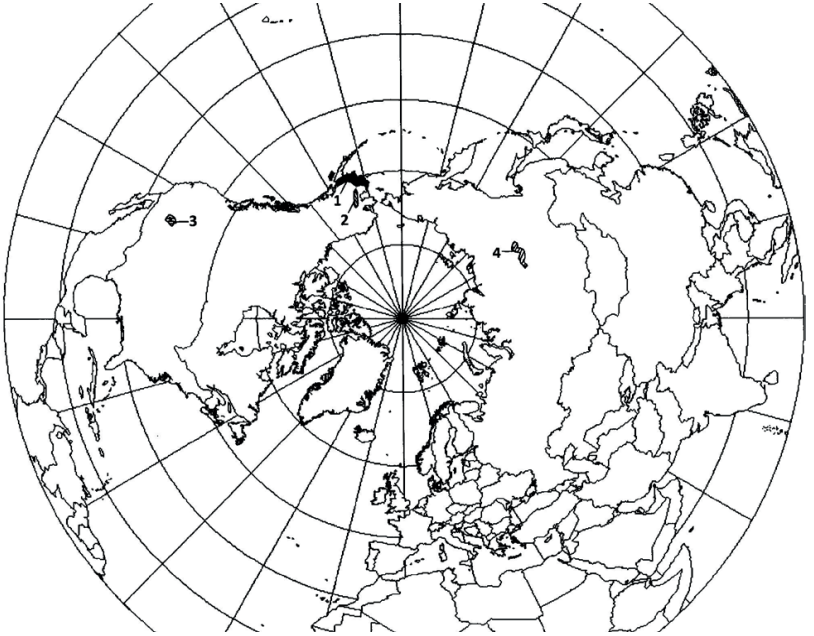


Рис. 1. *Места проживания групп населения с повышенным распространением метгемоглобинемии. 1 – эскимосы Аляски; 2 – индейцы-алгонкины Аляски; 3 – индейцы навахо; 4 – якуты бассейна реки Вилюй*

На рис. 1 показана составленная нами карта эндемичных зон распространения наследственной метгемоглобинемии. Этническими группами, у которых обнаружено высокое распространение этого за-

болевания, являются эскимосы и индейцы-атабаски Аляски, индейцы навахо и якуты бассейна реки Вилюй. Как видно из рисунка, все они живут в Северном полушарии, причем в районах Крайнего Севера, кроме индейцев навахо, однако и их присутствие в этом списке не случайно. Навахо и атабаски относятся к одной языковой семье (на-дене), и в места сегодняшнего проживания они переселились из Аляски и Северо-Западной Канады в 14-м веке.

В России наследственная метгемоглобинемия отмечена только в виде эндемических очагов в Якутии в районе реки Вилюй [2]. У коренных жителей республики (якутов-саха) необычайно высокое распространение этого заболевания, её частота составляет 1:5700 человек, т.е. каждый 37-й якут является гетерозиготным носителем наследственной метгемоглобинемии. Накопление этого заболевания могло произойти благодаря так называемому «эффекту основателя» – популяционно-генетическому явлению, связанному с ограниченной репродуктивной численностью у предковых изолированных популяций. Молекулярно-генетические исследования якутских больных не подтвердило наличие 3-х точковых мутаций гена NADH-цитохром-b_5-редуктазы, встречающихся в Азии у японцев и китайцев, то есть заболевание не было занесено оттуда.

Интересно, что в 1950-е годы повышенное распространением наследственной метгемоглобинемии было описано лишь у эскимосов Аляски и их соседей атабасков, поэтому не исключено, что будут описаны и другие группы с повышенным распространения наследственной метгемоглобинемии. Мы полагаем, что в первую очередь это могут быть эскимосы, живущие в других регионах, или другие индейские народы, родственные атабаскам и навахо. Могут быть перспективными и исследования других изолированных популяций, у которых может проявляться «эффект основателя».

Так как цитохром b_5-редуктаза эритроцитов (мет-Hb-редуктаза) идентична цитохром b_5-редуктазе других тканей, существует два типа недостаточности этого фермента: «эритроцитарный», когда недостаточность наблюдается только в эритроцитах, и «основной», когда она наблюдается также и в других тканях; генетические механизмы этих проявлений пока до конца не выяснены. Особо выделяется метгемоглобинемия, связанная с умственной неполноценностью больных [8].

Такое нарушение может быть связано с тем, что цитохром b_5-редуктаза, как и цитохром b_5, участвуют в обмене жирных кислот, и при недостаточной активности фермента происходит нарушение такого обмена, что пагубно сказывается на деятельности нервных клеток.

Интересно, что еще одна энзимопатия – дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (фабизм) является фактором риска для приобретенной метгемоглобинемии, поэтому популяции, для которых она характерна (средиземноморского и африканского происхождения), обладают повышенным риском для проявления метгемоглобинемии данного типа.

Выводы. Рассматриваякак полученные нами, так и литературные данные, можно сделать заключение, что ферменты, восстанавливающие кислородсвязывающие гемопротеиды, являются, как правило, NADH-зависимыми FAD-содержащими оксидоредуктазами. Многие их них восстанавливают гемоглобины через цитохром b_5 как промежуточный переносчик электронов. Поэтому при поиске ферментов, восстанавливающих «новые» гемоглобины, необходимо в первую очередь проводить поиск среди подобных редуктаз.

Как ни странно, несмотря на активное изучение таких «новых» и потенциально важных Hb, как нейроглобин в нервных клетках, цитоглобин в различных тканях и андроглобин в мужских гонадах, пока не проводилось серьезных работ по ферментативному восстановлению этих белков. Мы полагаем, что, поскольку цитохром b_5-редуктаза присутствует во многих тканях организма, то в первую очередь необходимо проверить возможность её функционирования для восстановления и этих гемоглобинов. То же относится и к поддержанию в восстановленном состоянии миоглобина в опухолевых клетках, где, как недавно выяснилось, он также может синтезироваться.

Укажем на еще одно возможное поле для исследований в данной области. В последнее время активизировалось изучение процессов модификации гемоглобина, в том числе под действием окислительного, нитрозативного и карбонильного стрессов [6], а это может происходить как при многих заболеваниях, так и при старении. Образующиеся в этих случаях модифицированные гемоглобины (гликозилированный, нитро- и нитрозо-Hb, а также мембраносвязанный Hb) по-другому

подвергаются процессам окисления и восстановления, однако и этот факт изучен крайне слабо.

Упомянем еще один факт. В настоящее время активно развивается такое направление медицины, как компьютерная диагностика. Нами совместно с НИЯУ МИФИ и Российским онкологическим центром им. Н.Н. Блохина ведется работа по созданию компьютерное экспертной системы для диагностики гемоглобинопатий разного генеза. Создана пилотная версия такой системы [3]. Количество показателей состояния гемоглобина, используемых в данной системе, может быть увеличено. Мы полагаем, что такие показатели, как доля окисленного Hb (как и упомянутых выше его модифицированных форм), могут быть включены в разрабатываемую экспертную систему для расширения возможностей ее использования и повышения точности диагноза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты 15-04-08891 и 15-36-01024).

Литература

1. Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Гемоглобины – разнообразие структур и функций // Прикл. биохимия и микробиология. – 2009. – Т.45, №6. – С. 627-653.
2. Наследственные анемии и гемоглобинопатии. (Ред.: Токарев Ю.Н., Холлан С.Р., Корраля-Альмонте Х.С.) – М.: Медицина, 1983. – 336 с.
3. Насыбуллина Э.И., Никитаев В.Г., Проничев А.И., Блиндарь В.Н., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Экспертная система диагностики гемоглобинопатий с использованием данных о состоянии крови, эритроцитов и гемоглобина // Краткие сообщения по физике. – 2015. – Т.42, №7. – С. 22-27.
4. Топунов А.Ф., Голубева Л.И. Редуктазы, восстанавливающие кислородпереносящие гемопротеиды: гемоглобин, миоглобин и легоглобин // Успехи биологической химии. – 1989. – Т.30. – С. 239-252.
5. Deeny J. The End of an Epidemic. – Dublin: A. & A.Farmar, 1995. – 254 p.
6. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. Formation of nitri- and nitrosylhemoglobin in systems modeling the Maillard reaction // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. – 2014. – V.52, N1. – P. 161-168.
7. Kuma F., Prough R.A., Masters B.S.S. Studies onmethemoglobin reductase. Immunochemical similarity of soluble methemoglobin reductase and cytochrome b_5 of human erythrocytes with NADH-cytochrome b_5 reductase

and cytochrome b_5 of rat liver microsomes // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1976. – V.172, N2. – P. 600-607.
8. Mansouri A. Methemoglobinemia // American Journal of Medical Sciences. – 1985. – V.289, N5. – P.200-209.
9. Scott E.M., Griffith I.V. The enzymatic defect of hereditary methemoglobinemia: diaphorase // Biochimica et Biophysica Acta. – 1959. – V. 34, N2. – P. 584-586.
10. Wheeler K.E., Nocek J.M., Cull D.A., Yatsunyk L.A., Rosenzweig A.C., Hoffman B.M. Dynamic docking of cytochrome b_5 with myoglobin and α-hemoglobin: heme-neutralization "Squares" and the binding of electron-transfer-reactive configurations // Journal of American Chemical Society. – 2007. – V.129, N13. – P. 3906-3917.

РОЛЬ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ГЕМОГЛОБИНА В АДСОРБЦИОННОМ МЕХАНИЗМЕ АДАПТАЦИИ КЛЕТКИ

[1]Космачевская О.В., [1]Насыбуллина Э.И., [2]Блиндарь В.Н., [1]Топунов А.Ф.

[1]Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

[2]Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

E-mail: rizobium@yandex.ru

Резюме

Перераспределение гемоглобина из растворимого в мембраносвязанное состояние имеет множественное биологическое значение. Разработанаспектрофотометрическая методика оценки гемоглобина, необратимо связанного с мембранами эритроцитов. В модельных экспериментах с суспензией эритроцитов были установлены диапазоны значений мембраносвязанного гемоглобина, которым соответствует повышенная устойчивость эритроцитов к окислительному гемолизу. Предложено рассматривать уровень мембраносвязанного гемоглобина в качестве дополнительного критерия оценки функционального состояния эритроцитов при эндогенной интоксикации.

Ключевые слова:мембраносвязанный гемоглобин, эритроциты, адсорбционный механизм адаптации.

THE ROLE OF ERYTHROCYTIC HEMOGLOBIN IN ADSORPTION MECHANISM OF CELL ADAPTATION

[1]Kosmachevskaya O.V., [1]Nasybullina E.I., [2]Blindar V.N., [1]Topunov A.F.

[1]Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[2]Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

E-mail: rizobium@yandex.ru

Abstract

The redistribution of hemoglobin from soluble to membrane-bound state has multiple biological importance. Spectrophotometric method of the estimation of hemoglobin irreversibly bound to the membrane in erythrocytes was elaborated. The diapasons of membrane-bound hemoglobin values with increased erythrocytes resistance to oxidative haemolysis were estimated in the model experiments with erythrocyte suspension. The level of membrane-bound hemoglobin was proposed to be used as an additional criterion for estimation of erythrocyte functional state at the endogenous intoxication conditions.

Key words: membrane-bound hemoglobin, erythrocytes, adsorption mechanism of the adaptation.

Введение. Для сохранения своего гомеостаза живой организм должен обладать сигнальным механизмом, информирующем о состоянии внутренних систем и окружающей среды. Ответная реакция живой системы на внешнее воздействие слагается из неспецифической и специфической компоненты. Неспецифическая реакция обеспечивается иерархически более низкими, а, следовательно, и эволюционно более древними, регуляторными механизмами. Одним из таких механизмов

является обратимый переход белков из растворимого в мембраносвязнное состояние. Это так называемый адсорбционный механизм регуляции [5]. Обратимая адсорбция ферментов позволяет регулировать их каталитическую активность и стабильность. Идея о том, что обратимое связывание ферментов с субклеточными структурами имеет регуляторное значение, была впервые высказана академиком А.И. Опариным.

Эритроциты млекопитающих, лишенные ядра, являются удобной моделью для изучения адсорбционного механизма регуляции. Связывание гемоглобина (Hb) с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 способствует переходу ферментов гликолиза в цитозоль и росту их активности. В результате этого повышается энергетический заряд клетки. Параметры энергетического обмена определяют метаболическую стратегию клетки, а в случае одноклеточных организмов и жизненную стратегию. Несмотря на то, что зрелый эритроцит лишен транскрипционного и трансляционного аппаратов, в нем имеются механизмы настройки функционального состояния в зависимости от внешних условий, реализующиеся за счет адсорбционного механизма.В интактных эритроцитах гемоглобин может существовать в растворимой и мембраносвязанной формах (MBHb – Membrane-Bound Hemoglobin). Данные последних лет показывают, что связывание Hb с компонентами мембраны имеет множественное биологическое значение.Это регуляция метаболизма глюкозы и свойств цитоскелета в зависимости от концентрации кислорода, а также формирование сигнала об окислительном повреждении и старении эритроцита [9, 10]. Повышенное количество MBHb может быть связано со многими болезнями системы крови, вызванными не только нарушениями структуры молекулы гемоглобина, но и нарушениями в системе антиоксидантной защиты и действием различных ксенобиотиков, окислительных и гликирующих агентов [10]. Несмотря на многочисленные исследования свойств и функций MBHb, до сих пор нет полного понимания биологического смысла перехода гемоглобина из растворимого в мембраносвязанное состояние.На основании анализа данных литературы и собственных умозаключений мы высказываем гипотезу, согласно которой гемоглобин выступает в роли метаболического «реостата», регулирующего чувствительность и устойчивость эритроцита.

Целью нашей работы было изучение взаимосвязи между уровнем мембраносвязанного гемоглобина и устойчивостью эритроцитов.

Методы исследования. Мембраносвязанный гемоглобин определяли по разработанному нами методу. Для анализа брали 100 мкл крови, производили отмывку эритроцитов от компонентов плазмы в 1 мл фосфатно-солевого буфера и затем полностью гемолизировали. Тени эритроцитов, содержащие гемоглобин, отделяли центрифугированием при 5000 g в течении 5 мин. К двукратно отмытым теням добавляли 100 мкл воды и 450 мкл 30% щелочного раствора пиридина. После полного растворения осадка определяли концентрацию связанного с мембранами гемоглобина пиридингемохромным методом. Для этогонепосредственно перед измерением раствор Hb в пиридине восстанавливали дитионитом натрия. Измеряли оптическое поглощение восстановленного пиридингемохромогена при 556 и 539 нм и рассчитывали концентрацию гемопротеидов по формуле С(мг/мл) = $(A_{556}-A_{539})\times 3{,}86$.

В работе использовали эритроциты, полученные из донорской крови, стабилизированной цитратом натрия. Эритроциты отмывали непосредственно перед опытом от компонентов плазмы пятикратным объемом изотонического раствора в фосфатно-солевом буфере, содержащем 10 мМ Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl (pH 7,4)1 мМ $CaCl_2$, 0,5 мМ $MgCl_2$. Отмытые эритроциты использовали для приготовления суспензии с гематокритом 0,2. В качестве среды инкубирования использовали тот же раствор, дополнительно содержащий 5 мМ глюкозы.

Устойчивость эритроцитов изучали в экспериментальной модели, представляющей собой отмытую суспензию эритроцитов. Гемолиз эритроцитов индуцировали добавлением хлорноватистой кислоты (HOCl/OCl^-) в различных концентрациях (20, 100, 200, 400 мкМ) к суспензии эритроцитов в фосфатно-солевом буфере с добавлением глюкозы. Эритроциты инкубировали в течении 20 мин при 37 °С при постоянном медленном перемешивании, затем центрифугировали при 1200 g в течении 10 мин. В супернатанте и в осадке определяли концентрацию гемоглобина как описано выше.

Результаты и их обсуждение. Для того, чтобы понять, как оба параметра, устойчивость и доля MBHb, связаны между собой, мы провели две серии экспериментов. В первой серии мы изучали дозозависи-

мый гемолиз эритроцитов, индуцированный хлорноватистой кислотой ($HOCl/OCl^-$). Хлорноватистая кислота является предшественником свободных радикалов и важнейшей составляющей бактерицидной системы организма человека и животных. Кривые, отражающие изменение уровня гемолиза и MBHb являются зеркальным отражением друг друга. Такой характер взаиморасположения кривых указывает на существование связи между двумя параметрами. Колебаниям MBHb в диапазоне концентраций 3,3 – 4,25% соответствует область повышенной устойчивости клеток к гемолизу. Возрастание гемолиза, превышающего контрольный уровень, сопровождается снижением MBHb.

На следующем этапе была проведена серия экспериментов с суспензией отмытых эритроцитов, полученных из цельной крови пациентов РОНЦ РАМН,получавшие лечение химиотерапевтическими препаратами. Отмытые от компонентов плазмы эритроциты инкубировали в присутствии $HOCl/OCl^-$ в течение 20 мин, и затем в пробах определяли степень гемолиза по концентрации вышедшего в раствор Hb (SHb – soluble Hb) и уровень MBHb по описанной выше методике. В зависимости от образца были получены различные пары значений для SHb и MBHb, которые ранжировали в порядке увеличения MBHb. В ходе анализа полученных данных была выявлена зависимость между степенью окислительного гемолиза эритроцитов и уровнем MBHb, которая имела сложный нелинейный характер. На кривой зависимости SHb от MBHb, можно выделить пять концентрационных диапазона MBHb: 1 – до 0,7%; 2 – 0,7-2,2%; 3 – 2,3–3,3%; 4 – 3,3-4,9% и 5 – от 4,9%. Второму (0,7-2,2%) и четвертому (3,3-4,9%) диапазону соответствует степень гемолиза, не превышающая уровень, допустимый для эритроцитарных суспензий в искусственных средах. Эти зоны обозначены как зона стабилизации I и зона стабилизации II. Снижение MBHb до уровня первой зоны мы рассматриваем как адаптационный процесс, направленный на активацию пентозофосфатного пути, в котором синтезируется NADPH – кофактор антиоксидантных ферментов. Повышение гемолитической устойчивости в этой зоне можно объяснить стимуляцией антиоксидантной функции клеток. По данным ряда работ, содержание MBHb в эритроцитах в норме составляет ~ 4%. Основываясь на этих фактах, вторая зона стабилизации была принята за норму.

Уровень гемолиза, соответствующий первой зоне стабилизации, в среднем ниже уровня гемолиза второй зоны. Это дает основание предположить, что снижение MBHb до 2,2% переводит клетки на другой, более низкий уровень реактивности. В поддержку этого тезиса можно привести факт об увеличении осмотической резистентности истощенных по АТФ эритроцитов человека [2].

Несмотря на отсутствие в эритроцитах ядерного и белоксинтезирующего аппаратов, эти клетки обладают многоуровневой способностью к адаптации [4, 6]. В отличие от ядросодержащих клеток, адаптационные возможности эритроцитов млекопитающих ограничены цитоплазматическими механизмами. Основу цитоплазматических механизмов клеточного ответа составляют обратимые кооперативные фазовые переходы белков, взаимодействие их с мембраной, изменения в мембранных белках и белках цитоскелета, а также нарушение проницаемости мембраны. Эти механизмы есть не что иное, как проявление филогенетически древней программы реагирования клетки на различные факторы, известной как «неспецифический адаптационный синдром клеточной системы» [1].

Показанное в экспериментах повышение гемолитической устойчивости эритроцитов при действии $HOCl/OCl^-$, как мы полагаем, является иллюстрацией неспецифического ответа клетки на действие различных окислителей, ксенобиотиков или биологически активных веществ. Молекулярный механизм этой устойчивости, вероятно, связан, с перестройками в мембране и цитоскелете, направленными на увеличение ее жесткости. Существенный вклад в увеличение жесткости мембраны вносят белковые примембранные слои [8]. Связанное с увеличением прочности снижение деформируемости мембраны негативно сказывается на функциональных свойствах эритроцита, и его способности выдерживать деформационные напряжения при прохождении через капилляр. В какой мере обозначенные процессы можно отнести к компенсаторно-приспособительным физиологическим ответам клетки или к патологии, остается под вопросом. Может быть, в некоторых случаях клетка включает древние адаптационные механизмы, эволюционно сформировавшиеся еще у одноклеточных форм, и поэтому не учитывающие или даже противоречащие интересам многоклеточного

организма. То есть компенсаторно-приспособительный с точки зрения клетки процесс может быть предпосылкой для развития патологического с точки зрения целостного организма процесса.

На следующей стадии было проведено сравнительное исследование образования МВНb у здоровых доноров и онкологических больных с использованием разработанной методики. Материал для исследования был предоставлен клинико-диагностической лабораторией РОНЦ РАМН. По данным обобщенной выборки, пациенты, которые получали химиотерапию, характеризуются более высоким уровнем МВНb по сравнению со здоровыми донорами. Анализ уровня МВНb у онкобольных показал, что в 61% случаев наблюдается отклонение от нормы (свыше 4,9 %), что может свидетельствовать о развитии либо компенсаторного процесса, либо хронической эндогенной интоксикации. В контрольной группе отклонение от нормального диапазона наблюдалось у 38% обследованных. Различия носят достоверный характер ($t=1,7$; $p<0,05$).

Сдвиг содержания МВНb у онкобольных в сторону превышения диапазона нормальных значений можно объяснить как с позиций развития интоксикации, вызванной приемом противоопухолевых препаратов, так и с позиций развития адаптации к анемии, сопровождающей болезнь. Этиология анемии у онкологических больных многофакторна и обусловлена не только нарушениями эритропоэза и обмена железа, но и сдвигами метаболического статуса клеток и дестабилизацией клеточной мембраны в условиях действия окислителей и ксенобиотиков. Как хорошо известно, причина развития гемолитической анемии, вызванной лекарственными препаратами, связана с преждевременным удалением макрофагами поврежденных эритроцитов из кровеносного русла. Этот процесс во многом обусловлен образованием в эритроцитах активных форм кислорода под действием гемолитических агентов [9]. Показано, что ключевую роль в формировании «сигналов смерти» играет фракция мембраносвязанного гемоглобина, состоящая из окисленной и денатурированной форм Hb [7]. В данном случае повышение уровня МВНb можно рассматривать как процесс, направленный на элиминацию поврежденных эритроцитов, т.е. предшествующий анемии.

Заключение. Уровень МВНb в эритроцитах можно рекомендовать к использованию в клинической диагностике в качестве дополнительного биохимического показателя выраженности интоксикационного синдрома. Также уровень МВНbможет учитываться как дополнительный показатель для диагностики заболеваний системы кровообращения, метаболической патологии и индивидуальной реактивности организма. В частности, этот показатель учитывается в разрабатываемой нами компьютерной экспертно-диагностической системе «BLOOD».

В завершении приведем слова лауреата Нобелевской премии А. Сент-Дьёрдьи: «В основе живой природы лежит относительно небольшое число фундаментальных принципов, мудро приспособленных для самых разнообразных целей» [3]. Одним из таких принципов является переход белков из растворимого в мембраносвязанное состояние. Как было показано школой А.И. Опарина, адсорбционный механизм регуляции активности ферментов работает и в гелеподобных структурах (коацерватах), что является свидетельством эволюционной древности данной «системы быстрого реагирования» клетки.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, отделение гуманитарных и общественных наук (РФФИ-ОГОН, ранее РГНФ), грант № 15-36-01024.

Литература

1. *Браун А.Д., Моженок Т.П.* Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. – Л.: Наука, 1987. – 232 с.
2. *Шпакова Н.М., Нипот Е.Е., Орлова Н.В., Александрова, Д.И., Шапкина О.А.* Осмотическая чувствительность эритроцитов млекопитающих после их истощения по АТФ // Доповіді Національної академії наук України – 2013. – №1. – С. 151-155.
3. *Сент-Дьёрдьи А.* Биоэлектроника. Исследование в области клеточной регуляции, защитных механизмов и рака. Пер. с англ. – М.: Мир, 1971. – 80 с.
4. *Karaman Yu.K., Novgorodtseva T.P., Zhukova N.V.* Blood erythrocyte lipids in conditions of adaptation to alimentary stress-factors of rats // International journal of applied and fundamental research – 2009. – V.2. – P. 15-16.
5. *Kurganov B.I.* Control in reversibly adsorptive enzyme systems. // Organized multienzyme systems: catalytic properties. Ed. Welch G.R. – N.Y. etc.: Acad. Press, 1985. – P. 263-267.

6. *Martusevich A.A., Deryugina A.V., Martusevich A.K.* Functional state of rat's erythrocytes under different stress conditions // Journal of Stress Physiology &Biochemistry – 2016. – V.12. – P. 5-11.
7. *McMillan D.C., Powell C.L., Bowman Z.S., Morrow J.D., Jollow D.J.* Lipids versus proteins as major targets of pro-oxidant, direct-acting hemolytic agents. // Toxicological Sciences – 2005. – V.88. – P. 274–283.
8. *Mendanha S.A., Anjos J.L.V., Silva A.H.M., AlonsoA.*Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide. // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2012. – V.45. – P. 473-481.
9. *Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M.* Red blood cell oxidative stress impairs delivery and induces red blood cell aging. // Frontiers in Physiology – 2014. – V.5. e84. doi: 10.3389/fphys.2014.00084.

*van Zwieten R.,Verhoeven A.J.,Roos D.*Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. // Free. Radic. Biol. Med.– 2014. – V.67. – P. 377–386.

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ СОСТОЯНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНО-ТКАНЕВОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ СОВМЕЩЕНИЯ ЛАЗЕРНЫХ СПОСОБОВ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОТКАНИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ПРОБЫ

Сидоров В.В.
ООО Научно производственное предприятие «ЛАЗМА»
Москва, Россия
victor.v.sidorov@gmal.com

Резюме

Разработан метод диагностики микроциркуляторно-тканевой системы, включающей микроциркуляцию кровотока, лимфотока и окислительный метаболизм, с применением функциональных температурных проб: охлаждением и нагревом. Метод направлен на изучение адаптации ткани при температурных тестах для оценки энергетического обеспечения метаболизма. Определены контрольные значения

диагностических показателей для возрастных групп. С помощью указанного метода зарегистрировано улучшение энергетического обеспечения метаболизма при индивидуальном подборе терапии у диабетических больных сахарным диабетом 2 типа.

Ключевые слова: микроциркуляция, коферменты окислительного метаболизма, лазерная допплеровская флоуметрия, лазерная флуоресцентная спектроскопия, функциональная температурная проба, сахарный диабет.

THE DIAGNOSTIC METHOD FOR STUDY MICROCIRCULATION-TISSUE SYSTEM BASED ON THE COMBINATION OF THE LASER METHODS AND THE FUNCTIONAL TEMPERATURE PROBES

Sidorov V.V.
SPE "LAZMA" Ltd
Moscow, Russia
victor.v.sidorov@gmal.com

Abstract

A method has been developed for diagnosis the microcirculatory-tissue system: microcirculation of blood flow, lymph flow and oxidative metabolism with using functional temperature probes: cooling and heating. The method is reserved at studying the adaptation of tissue at temperature tests to assess the energy supply of metabolism. The control values of the diagnostic parameters were determined for different age-related groups. With help this method the improvement of energy supply of metabolism was recorded at the individual treatment of diabetic patients with type 2 diabetes mellitus.

Key words:microcirculation, coenzymes of oxidative metabolism, laser Doppler flowmetry, laser fluorescence spectroscopy, functional temperature test, diabetes mellitus.

Введение. Метаболические процессы клеточных структур ткани энергозависимы. Изменение энергетического обмена лежит в основе

большинства функциональных и энергетических нарушений в тканях. Все энергетические нарушения реализуются на молекулярном уровне [1]. Развитие патологии связано с энергетическим дисбалансом, с нарушением тканевого адекватного энергообразования в результате дефицита аэробного окисления глюкозы. Для диагностических исследованиях состояния микроциркуляции и метаболизма в тканях широко применяются лазерные методы исследований: лазерная допплеровская флоуметрия (ЛДФ) и лазерная флуоресцентная спектроскопия (ЛФС) [2-4]. Указанные методы диагностики являются неинвазивными и противопоказаний для использования не имеют. В данной работе представлен новый диагностический подход для практического применения указанных лазерных методов, основанный на их объединении совместно с проведением функциональной температурной пробы. Такой подход позволяет изучить адаптацию ткани при охлаждении (снижение активности микроциркуляции и окислительного метаболизма) и нагреве (повышение активности микроциркуляции и окислительного метаболизма) относительно состояния ткани в покое. Нарушение энергетического обеспечения метаболизма непосредственно приводит к ухудшению адаптационных возможностей. Достижение величин диагностических показателей к контрольным значениям в результате лечебных мероприятий соответствует нормализации энергетического состояния ткани.

Цель работы: разработка неинвазивного метода диагностики энергетического обеспечения метаболизма путем оценки перфузии кровотока, состояния лимфотока и амплитуд флуоресценции тканевых коферментов: восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и окисленного флавинадениндинуклеотида (ФАД), участников окислительного метаболизма. Оценка указанных характеристик проводится при осуществлении функциональных температурных проб с охлаждением и нагревом.

Методы исследований. В течение одной диагностической процедуры на большом пальце стопы осуществлялся контроль микроциркуляции кровотока и лимфотока способом ЛДФ и регистрация амплитуд флуоресценции коферментов НАДН и ФАД способом ЛФС. Исследования проводились в три этапа: в состоянии покоя, при охлаждении до

10°С (снижение активности микроциркуляции и метаболизма) и при нагреве до 35°С (повышение активности микроциркуляции и метаболизма). Реализация способов ЛДФ и ЛФС и организация функциональной температурной пробы осуществлялось с помощью Аппарата лазерного диагностического «ЛАЗМА СТ» и разработанного программного обеспечения. Для возбуждения флуоресценции НАДН применяется излучение на длине волны 365 нм, длина волны флуоресценции НАДН - в интервале 460-470 нм. Для возбуждения ФАД применяется излучение на длине волны 450 нм, длина волны флуоресценции ФАД - в интервале 510-520 нм [4]. Для допплеровских измерений применяется излучение лазерного одночастотного источника на длине волны 1064 нм.

В качестве объекта исследования в данной работе используется кожа большого пальца ноги, положение лежа. Указанная область наиболее нагружена в физиологическом плане по сравнению с другими областями, поэтому для неинвазивных исследований палец ноги наилучшим образом может отражать общее состояние микроциркуляторно-тканевой системы (МТС) человека [4].

Исследование реакции ткани при охлаждении до 10°С и нагреве до 35°С позволяет оценить изменения как микроциркуляции, так и концентрации коферментов относительно исходного состояния. Метаболические процессы клеточных структур организма энергозависимы. При охлаждении скорость химических процессов метаболизма снижается, при нагревании активируется утилизация субстрата и коферментов [1]. Чем более выражены изменения в концентрациях НАДН и ФАД при пробе с нагревом, регистрируемые через изменения величин амплитуд флуоресценции, тем меньше утилизировано субстрата и коферментов в исходном состоянии ткани, значительнее снижение окислительного метаболизма.

В величины приращения (при охлаждении) или уменьшения (при нагреве) амплитуд флуоресценции коферментов не входит флуоресценция коллагена, как одного из доминирующих флуорофоров в коже [5]. Нагрев и охлаждение при указанных температурах не изменяет содержание коллагена в ткани. При расчете величин изменения амплитуд флуоресценции НАДН и ФАД добавка от коллагена как постоянная величина, константа, вычитается.

Выбор температуры нагрева 35°С обусловлено несколькими обстоятельствами. Первое - при 35°С не происходит денатурации белка, в том числе коллагена [1]. Второе - эта температура находится вблизи диапазона 38-40°С, при которой наибольшая скорость ферментативных реакций [1]. Также при 35°С возрастает активность местных регуляторных механизмов кожного кровотока [4], приводящая к увеличению числа функционирующих капилляров микроциркуляторного русла кровотока.

При охлаждении в ткани происходит холодовая вазодилатация [4], которая не позволяет однозначно зарегистрировать реакции замедления метаболизма из-за увеличения кровотока, как источника нагрева ткани. Охлаждение при 10°С обусловлено методикой оценки реакции ткани, именно при такой температуре время до наступления холодовой вазодилатации около 1 минуты, в течение которой возможно корректно получить данные по ослаблению утилизации субстрата и коферментов.

При исследовании in vivo принципиальным является получение диагностической информации из одной и той же области биоткани в реальном масштабе времени в связи с изменением биофизических характеристик ткани в процессе жизнедеятельности. Аппарат «ЛАЗМА СТ», состоящий из анализатора «ЛАЗМА-Д» для контроля микроциркуляции кровотока и лимфотока и амплитуд окислительных коферментов и блока «ЛАЗМА-ТЕСТ» для проведения нагрева и охлаждения ткани, обеспечивает исследования в течение одной диагностической процедуры за 15 минут.

Результаты и их обсуждение. Отработка методики проводилась для здоровых волонтеров разных возрастных групп и больных сахарным диабетом (СД) 2 типа. Здоровые волонтеры были представлены тремя группами. Первая группа 21-27 лет - 35 человек, вторая 33-41 год – 19 человек и третья 52-63 года – 16 человек. Число больных с СД 2 типа – 67 человек. Результаты анализировались по следующим параметрам: нормированные амплитуды флуоресценции НАДН и ФАД, прирост и уменьшение амплитуд НАДН и ФАД соответственно при охлаждении (рост) и нагреве (уменьшение), эффективная перфузия кровотока [4], среднее значение лимфотока, температура кожи в состоянии покоя, показатель окислительного метаболизма, резерв окислительного метаболизма между состоянием нагрева и покоя.

В группах контроля с возрастом отмечается закономерное увеличение нормированных амплитуд флуоресценции НАДН и ФАД, снижение утилизации коферментов при нагреве и более высокие значения амплитуд при охлаждении.

Проводилось сравнение указанных параметров между группами контроля и больными с СД 2 типа аналогичного возраста. На основании результатов сравнения больные были классифицированы на классы: субкомпенсированные нарушения и стойкие декомпенсированные нарушения. Класс субкомпенсированные нарушения был дополнительно разделен на три подкласса: 1) микроциркуляция *активна*, снижение окислительного метаболизма; 2) микроциркуляция *не активна*, снижение окислительного метаболизма; 3) микроциркуляция *активна*, *выраженное* снижение окислительного метаболизма. Класс стойкие декомпенсированные нарушения - это соответствует состоянию - микроциркуляция *не активна*, *выраженное* снижение окислительного метаболизма.

Следует отметить повышенную температуру кожи большого пальца стопы до 30 ºС у ряда больных, отнесенных к классу с субкомпенсированными нарушениями. Это обстоятельство возможно связано с физиологической компенсацией, активирующий окислительный метаболизм при более высокой температуре. Так для больных, отнесенных к классу со стойкими декомпенсированными нарушениями, температура кожи соответствует контрольным значениям.

Заключение. Разработанный метод и диагностический Аппарат «ЛАЗМА СТ» позволяют дифференцировать состояние энергетического обеспечения метаболизма у здоровых людей в зависимости от возраста.

Для больных с диагнозом сахарный диабет 2 типа разработана классификация по степени нарушений микроциркуляции и скорости окислительного метаболизма. Подбор лекарственных средств может осуществляться в зависимости от отнесения больного к определенному классу нарушений, как для улучшения микроциркуляции, либо для активации метаболизма.

Метод может быть применен для разных задач, так как основывается на общих физиологических процессах в ткани.

Литература

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. - 3-е изд.. стереотипное.-М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2008.
2. Mayevsky A. Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fiuorescence: from animal models to human studies// Am. J. Physiol. Cell Phisiol.- 2007.-v.292, №2- pp. C615-C640.
3. Mokry M., Gal P. and et.al. Experimental study on predicting skin flap necrosis by fliorescence in the FAD and NADH bands during surgery// Photochem. Photobiol. - 2007. - v.83, n.5. - pp. 1193-1196.
4. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: Колебания, информация, нелинейность (Руководство для врачей)/ Под ред. А.И. Крупаткина, В.В.Сидорова. М.:Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2013.-496 с.
5. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2 т. /Пер. с англ. Под ред. В.В. Тучина - М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007.

НЕПУЛЬСИРУЮЩАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ В ИНДИВИДУАЛЬНОЙ МОДЕЛИ КРОВООБРАЩЕНИЯ КАК НОВАЯ ГЕМОДИНАМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Хурса Р.В.
УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь
rvkhursa@tut.by

Резюме

Проведено статистическое моделирование гемодинамики по индивидуальным рядам артериального давления у разных контингентов лиц. Показано, что моделирование открывает новые гемодинамические характеристики: тип сердечно-сосудистого взаимодействия и давление в области исчезающей пульсации. Эта непульсирующая составляющая характеризует давление в конечной части артериол, связан-

ное с особенностями сердечно-сосудистого взаимодействия в процессе продвижения крови. При патологических моделях она значительно отличается от среднего гемодинамического давления, определяемого расчетными способами.

Ключевые слова: артериальное давление, среднее гемодинамическое давление, статистическая модель гемодинамики.

NONPULSING COMPONENT OF BLOOD PRESSURE ON INDIVIDUAL HEMODYNAMIC MODEL AS NEW CHARACTERISTIC OF BLOOD CIRCULATION

Khursa R.V.
Belarusian State Medical University,
Minsk, Belarus
rvkhursa@tut.by

Abstract

The individual statistical modelling of hemodynamics on blood pressure sets was made in different contingents of persons. Such modelling opens new hemodynamic characteristics: a type of cardiovascular interactions and a pressure in the field of the disappearing pulsation. This nonpulsing component characterizes the pressure in the end part of arterioles, associated with the features of cardiovascular interaction in the blood flow process. In pathological models the nonpulsing component differs significantly from the mean hemodynamic pressure independent from the methods of its calculation.

Key words:blood pressure, mean pressure, hemodynamic statistical model.

Введение. В артериальном кровотоке выделяют два компонента – пульсирующий (до прекапиллярного уровня) и постоянный (в конечной части артериол и капиллярах кровоток осуществляется при устойчивом режиме давления). Величина артериального давления (АД) может характеризоваться несколькими показателями (измеряемыми и исчисляемыми): систолическим давлением (САД), систолическим

боковым (пьезометрическим), ударным, диастолическим (ДАД), пульсовым (ПД), средним. Последние два отражают наличие в кровотоке именно этих двух компонентов – пульсирующего, характеризующегося величиной ПД, и постоянного – величиной среднего гемодинамического давления (чаще его называют просто средним – СрД). СрД представляет собой проинтегрированное среднее значение АД за время сердечного цикла и имеет важное физиологическое значение. Его величина зависит от сократительной функции левого желудочка и общего периферического сосудистого сопротивления, отражает состояние прекапиллярного русла и служит абстрактным показателем согласованности регуляции кровообращения. Известна стабильность СрД на достаточно постоянном уровне (в норме в артериях большого круга – 80-95 мм рт. ст.), повышающегося даже при физических нагрузках лишь на 2-3 мм рт.ст. Повышение СрД является признаком «истинной» артериальной гипертензии (АГ) [1,2].

СрД может быть определено осциллометрическим способом (анализом амплитуды пульсаций или ее первой производной), считающимся наиболее точным, или косвенным путем, использующемся обычно при измерении АД по Короткову – вычислением по параметрам измеряемого АД, чаще всего, путем прибавления к ДАД определенной доли ПД, которое в свою очередь вычисляется по разности САД и ДАД. Наиболее часто в клинической практике используется формула Хикэма: СрД=ДАД+0,33ПД; хотя ряд исследователей предпочитают прибавлять 0,42ПД-0,4ПД (по Wezler, Böger; Simonyi), а крупнейший отечественный физиолог Н.Н. Савицкий рекомендовал прибавку 0,5ПД в качестве наиболее адекватного варианта [2]. Причем вопрос об этой доле ПД до сих пор остается дискутабельным [10].

Современный этап развития науки знаменуется активным использованием информационных технологий и методов статистики, что позволяет извлекать новую, практически важную информацию из параметров функционирования организма человека, даже из «рутинных». Нами разработан оригинальный способ вычисления величины кровяного давления в области затухающей пульсовой волны (которое, очевидно, характеризует давление беспульсового тока крови в конечной части артериол) по индивидуальной модели гемодинамики, получаемой с помощью процедуры количественного анализа связей па-

раметров АД(КАСПАД) [3-6]. Для КАСПАД необходим ряд величин АД пациента (не менее 20, более – не ограничено), полученных любым способом измерения в случайном или заданном интервале времени, и ПЭВМ с соответствующим программным обеспечением. КАСПАД представляет собой линейную регрессию САД по ПД, общий аналитический вид которой – сопряженные уравнения:

САД = $Q + a$ПД (1);

ДАД = $Q + (a\text{-}1)$ПД (2).

Коэффициенты регрессии *a* (угловой) и *Q* (пересечение) имеют индивидуальные числовые значения и характеризуют кровообращение в интервале времени наблюдения как процесс взаимодействия сердца и сосудов в продвижении крови: *a*и (*a-1*) – показатели участия прессорного (сердца) и депрессорного (сосуды и мышцы, «периферия») компонентов в процесс продвижения крови; *Q*(мм рт.ст.) – уровень давления крови в области исчезновения пульсовой волны (беспульсового давления), поскольку если ПД=0, то САД=ДАД=*Q*.

Установлены граничные значения «прессорного» коэффициента а, разделяющие гемодинамические типы [3-6]. Гармонический тип (Г) означает нормальное сердечно-сосудистое взаимодействие в процессе продвижения крови, при котором сердце пациента выполняет бóльшую часть работы в продвижении крови при меньшем участии «периферии», и предполагает справедливость неравенств ДАД<*Q*<САД при 0<*a*<1. Значение коэффициента а>1 указывает на нарушение диастолической составляющей процесса кровообращения, которое осуществляется только силой сокращения миокарда, а «периферия» не помогает кровотоку (диастолический дисфункциональный тип кровообращения – ДД). При этом справедливо неравенство *Q*<ДАД<САД, т.е. давление беспульсового тока крови становится ниже ДАД [3,6]. При а<0 справедливо неравенство ДАД<САД<*Q*, что также представляет нарушение гемодинамики сердечно-сосудистой системы за счет систолической составляющей процесса кровообращения, которое осуществляется, главным образом, за счет «периферического сердца» (систолический дисфункциональный тип кровообращения – СД). Это тип редок в популяции:1-5% [4,6].

Вопрос о сопоставимости индивидуальной величины СрД, представляющего постоянный компонент пульсирующего кровотока и

определяемого по АД в плечевой артерии, с прекапиллярным давлением в артериолах (где кровоток непульсирующий) остается открытым из-за отсутствия доступных методов измерения последнего.

Цель – использовать методику индивидуального моделирования гемодинамики КАСПАД для косвенного определения давления *Q*в области исчезающей пульсовой волны и сопоставить его с СрД, определяемым традиционными способами, для выявления их тождества или различий при разных типах кровообращения.

Методы исследования. Исследование проведено в 3 этапа. На всех этапах по рядам величин АД каждого пациента строилась индивидуальная модель гемодинамики методом КАСПАД с определением типа кровообращения и величины давления *Q*, а также определялось СрД тремя отмеченными выше вариантами: СрД=D+0,33W (A), СрД=D+0,4W (B) и СрД=D+0,5W (C). Проводилось сравнение параметров (пакет программ Statistica.10).

Этап 1. Использованы ретроспективные данные результатов ОКО (окклюзионно-компрессионная осциллометрия, аппарат АПКО-8-РИЦ, Россия)случайной выборки из22 пациентов разного состояния здоровья, включая 11 лиц с АГ – 9 мужчин, 13 женщин возраста 16-80лет (57,0±3,0 года), обследованных в отделении функциональной диагностики санатория «Белая Русь» (г.Туапсе, 2003-2004 г.) – группа 1.1. ОКО проводилась неоднократно (6 и более раз), при каждом исследовании одномоментно определялось АД аускультативно (по С.Н.Короткову) и осциллометрически (с определением СрД). КАСПАД применен раздельно к индивидуальным профилям АД, полученным обоими способами, поэтому у каждого пациента получено по 2 модели кровообращения.

Этап 2. Обследованы 284 практически здоровых студентов (106 мужчин, 178 женщин, 22,9±0,2 лет) – группа 2.1 и 55 пациентов с впервые диагностированной АГ 1-3степени до начала лечения (28 мужчин и 27 женщины, 41,8±1,8 лет) – группа 2.2. Пациентам этих групп измерялось АД по Короткову 1-2 раза в день на протяжении 2-4 недель с последующим КАСПАД.

Этап 3. Суточное мониторирование АД (СМАД,мониторы BPLab, Россия) проведено у 3-х групп лиц (мужчин и женщин – сопоставимо): группа 3.1 – 126 практически здоровых лиц (23,8±5,1 лет); 3.2 – 49

пациентов с впервые выявленной АГ 1-2 степени, риск 1-3 до начала лечения (32,7±1,2 лет); 3.3 – 56 пациентов с АГ на фоне антигипертензивного лечения (50,5±1,9 лет). По параметрам АД за сутки проводился КАСПАД и вычисление СрД вариантами А, В, С.

Результаты и обсуждение. Среднегрупповые значения АД за период наблюдения по данным одномоментного измерения аускультативным и осциллометрическим методами в группе 1.1 различались: 145,7±4,5/76,07±2,0 мм рт.ст и 158,5±4,8/61,2±2,1 мм рт.ст. соответственно. Но КАСПАД-модели, построенные по аускультативным и по осциллометрическим данным, отнесли гемодинамическое состояние всех пациентов к одному и тому же типу (значения коэффициента *a* совпадали, p>0,05): у 8 чел. – Г-тип, у 10 чел. – ДД-тип, у 4 чел. – пограничный с диастолическим тип (ПД). СД-тип (редкий в популяции) в группе не отмечен. При Г-типе величины СрД, измеренные осциллометрически, полученные по КАСПАД и рассчитанные вариантом А достоверно не отличались (p>0,05), но при дисгармоничной гемодинамике различия были значительны: все 3 расчетных варианта демонстрировали более высокие значения, тогда как обе КАСПАД-модели – гораздо более низкие (табл. 1).

Таблица 1

Значения среднего гемодинамического давления при разных способах определения и беспульсового давления Qв группе 1.1 (мм рт.ст., M±m)

Тип	n	СрД при разных способах определения				Q	
		Осцилло-метрия	A ДАД+ 0,33ПД	B ДАД+ 0,4ПД	C ДАД+ 0,5ПД	КАСПАД (осцилл.)	КАСПАД (аускульт.)
Г	8	90,53±2,3	91,84±2,2	95,95±2,0*	101,81±1,9*	80,94±5,2	86,72±3,9
ДД	10	99,48±4,4	104,56±4,0*	109,69±4,3*	117,02±4,8*	28,02±8,0*	53,11±5,8*
ПД	4	89,15±5,6	100,26±8,2	105,48±8,8	112,94±9,8	57,14±4,4	73,73±6,1

Примечание-- различия с СрД при осциллометрическом измерении АД (p<0,05).*

Это означает, что у пациентов с ДД-типом давление в конечной части артериол значительно меньше, чем СрД, тогда как у лиц с нормальным кровообращением имеется совпадение этих параметров. При этом величина*Q*, являясь производной от измеряемого АД, значимо различалась в моделях ДД-типа, полученных разными способами измерения – 28,0±8,0 мм рт.ст при осциллометрическом, 53,1±5,8 мм рт.ст. при аускультативном (табл.1).

Таким образом, СрДи *Q* – не тождественные параметры: СрД характеризует в большей степени центральный кровоток, а *Q* – периферический (конечная часть артериол). Такой вывод мы получили ранее, исследовав показатели центральной гемодинамики при разных КАСПАД-типах [8].

Анализ КАСПАД-моделей в группах наблюдения на 2-м этапе продемонстрировал, что среди здоровых молодых людей с нормальным АД нередки патологические и пограничные варианты кровообращения, только 65,8% имели Г-тип. Среди пациентов с АГ (группа 2.2) чаще отмечен патологический ДД-тип (30,9%, $p<0,05$ с группой 2.1), хотя также преобладал Г-тип. Величины измеряемого АД закономерно различались в группах, так же как и СрД, независимо от способа его вычисления (табл. 2).

Значения беспульсового давления *Q* при дисфункциональном кровообращении в обеих группах с высокой достоверностью отличались от значений СрД, полученных любым из расчетных способов, причем эти отличия были разнонаправлены. Так при ДД-типе *Q* было достоверно ниже, чем при других типах, хотя СрД у пациентов с АГ с типом ДД при любом варианте расчета было однозначно «гипертензивным» (более 100 мм рт.ст.). При ПС- и СД-типах, выявленных только в группе 2.1 (скорее всего, лишь с учетом величины группы) давление *Q* было высоким и также достоверно отличалось от расчетных величин СрД (табл. 2).

При Г-типе у здоровых лиц *Q* значимо не отличалось от СрД только при варианте расчета В, у лиц с АГ не было различий *Q* и СрД при любом варианте расчета (табл. 2).

Таблица 2

Параметры артериального давления, включая среднее гемодинамическое с вариантами расчета A,B,C, и давление *Q* (M±m, мм рт.ст.) в группах здоровых лиц (2.1) и лиц с АГ (2.2) при разных КАСПАД-типах

Тип	Гр.	Кол-во, % (абс.)	САД	ДАД	СрД (А)	СрД (В)	СрД (С)	Давление Q
Г	2.1	65,8 (187)	115,0±1,3	74,0±0,5	88,0±0,6*	91,0±0,9	95,2±0,6*	91,0±1,3
	2.2	67,3 37)	153,0±2,7	97,9±2,7	116,1±2,1	119,9±2,2	125,4±2,2	122,7±2,6
ПД	2.1	6,3 (18)	117,8±4,1	75,6±2,3	89,5±2,8*	92,5±2,9*	96,7±3,1*	78,4±3,1
	2.2	-	-	-	-	-	-	-
ДД	2.1	18,7 (53)	114,2±1,9	73,9±1,2	87,2±1,4*	88,6±0,1,5*	94,1±1,5*	63,1±14
	2.2	30,9 (17)	140,6±3,0	89,2±2,1	106,2±2*	109,8±2,3*	114,9±2,3*	72,5±4,9
ПС	2.1	5,6 (16)	115,0±2,4	79,4±4,4	92,4±3,9*	95,1±3,8*	99,0±3,7*	115,1±2,3
	2.2	-	-	-	-	-	-	-
СД	2.1	3,5(10)	113,3±3,8	72,7±1,4	86,1±2,0*	88,9±2,1*	93,0±2,4*	125,5±6,1
	2.2	-	-	-	-	-	-	-

Примечание-- достоверность различий с Q в данной категории лиц (группа, тип), p<0,05.*

На 3-м этапе исследования в каждой из групп диагностированы разные гемодинамические типы, как Г (нормальный) и дисфункциональные (патологические) – ДД и СД, которые свидетельствуют о диспропорциональном участии сердца/сосудов в продвижении крови (преобладание роли сердца – при ДД, сосудов – при СД). Распространенность типов Г, ДД, СД составила 85,7%; 10,3%; 4,0% в группе 3.1; 83,7%; 16,3%; 0% в группе 3.2; 66,1%; 33,9%; 0% в группе 3.3. Переходные типы не отмечены, поскольку ряды АД при СМАД достаточно длинные (более 50 измерений), что позволяет провести регрессию точнее, чем по коротким рядам, как часто бывает по разовым измерениям.

Величины давлений *Q*и СрД при Г-типе в каждой из групп были практически одинаковые при определении последнего вариантами А и В (разница 1-2 мм рт.ст., p>0,05), тогда как при дисфункциональном

кровообращении статистически значимо отличались (p<0,05), причем разнонаправленно в зависимости от типа. Так при ДД-типе в каждой из групп *Q* было ниже СрД при всех вариантах расчета СрД, а при СД-типе – выше с разницей величин *Q* и СрД более 30 мм рт.ст. (рис. 1).

Как можно объяснить данные, полученные на 3-х этапах исследования с позиций КАСПАД? Если сопоставить расчетные формулы определения СрД с общим видом уравнений регрессии, то становится очевидно, что использующиеся в клинической практике расчетные варианты определения СрД отражают лишь частные случаи зависимости ДАД от ПД: если значение коэффициента (*a-1)*в уравнении (2) составляет 0,33 или близко к нему, то получается вариант расчета А, если оно равно или близко к 0,4 – вариант В, если 0,5 – вариант С. Поэтому у практически здоровых (среди которых преобладают лица с нормальным кровообращением) наиболее адекватной показали себя традиционная формула Хикэма (вариант А), наименее подходящей – вариант С.

Можно полагать, что при дисфункциональном кровообращении типа ДД энергия непрерывного тока крови (СрД) «теряется» к конечной части артериол (*Q*– низкое) за счет повышенной жесткости сосудов, характерной для этого типа, что должно ухудшать обмен веществ между кровью и тканями [7,9]. При редком СД-типе, наоборот: эластичность сосудов высокая, что способствует чрезмерному повышению давления *Q*, но это также не лучший вариант организации кровообращения, относительно выгодный для периферических мышц (поэтому среди спортсменов этот тип встречается чаще – до 6-8%), но экономически невыгодный для всего организма. Таким образом, при дисфункциональных типах кровообращения все формулы расчета расходятся со значениями давления *Q*, что лишний раз подтверждает смысловое различие этих параметров.

Заключение. Индивидуальная модель кровообращения получаемая по ряду величин АД пациента методом КАСПАД, открывает новые гемодинамические характеристики: тип сердечно-сосудистого взаимодействия и давление в области исчезновения пульсовой волны.

Индивидуальные значения этой непульсирующей составляющей АД, характеризуют недоступное измерению давление в конечной части артериол, связанное с особенностями сердечно-сосудистого вза-

имодействия в процессе продвижения крови и отражающее, видимо, периферический кровоток. При патологических КАСПАД-типах это давление значительно отличается от среднего гемодинамического, определяемого традиционными способами по АД на плечевой артерии, подтверждая рассогласованность регуляции кровообращения у таких лиц.

Модели гемодинамики, построенные по аускультативным и по осциллометрическим измерениям АД, не отличаются по типу, но при дисфункциональных типах кровообращения отличаются величиной давления в области исчезающей пульсации.

КАСПАД позволяет типировать индивидуальную гемодинамику (независимо от измеряемых величин АД), что в клинической практике открывает возможность дифференцированных подходов к лечению пациентов с АГ, а у нормотензивных лиц с дисфункциональными типами требует динамического наблюдения и модификации образа жизни.

Литература

1. Кушаковский М.С. Гипертоническая болезнь /М.С. Кушаковский. С-Пб: Сотис, 3-е изд., 1995.- 311 с.
2. Савицкий Н.Н. Биофизические основы кровообращения и клинические методы изучения гемодинамики/Н.Н. Савицкий.-Ленинград: Медицина, изд. 3-е, испр. и доп., 1974.-311 с.
3. Способ диагностики диастолической дисфункции кровообращения: Патент BY №6950/ В.М. Чеботарев, Р.В. Хурса. - Заявка №a20010017; приор. 09.01.2001.
4. Способ диагностики систолической дисфункции кровообращения: Патент BY №6952 / В.М. Чеботарев, Р.В. Хурса. - Заявка №a20011059; приор. 11.12.2001.
5. Хурса Р.В. Гемодинамические детерминанты гомеостаза сердечно-сосудистой системы/Р.В.Хурса, В.М.Чеботарев//Клиническая физиология кровообращения. - 2007. - №4. - С. 71-77.
6. Хурса Р.В.Пульсовое давление крови: роль в гемодинамике и прикладные возможности в функциональной диагностике /Р.В.Хурса//Медицинские новости.-2013.-№4.-С.13-19; Артериальная гипертензия.-2014.-№5(37).-С.21-28.
7. Хурса Р.В. Ранние гемодинамические проявления сосудистой жесткости в параметрах артериального давления/ Р.В. Хурса//Эксперименталь-

ные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия: [Электрон. ресурс] материалы II международной научно-практической конференции, Смоленск,16-17 ноября 2016 г. / Под ред. О.В.Молоткова, О.В.Халепо.- Электрон. текст. дан и прогр. (объем 3 Mb).- Смоленск: изд-во СГМУ, 2016.- 1 электрон. оптич. диск (CD-ROM).- С. 252-255.

8. Хурса Р.В. Реографические показатели центральной гемодинамики и типы кровообращения по данным линейной регрессии параметров артериального давления: есть ли связь? / Р.В. Хурса // Медицинский журнал.-2015.-№2- С.96-104.
9. Хурса Р.В. Функциональное состояние сосудов у практически здоровых лиц с патологическими гемодинамическими типами (по данным линейной регрессии параметров артериального давления)/Р.В. Хурса//Мед. панорама, 2014.-№7(151).-С.5-9;Артериальная гипертензия.-2014.-№6 (39).-С.39-45.
10. 4. Bos W.J.W, Verrij E., Vincent H.H. at al.How to assess mean blood pressure properly at the brachial artery level/W.J.W Bos [et al.]// JHypertens, 2007.-Vol.25(4).- p.751-755.

ИНГИБИРОВАНИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ЖЕЛЕЗА ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ИНДУЦИРОВАННОГО ГИПОГАЛОИДНЫМИ КИСЛОТАМИ

Шумаев К.Б.[1], Горудко И.В.[2], Космачевская О.В.[1], Панасенко О.М.[3], Пугаченко И.С.[1], Топунов А.Ф.[1], Рууге Э.К.[4]

[1]Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

[2]Белорусский Государственный Университет, физический факультет, Минск, Беларусь

[3]ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

[4]Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,физический факультет, Москва, Россия

E-mail: tomorov@mail.ru

Резюме

Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами (ДНКЖ) в живых системах выступают в качестве доноров оксида азота (NO) и обладают широким спектром биологической активности. Показано, что ДНКЖ в микромолярных концентрациях ингибируют индуцированный гипогалоидными кислотами (HOCl и HOBr) гемолиз эритроцитов. Эти комплексы также перехватывают свободные радикалы, которые образуются в реакции HOCl с гидропероксидом *трет*-бутила. Можно предположить, что цитопротекторное действие глутатионовых ДНКЖ при HOCl-индуцированном гемолизе обусловлено их антиоксидантными и регуляторными свойствами.

Ключевые слова: эритроциты, гемолиз, динитрозильные комплексы железа, хлорноватистая кислота, оксид азота, свободные радикалы.

DINITROSYL IRON COMPLEXES INHIDITION HEMOLYSIS OF ERYTHROCYTES INDUCED BY HYPOHALOID ACIDS

Shumaev K.B.[1], Gorudko I.V.[2], Kosmachevskaya O.V.[1], Panasenko O.M.[3], Pugachenko I.S.[1], Topunov A.F.[1], Ruuge E.K.[4]

[1]Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Moscow, Russia

[2]Department of Biophysics, Faculty of Physics, Belarusian State University, Minsk, Belarus

[3]Federal Research and Clinical Center of Physico-Chemical Medicine Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

[4]Department of Biophysics,Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

E-mail:tomorov@mail.ru

Abstract

Dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands (DNIC-GS) in living systems serve as donors of nitric oxide and have a broad spectrum of biological activity. It has been shown that DNIC-GS in micromolar

concentrations inhibit the hemolysis of erythrocytes induced by hypohaloid acids (HOCl and HOBr). These complexes also intercept free radicals generated by the interaction of HOCl and *tert*-butyl hydroperoxide. We believe that the inhibition of HOCl-induced hemolysis by DNIC-GS is due to their antioxidant and regulatory properties.

Key words: erythrocytes, hemolysis, dinitrosyl iron complexes, hypochlorous acid, nitric oxide, free radicals.

Введение. В настоящее время установлено, что эритроциты существенно влияют на метаболизм такой уникальной регуляторной молекулы как оксид азота (NO) [4]. Повреждение эритроцитов в условиях окислительного стресса стимулирует гемолиз [5, 10]. В свою очередь лизис эритроцитов и образование микрочастиц с гемоглобином приводит к увеличению уровня активных форм кислорода и нарушению сигнальной функции NO [4]. С другой стороны, эритроциты крови человека широко используются как модельная система для изучения молекулярных механизмов цитотоксического действия хлорноватистой и бромноватистой кислот (HOCl, HOBr) в условиях опосредованного фагоцитами (моноцитами, нейтрофилами и макрофагами) окислительного/галогенирующего стресса [6, 9].

Вместе с тем, важную роль в стабилизации и транспорте NO в кровотоке играют динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) [8]. Эти комплексы содержат $[Fe(NO)_2]$фрагменты, которые могут быть связаны либо с низкомолекулярными тиолами (например, глутатионом и цистеином), либо с аминокислотными остатками белков. Интересно, что ДНКЖ формируются при продукции NO активированными макрофагами. Эти комплексы являются донорами NO и иона нитрозония (NO^+), что во многом определяет их физиологические эффекты [8]. Ранее было показано, что ДНКЖ увеличивают эластичность эритроцитов и замедляют их детергент-индуцированный гемолиз [2]. Известно также, что ДНКЖ с глутатионовыми лигандами обладают гипотензивным и вазодиляторным действием, снижают зону инфаркта на изолированном сердце, ингибируют агрегацию тромбоцитов, ускоряют заживление кожных ран, подавляют развитие эндометриоза у животных и апоптоз в клеточных культурах [8]. Кроме того, в различных системах,

моделирующих окислительный стресс, ДНКЖ могут выступать в качестве антиоксидантов [3, 7].

Целью работы было исследование влияние динитрозильных комплексов железа с глутатионовыми лигандами на гемолиз эритроцитов в условиях, моделирующих окислительный/галогенирующий стресс.

Методы исследования. Эритроциты выделяли из донорской крови, стабилизированной цитратом натрия, путем двукратного отмывания центрифугированием (1500 об/мин, центрифуга ОПН-3) в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 10 мМ Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl (pH 7,4).

Гемолиз инициировали путем внесения гипохлорита натрия (0,1 – 1 мМ) в суспензию эритроцитов в PBS, содержащем 1 мМ CaCl2, 0,5 мМ MgCl2 (оптическая плотность на длине волны 670 нм не превышала 0,7). Кинетику гемолиза исследовали с помощью спектрофотометра РВ 2201 (SOLAR, Минск, Беларусь), регистрируя изменение оптической плотности клеточных суспензий при 670 нм, 37°С и постоянном перемешивании. Для количественной оценки процесса HOCl-индуцированного лизиса эритроцитов использовали скорость гемолиза, которую определяли, как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой уменьшения оптической плотности при 670 нм.

Концентрацию коммерческого раствора гипохлорита натрия (NaOCl) определяли спектрофотометрически при pH 12, исходя из молярного коэффициента экстинкции ClO^- ε292=350 моль-1см-1. В связи с тем, что pKa хлорноватистой кислоты составляет ~7,5 при физиологических значениях pH примерно половина этой кислоты находится в протонированной, а остальная в диссоциированной форме, далее под HOCl мы будем понимать смесь этих форм в исследуемой среде. Динитрозильные комплексы железа синтезировали как описано в работах [3, 7].

Для изучения взаимодействия глутатионовых ДНКЖ с свободными радикалами, образующимися в реакции HOCl с гидропероксидом *трет*-бутила использовали спиновую ловушку DEPMPO (5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин N-оксид). Реакционная среда содержала 7,2 мМ гидропероксида трет-бутила, 0,75 мМ HOCl, 40 мМ DEPMPO в 0,1 М K,Na-фосфатном буфере (pH 7,4).

Спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) регистрировали на спектрометре E-109E фирмы Varian (США), при температуре ~25°C. Аликвоты образцов объёмом 80 мкл помещали в стеклянные капилляры, после чего записывали спектры ЭПР при СВЧ мощности 10 мВт, СВ частоте 9,15 ГГц, амплитуде ВЧ модуляции 0,1 мТл (для спин-аддуктов DEPMPO) или 0,2 мТл (для ДНКЖ).

Результаты и их обсуждение.

Гемолиз эритроцитов в условиях окислительного/галогенирующего стресса моделировали путем воздействия на клетки хлорноватистой кислоты (HOCl), образование которой катализируется миелопероксидазой (МПО), либо добавляя этот фермент к эритроцитам в присутствии его субстратов: H2O2 и хлорида (Cl^-). Показано, что предварительная обработка эритроцитов ДНКЖ увеличивала устойчивость последних к HOCl, причём цитопротекторное действие исследуемых комплексов было количественным. В концентрации 50 мкМ ДНКЖ практически полностью ингибировали гемолиз. Хорошо известно, что восстановленный глутатион (GSH) является ключевым антиоксидантом эритроцитов [10], а также эффективно перехватывает хлорноватистую кислоту [1]. Поскольку, в состав исследуемых комплексов в качестве лигандов железа входят две молекулы глутатиона, мы исследовали, обусловлен ли защитный эффект ДНКЖ реакцией глутатиона с хлорноватистой кислотой. Установлено, что достоверное ($p<0,05$) увеличение устойчивости клеток к гемолизу регистрировалось лишь при добавлении глутатиона в концентрации выше 5 мкМ. В то же время, ДНКЖ в концентрации 2,5 мкМ (что соответствует 5 мкМ GSH) снижают скорость HOCl-индуцированного гемолиза более чем в 20 раз.

МПО, катализируя реакцию окисления Cl^- пероксидом водорода до HOCl, также вызывала гемолиз эритроцитов. Присутствие в инкубационной среде 0,5 мкМ ДНКЖ тормозило лизис эритроцитов, а 2,5 мкМ комплексов предотвращали его полностью.

Для моделирования галогенирующего стресса использовалась также бромноватистая кислота (HOBr), образование которой в организме млекопитающих катализируется преимущественно пероксидазой эозинофилов. В наших экспериментах динитрозильные комплексы железа количественно снижали скорость HOBr-индуцированного гемолиза,

причём эффективность протекторного действия ДНКЖ сопоставима с системой, содержащей хлорноватистую кислоту.

Повреждение мембран эритроцитов может быть связано с стимуляцией гипогалоидными кислотами процессов свободнорадикального перекисного окисления липидов. Известно, что в результате взаимодействия HOCl с органическими гидропероксидами продуцируются алкилпероксильные и алкоксильные радикалы [1]. Известно, что эти свободные радикалы образуются с участием гидропероксида трет-бутила в следующих реакциях:

(CH3)3COOH + HOCl → (CH3)3COO• + Cl• + H2O (1),

2(CH3)3COO• → (CH3)3COOOOC(CH3)3 → 2(CH3)3CO• + 3O2 (2).

В наших экспериментах также наблюдалось формирование аддуктов спиновой ловушки DEPMPO со свободнорадикальными интермедиатами реакции гидропероксида *трет*-бутила с HOCl. Вместе с тем, добавление в реакционную среду глутатионовых ДНКЖ ингибирует продукцию спиновых аддуктов DEPMPO. Так, эти комплексы в концентрации 0,2 мМ практически полностью ингибируют образование свободных радикалов в среде, содержащей 7,2 мМ гидропероксида трет-бутила и 0,75 мМ HOCl. Важно отметить, что антирадикальное действие глутатионовых ДНКЖ было существенно выше, чем у свободного GSH. Ранее было показано, что ДНКЖ связанные с глутатионом или гемоглобином перехватывают свободные радикалы, образующиеся при декомпозиции гидропероксида *трет*-бутила [3, 7]. Этот эффект может быть обусловлен реакциями алкилпероксильных (ROO•) и алкоксильных (RO•) радикалов с NO, донором которого являются ДНКЖ:

ROO• + NO• → ROONO → RONO2 (3),

RO• + NO• → RNO2 (4).

Считается, что эти диффузно-контролируемые реакции (k=1-3´109 М-1с-1) приводят к терминации цепных процессов свободнорадикального окисления [3, 7]. С другой стороны, свободные радикалы, возникающие в реакциях 1 и 2, могут перехватывать глутатионовые лиганды ДНКЖ. С помощью DEPMPO исследовалось образование тиильных радикалов (RS•) при окислении GSH пероксинитритом или продуктами взаимодействия миоглобина с гидропероксидом трет-бутила [3].

Однако, в наших экспериментах не наблюдалось формирование аддуктов тиильных радикалов с DEPMPO. Нужно также отметить, что свободные радикалы не возникали при добавлении хлорноватистой кислоты к GSH или глутатионовым ДНКЖ.

С использование спектроскопии ЭПР исследовалось взаимодействие с хлорноватистой кислотой парамагнитных моноядерных форм ДНКЖ. Установлено, что в результате вызванной HOCl окислительной модификации тиольных лигандов происходит трансформация динитрозильных комплексов железа, связанных с глутатионом, цистеином и белками. При этом в состав ДНКЖ могут включаться другие лиганды, такие как фосфатные анионы или остатки гистидина.

Заключение.

Полученные экспериментальные данные, свидетельствуют о том, что эффективное ингибирование глутатионовыми динитрозильными комплексами железа гемолиза эритроцитов в условиях окислительного/галогенирующего стресса, обусловлено антирадикальными и антиоксидантными свойствами ДНКЖ.

Представляется вероятным, что антиоксидантный эффект глутатионовых ДНКЖ может быть обусловлен как самими комплексами, так и находящимися в равновесии с ними тиолами и NO (реакции 3 и 4). Нельзя исключить, что [Fe−NO2] фрагменты динитрозильных комплексов железа также способны непосредственно реагировать с интермедиатами перекисного окисления липидов. Кроме того, связывание ионов железа в составе этих комплексов может ингибировать образование гидроксильного радикала в реакции хлорноватистой кислоты с ионами Fe2+ [1]:

$Fe2{+}{+} + HOCl \rightarrow Fe3{+} + {}^{\cdot}OH + Cl^{-}$.

Вместе с тем, поскольку ДНКЖ, как доноры NO+, вовлечены в селективное нитрозилирование SH-групп белков [8], мы полагаем, что защита эритроцитов от индуцированного гипогалоидными кислотами гемолиза связана не только с антиоксидантным, но и регуляторным действием этих комплексов оксида азота.

Таким образом, на основании вышеизложенного можно заключить, что ДНКЖ играют важную роль в регуляции структурно-функциональных свойств эритроцитов при окислительном/галогенирующем стрес-

се и воспалении. В то же время, эти физиологические производные NO могут быть использованы для коррекции патологий процессов, ассоциированных с гемолизом эритроцитов. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-05211, а также гранта № 15-36-01024 отделение гуманитарных и общественных наук (РФФИ-ОГОН, ранее РГНФ).

Литература

1. Гемолиз инициировали путем внесения гипохлорита натрия (0,1 – 1 мМ) в суспензию эритроцитов в PBS, содержащем 1 мМ $CaCl_2$, 0,5 мМ $MgCl_2$ (оптическая плотность на длине волны 670 нм не превышала 0,7). Кинетику гемолиза исследовали с помощью спектрофотометра PB 2201 (SOLAR, Минск, Беларусь), регистрируя изменение оптической плотности клеточных суспензий при 670 нм, 37°Бондарь Т.П., Коренец Г.И. Морфофункциональное состояние эритроцитов периферической крови при поздних сосудистых осложнений СД (обзор литературы) / Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – №12. – С. 22-34.
2. Ганелина И.Е., Родионова В.И., Катюхин Л.Н., Тепляков Д.В. Данные коронарографии и реологические свойства эритроцитов при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST // Кардиология. – 2011. – №4. – С. 4-9.
3. Древаль А.В., Мисникова И.В., Барсуков И.А. Лечение нарушений углеводного обмена // Лечащий врач. – 2008. – №10. – С. 16-24.
4. Титов Д.В. Роль микроциркуляции органов малого таза и реологических свойств крови в формировании детрузорной гиперактивности. – Томск, 2014. – 114 с.
5. Шилов А.М., Авиалунов А.С., Синицина Е.Н., Марковский В.Б., Полещук О.И. Изменения реологических свойств крови у больных с метаболическим синдромом // Русский медицинский журнал. 28.02.2008. URL: http://www.rmj.ru/articles/kardiologiya.
6. Leschke M. Does targeted therapy of type 2 diabetes prevent cardiovascular incidents? // Med. Klin. – 2003. – Vol.98, №1. – P. 12-16.

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕПЛОВОЙ ПРОБЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ДОППЛЕРОВСКОЙ ФЛОУМЕТРИИ

Глазков А.А., Куликов Д.А.
ГБУЗ МО МОНИКИ им М.Ф. Владимирского, Москва, Россия
a.glazkov@monikiweb.ru

Резюме

Было проведено исследование диагностической значимости тепловой пробы для обратной классификации пациентов с сахарным диабетом и здоровых добровольцев методом лазерной допплеровской флоуметрии. Показано, что увеличение скорости нагревания не снижает диагностическую значимость тепловой пробы.

Ключевые слова: кожная микроциркуляция крови, лазерная допплеровская флоуметрия, тепловая проба, сахарный диабет.

OPTIMIZATION OF A HEATING TEST FOR THE DIAGNOSIS OF MICROCIRCULATION DISORDERS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS USING LASER DOPPLER FLOWMETRY

Glazkov A.A., Kulikov D.A.
Moscow Regional Research and Clinical Institute n.a. M.F. Vladimirsky, Moscow, Russia
a.glazkov@monikiweb.ru

Abstract

The diagnostic significance of heating test for reverse classification of patients with diabetes mellitus and healthy volunteers using laser Doppler flowmetry was studied. It is shown that an increase in the heating rate does not reduce the diagnostic significance of the heating test.

Key words:skin microcirculation, laser Doppler flowmetry, heating test, diabetes mellitus.

Введение: Известно, что использование температурной пробы при проведении лазерной допплеровской флоуметрии (ЛДФ) позволяет выявлять статистически значимые изменения в кожной перфузии у пациентов с различными заболеваниями: сахарным диабетом (СД), артериальной гипертензией (АГ) и др. Проба не стандартизована, но как правило, исследование длится от 20 до 45 минут, датчик нагревают до 40-45°С, скорость нагрева составляет в 1-2°С в минуту. Данные методики затруднительны для применения в рутинной практике не только из-за высокой длительности проведения пробы, но и из-за недостаточной диагностической значимости выявляемых различий [1-3].

Цель работы: изучить возможность сокращения длительности пробы за счет увеличения скорости нагревания, а также оценить диагностическую значимость параметров кожной перфузии в различные периоды пробы.

Материалы и методы. В исследование было включено 11 условно здоровых добровольцев и 13 пациентов с СД 2 типа с длительным стажем заболевания (12,82±7,82 лет). Кожную перфузию регистрировали с помощью комплексов ЛАКК-02 и ЛАКК-ТЕСТ (НПП «ЛАЗМА»). Датчики накладывали на дистальной части тыльной поверхности предплечья. Нагревание проводили с 32,2°С до 42°С в двух режимах: 4°С в минуту (медленный нагрев, левая рука) и максимальная скорость нагрева (быстрый нагрев, правая рука, температура в 42°С достигалась в течение 5 секунд с момента включения нагрева).

Результаты и их обсуждения.Как быстрый, так и медленный нагрев позволили выявить статистически значимые различия в кожной микроциркуляции между исследуемыми группами: при быстром нагреве различался уровень перфузии за период достижения плато (19,0±3,0 перфузионных единиц (ПЕ) у контрольной группы и 15,4±4,7 ПЕ в группе пациентов с СД2, p=0,0366, t-test), длительность периода активного роста перфузии различалась как при быстром, так и при медленном нагреве (быстрый нагрев: 79,5±26,5 сек. у контроля и 111,5±44,7 сек. у СД 2, p=0,0493; медленный нагрев: 166,4±18,0 сек. у контроля и 196,2±23,3 сек. у СД 2 p=0,0023, t-test). Были выявлены наиболее значимые с прогностической точки зрения параметры, получаемые при пострегистрационной обработке данных: скорость изменения микро-

циркуляции в момент активного роста перфузии и коэффициент вариации перфузии за период достижения плато. При быстром нагреве наклон линии линейной регрессии за первую минуту активного роста перфузии составил 14,7±2,0 в контрольной группе и 8,5±4,1 в группе пациентов с СД2 (p=0,0001, t-test).

Традиционно рассчитываемый параметр: площадь под графиком перфузии, – показал меньшую информативность. При этом ROC-анализ не показал статистически значимых различий между расчетными параметрами при быстром и медленном нагреве.

Выводы: Увеличение скорости нагревания не снижает диагностическую значимость тепловой пробы. Параметрами с наибольшей прогностической значимостью являются скорость изменения микроциркуляции в момент активного роста перфузии и коэффициент вариации перфузии за период достижения плато.

Литература

1. Heimhalt-El Hamriti M. et al. Impaired skin microcirculation in paediatric patients with type 1 diabetes mellitus //Cardiovascular diabetology. – 2013. – V. 12. – №. 1. – P. 115.

2. Wick D.E. et al. Delayed threshold for active cutaneous vasodilation in patients with Type 2 diabetes mellitus //Journal of applied physiology. – 2006. – V. 100. – №. 2. – P. 637-641.

3. Stansberry K.B. et al. Primary nociceptive afferents mediate the blood flow dysfunction in non-glabrous (hairy) skin of type 2 diabetes: a new model for the pathogenesis of microvascular dysfunction //Diabetes Care. – 1999. – V. 22. – №. 9. – P. 1549-1554.

III.
ГЕРОНТОЛОГИЯ
III.
GERONTOLOGY

ПЕПТИДЫ РЕГУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И УВЕЛИЧИВАЮТ РЕСУРС ОРГАНИЗМА

Хавинсон В. Х.
АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия
ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН», Санкт-Петербург, Россия
khavinson@gerontology.ru

Резюме

Анализ результатов 40-летних научных исследований на различных видах организмов позволил сделать вывод о едином механизме пептидной регуляции экспрессии генов и синтеза белков в живой природе. Короткие пептиды способны проникать в клетку и ее ядро. Комплементарное взаимодействие коротких пептидов с промоторными участками генов может служить регуляторным сигналом транскрипции. Пептиды индуцируют экспрессию многих ключевых генов и образование важных белков. Это приводит к повышению функций различных органов и увеличивает ресурс организма до видового предела. Короткие пептиды у бактерий, растений, земноводных, насекомых, птиц, грызунов, обезьяны и человека вызывали специфические изменения экспрессии генов и нормализовали синтез белков. Это сопровождалось увеличением продолжительности жизни.

Ключевые слова: короткие пептиды, экспрессия генов, синтез белка, человек, животные, бактерии, растения, продолжительность жизни, старение, патология, эпигенетика.

PEPTIDES REGULATE GENE EXPRESSION AND INCREASE VITALITY RESOURSES OF THE BODY

KhavinsonV.Kh.
Saint PetersburgInstitute of Bioregulation and Gerontology, Saint Petersburg, Russia
I.P. Pavlov Institute of Physiology, RAS, Saint Petersburg, Russia
khavinson@gerontology.ru

Abstract

A comprehensive 40-years research of peptides in many species of various organisms allowed us to finally conclude that living world has common mechanism of peptide regulation of gene expression and protein synthesis. Short peptides are able to penetrate into cell and its nucleus. Complementary interaction of short peptides with gene promoters seems to be a transcription regulatory signal. It induces the expression of crucial genes and proteins. Peptide-DNA interactions stimulate functioning of various organs and increase body resources up to species limit. Investigated short peptides induced specific changes in gene transcription in bacteria, plants, insects, amphibian, birds, mammals and humans, normalized protein synthesis. It was accompanied by increasing of lifespan.

Key words: short peptides, gene expression, protein synthesis, human, animal, bacteria, plants, longevity, ageing, pathology, epigenetic.

Введение. Возможность увеличения продолжительности жизни человека до видового предела (110-120 лет) является самой актуальной задачей современной медицины, геронтологии и молекулярной биологии. Биологический резерв продолжительности жизни человека не реализуется полностью вследствие воздействия различных неблагоприятных факторов. Это связано с нарушением биоритмов, изменением экспрессии генов, синтеза белков и снижением функций основных систем организма [1]. Одним из научно обоснованных методов увеличения продолжительности жизни является применение пептидных биорегуляторов (KHAVINSONPEPTIDES®). 6 пептидных препаратов (из тимуса – тималин, эпифиза – эпиталамин, мозга – кортексин, сетчатки – ретиналамин, простаты – сампрост и дипептид тимоген) зарегистрированы в качестве лекарств, 50 – в виде различных биорегуляторов.

Цель работы: выяснение клеточных и молекулярных механизмов действия пептидов.

Результаты и их обсуждение.Анализ результатов научных исследований пептидов на 17 видах организмов позволил предложить гипотезу о едином механизме пептидной регуляции экспрессии генов и синтеза белков в живой природе. Выявлено, что короткие пептиды (2-4 аминокислотных остатка) способны проникать в клетку, и далее в

ядро. Комплементарное взаимодействие коротких пептидов с промоторными зонами генов является сигналом для транскрипции, трансляции и синтеза белков [4]. Цепь этих процессов приводит к повышению функций различных органов и увеличивает ресурс организма.

Влияние пептидов на растения. Установлено, что короткие пептиды модулируют действие эндонуклеазWEN1, WEN2, выделенных из фракции цитозольных везикул колеоптилей пшеницы [5].Короткие пептиды регулируют экспрессию генов роста, развития и дифференцировки каллусной культуры *Nicotianatabacum*(табак).

Влияние пептидов на бактерии. Пептид EDG подавлял рост изолятов *Helicobacterpylori*, полученных от пациентов. Данный эффект наблюдался при капельном нанесении пептида на поверхность чашки Петри с агаром, на которой рос штамм *Helicobacterpylori*. Добавление пептида в агар было аналогично действию на штамм *Helicobacterpylori* антибиотика тетрациклина.

Влияние пептидов на насекомых. ПептидEDR оказывал стимулирующее действие на формирование кратковременной и долговременной памяти у медоносных пчел *ApismelliferacarnicaPollm* с исходно низким условно-рефлекторным фоном. У мутантной линии дрозофилыagn^{ts3} (модель болезни Паркинсона с деменцией и тельцами Леви) пептид EDR нормализовалпамять и локомоторное поведение, регулируя экспрессию генов limk1, rok и park. Пептиды AEDG и KE повышали активность антиоксидантной системы и способствовали увеличению продолжительности жизни дрозофилы.

Влияние пептидов на земноводных. Добавление пептидов сетчатки к полипотентным клеткам эктодермы ранней гаструлы лягушки *Xenopuslaevis* привело к возникновению клеток сетчатки и пигментного эпителия. Добавление других коротких пептидов к полипотентным клеткам эктодермы в этой же экспериментальной модели приводило к возникновению различных тканей. Это указывает на способность пептидов стимулировать процессы дифференцировки клеток.

Влияние пептидов на птиц. Добавление пептидов AEDG и KE в эмбриональные культуры клеток сетчатки цыплят способствовало индукции дифференцировки различных типов нейронов сетчатки (активация экспрессии белков Brn3, Pax6, Prox1, Vsx1) и пигментного эпителия

(активация синтеза белка транстерритина). Лекарственный препарат тималин оказывал нормализующее действие на показатели нуклеинового и белкового обмена, а также на активность Т-лимфоцитов в модели иммуносупрессии (введение циклофосфана) у цыплят.

Влияние пептидов на грызунов. Введение мышам и крысам эпиталамина и тималина, а также пептидов KE, EW, AEDG приводило к увеличению средней и максимальной продолжительности жизни. Максимальное увеличение продолжительности жизни на 42,3% было отмечено при введении пептида AEDG мышам линии CBA [1]. Пептиды, выделенные из эпифиза и тимуса, в 1,4-7 раз снижали у крыс и мышей частоту возникновения спонтанных и индуцированных облучением или канцерогенами злокачественных опухолей. Введение трансгенным мышам пептидов AEDG и KE подавляло экспрессию гена her-2/new (рак молочной железы человека) в 2-3,6 раза [2]. Подавление экспрессии гена сопровождалось уменьшением диаметра опухоли. Исследовано влияние пептидов KE, EW, AEDG, AEDP на экспрессию 15247 генов сердца и головного мозга мышей. Установлено, что каждый пептид специфически регулирует экспрессию определенной группы генов. Пептид EDG регулировал экспрессию мРНК различных генов, кодирующих белки клеточного метаболизма (SOD, TNFα и COX-2) в модели индуцированной язвы желудка у крыс. Введение эпиталамина старым самкам крыс (с отсутствием возможности репродукции) привело к восстановлению функции репродуктивной системы. Впоследствии у части этих крыс наступила беременность, что является беспрецедентным фактом.

*Влияние пептидов на приматов.*Введение пептида AEDG (эпиталона) старым обезьянам *Macacamulatta* (20-26 лет) привело к полному восстановлению (исходно уровень мелатонина был снижен в 2 раза) секреции мелатонина до нормы молодых животных (6-8 лет). У этих же старых обезьян после введения пептида восстановился до нормы суточный ритм секреции основного гормона надпочечников – кортизола. Введение эпиталона или эпиталамина старым животным приводило к восстановлению нарушающейся при старении толерантности к глюкозе.

Влияние пептидов на человека. Применение эпиталамина и тималина у людей пожилого и старческого возраста с патологией сердечно-сосудистой системы в рандомизированном сравнительном ис-

следовании привело к снижению темпа старения организма и смертности. Установлено, что длительное применение эпиталамина (6 курсов в течение 3 лет) уменьшает темп старения сердечно-сосудистой системы, восстанавливает физическую работоспособность, оказывает нормализующее влияние на суточный ритм выработки мелатонина, углеводный и липидный обмен. О геропротекторном эффекте применения эпиталамина также свидетельствует уменьшение смертности по кривым выживания Kaplan–Meier.

В основе влияния пептидов на жизнедеятельность и продолжительность жизни организмов лежат общие молекулярные механизмы. Регуляторные пептиды увеличивают содержание эухроматина в ядре, что позволяет большему числу генов быть доступными для факторов транскрипции. Транскрипция происходит более интенсивно и синтез белков увеличивается. Добавление пептида AEDG в культуру легочных фибробластов человека приводило к индукции экспрессии гена теломеразы и увеличению длинны теломер в 2,4 раза [3].

Установлено, что короткие пептиды тканеспецифически стимулируют дифференцировку и пролиферацию клеток и снижают уровень их апоптоза в культурах клеток при их старении. Активность пептидов зависит от структуры добавляемой молекулы. Пептид AEDG в полипотентных клетках стимулировал появление нервной ткани, пептид KEDP (простамакс) - эпидермиса, мезенхимы и сомитов, пептид KE – сетчатки. Пептиды индуцировали дифференцировку стволовых клеток ($CD34^+$) костного мозга эмбриона человека в $CD14^+$ клетки (миелоциты), $CD3^+$ клетки (предшественники Т-лимфоцитов), $CD4^+$ клетки (Т-хелперы), $CD8^+$ клетки (цитотоксические Т-лимфоциты). Пептид KEDWстимулировал экспрессию факторов дифференцировки ацинарных (Pdx1, Ptfla) и островковых (Pdx1, Pax6, Pax4, Foxa2, NKx2.2) клеток поджелудочной железы в «молодых» и «старых» культурах. Пептид снижал уровень экспрессии проапоптозного белка p53 и усиливал экспрессию пролиферативных маркеров Ki67 и PCNA. Пептиды KE и AEDG индуцировали дифференцировку эмбриональных клеток сетчатки в нейроны (Brn3, Prox1, Vsx1, Pax 6) и пигментный эпителий (TTR).

Применение метода молекулярного моделирования позволило выявить возможность взаимодействия пептидов с определенными участ-

ками ДНК. Методом молекулярного докинга были рассчитаны модели комплементарного связывания 20 пептидов с последовательностями ДНК (например, пептида AEDG с ATTTC, GTTTC, CTTTC и пептида KE cCGAG).

Выводы. Исследование биологической активности пептидов у различных видов организмов позволило выявить изменение экспрессии генов и нормализацию синтеза белков. Это сопровождалось улучшением функций различных органов и систем, в том числе снижением частоты возникновения опухолей и увеличением продолжительности жизни. Пептидный механизм регуляции жизнедеятельности различных видов, вероятно, является одним из древнейших в эволюции.

Литература

1. Anisimov V.N., KhavinsonV.Kh. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. – 2010. – Vol. 11. – P. 139-149.
2. KhavinsonV.Kh. Peptides and ageing. Neuroendocrinology Letters. Special Issue, 2002. – 144p.
3. KhavinsonV.Kh.,Malinin V.V. Gerontological Aspects of Genome Peptide Regulation. Basel (Switzerland): Karger AG, 2005. – 215 p.
4. KhavinsonV.Kh.,Tendler S.M., Vanyushin B.F. et al. Peptide Regulation of Gene Expression and Protein Synthesis in Bronchial Epithelium// Lung. – 2014. – Vol. 192. – P. 781-791.
5. Vanyushin B.F., KhavinsonV.Kh. Short Biologically Active Peptides as Epigenetic Modulators of Gene Activity. Epigenetics – A Different Way of Looking at Genetics. W. Doerfler, P. Böhm (eds.). Springer International Publishing Switzerland, 2016. - P. 69-90.

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРОВ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА У ЖИТЕЛЕЙ АБХАЗИИ РАЗНЫХ ВОЗРАСТОВ

Матуа А.З., Трапш Х.З., Шевцова З.В., Горухчиева Ф.А., Амаба С.Т, Джидарян А.А., Амичба А.А., Конджария И.Г., Баркая В.С., Елистратова Ж.В., Барциц Э.М., Миквабия З.Я.

Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Сухум, Абхазия

azmatua76@mail.ru

Резюме

В работе были исследованы параметры врожденного и адаптивного иммунитета у жителей Абхазии четырех возрастных групп: молодые, пожилые, старческого возраста и долгожители. Обследование включало в себя определение общего количества $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ Т-лимфоцитов, $CD19^+$ В-лимфоцитов, $CD16^+$NK-клеток и фагоцитарной (поглотительной и переваривающей) активности нейтрофильных гранулоцитов. Общее количество периферических $CD3^+$ Т-лимфоцитов с возрастом понижается, при этом соотношение $CD4^+$ и $CD8^+$ субпопуляций меняется, в частности у долгожителей. Процентное содержание $CD19^+$ В-лимфоцитов умерено снижается, $CD16^+$ NK- лимфоцитов повышается. Более выраженное угнетение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов было выявлено у людей старческого возраста. Сбор материала продолжается.

Ключевые слова: иммунитет, Т- и В- лимфоциты, фагоцитоз, долгожители, возрастная динамика.

STUDY OF PARAMETERS OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY IN DIFFERENT AGES INHABITANTS OF ABKHAZIA

Matua A.Z.,Trapsh Kh.Z., Shevtsova Z.V., Goruhchieva F.A., Amaba S.T., Dzhdaryan A.A, Amichba A.A., Konjaria I.G., Barkaia V.S., Elistratova Zh.V., Bartsits E.M, Mikvabia Z.Ya.

Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, AbkhazianAcademy of Sciences, Sukhum, Abkhazia

azmatua76@mail.ru

Abstract

The parameters of innate and adaptive immunity in the inhabitants of Abkhazia of four age groups (young, elderly, senile age and long-livers) were studied in the work. The examination included determination of the total number of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T-lymphocytes, $CD19^+$ B-lymphocytes, $CD16^+$ cells and phagocytic (absorbing and digesting) activity of neutrophilic granulocytes. The total number of peripheral $CD3^+$ T-lymphocytes decreases with age, with the ratio of $CD4^+$ and $CD8^+$ subpopulations changing, in particular among long-livers. The percentage of $CD19^+$ B-lymphocytes moderately decreases, $CD16^+$ NK-lymphocytes is increased. More pronounced changes in the phagocytic activity of neutrophilic granulocytes were detected in older people. The collection of material continues.

Key words: immunity, T- and B-lymphocytes, phagocytosis, long-livers, age dynamics.

Введение. Процесс старения охватывает все уровни структурной организации человека - молекулярный, субклеточный, тканевой, органный. Суммарный результат многочисленных частных проявлений старения на уровне целостного организма заключается в нарастающем с возрастом снижении его жизнеспособности, уменьшении эффективности приспособительных, гомеостатических механизмов. Продолжительность жизни человека и темпы развития возрастной патологии во многом определяются состоянием иммунной системы, а именно ее центрального органа - тимуса [3, 6]. С возрастом наблюдается сниже-

ние как гуморального, так и клеточного иммунитета, однако многими исследователями старость рассматривается как Т-иммунодефицит, сопровождающийся ослаблением реакций иммунитета и часто изменением их характера. В результате развиваются аутоиммунные, онкологические процессы и хроническое течение заболеваний, что составляет основу полиморбизма в старости. Вместе с тем иммунная система имеет значительный запас прочности, который создается в процессе формирования защитных сил организма с момента его рождения. Возрастные изменения в иммунной системе человека проявляются в течение всей его жизни [4,5,7].

Абхазия относится к признанным регионам долгожительства. Значительный вклад в системное изучение состояния здоровья и образа жизни долгожителей внесли результаты экспедиции проведенной в Абхазской АССР, при изучении биолого-геронтолого-антропологических и социально-демографо-этнографических аспектов их жизни [1]. В последние годы были изучены ряд гематологических и биохимических показателей геронтов Абхазии [2], иммунологические параметры не исследовались.

Цель работ: изучение показателей врожденного и адаптивного иммунитета у жителей Абхазии в сравнительно-возрастном аспекте.

Материалы и методы. Исследование популяций, субпопуляций лимфоцитов и нейтрофильных гранулоцитов проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL, с применением коньюгатов антител (Beckman Coulter, США) и набора FagoFlowEx (Exbio, Чехия). Общий анализ крови выполняли на гематологическом автоматическом анализаторе MICROS ES 60.

Определяемые иммунологические параметры: Т-клетки ($CD3^+CD19^-$ $CD45^+$), Т-хелперы ($CD3^+CD4^+CD8^-$), Т- цитотоксические ($CD3^+$ $CD8^+CD4^-$), В-лимфоцитов($CD19^+CD3^-CD45^+$), NK-клеток($CD16^+CD56^+CD3^-$) и фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов (поглотительная и переваривающая). Исследуемый биоматериал – цельная кровь с ЭДТА и гепарином.

В работе было обследовано 50 жителей Абхазии, в возрасте от 60 до 112 лет, трех национальностей: абхазы, армяне, русские. Взятие биоматериала и сбор анамнеза у пациентов осуществляли с выездом

на дома к обследуемым пациентам, исследовательской группой НИИЭПиТ АНА. Исходя из возрастной классификации, обследуемые были разделены на четыре возрастные группы: молодого возраста от 18 до 35 лет (группа I, n=15), пожилого возраста от 60 до 74 лет (группа II, n=10), старческого возраста от 75 до 89 лет (группа III, n=10), и долгожители от 90 до 112 лет (группа IV, n=15).

Состояние относительного здоровья определяли по собранному анамнезу и состоянию пациента на момент обследования. Основными критериями «относительного здоровья» были: состояние сознания, без выраженных признаков деменции, двигательная активность, способность к самообслуживанию, отсутствие злокачественных образований и серьезных нарушении со стороны основных физиологических систем, которые были исключены дополнительной инструментальной диагностикой и консультацией врачей разного профиля (терапевт, кардиолог, невролог, клинический психолог). Из хронических заболевании практически у всех пожилых пациентов, старческого возраста и долгожителей были выявлены гипертоническая болезнь (умеренная I-II степени), реже заболевания опорно-двигательного аппарата и заболевания ЖКТ.

Результаты и обсуждение. Анализ полученных данных выявил возрастное снижение общего количества лейкоцитов периферической крови (таблица 1). Внутри популяции лейкоцитов наблюдалось уменьшение относительного содержания нейтрофильных гранулоцитов и умеренное увеличение лимфоцитов с возрастом. Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов, и поглотительная и переваривающая, была наиболее выражена в группе молодых людей (группа I), и с возрастом снижалась, более явно у людей старческого возраста (группа III). Относительное содержание NK-клеток с возрастом нарастало, достигая наибольших значений в группе долгожителей (таблица 1).

Таблица 1.

Параметры врожденного иммунитета у разных возрастных групп в сравнительном аспекте.

Показатели	Группы сравнения			
	Группа I (18-35 лет)	Группа II (60-74 лет)	Группа III (75-89 лет)	Группа IV (90-112 лет)
Лейкоциты, 10^9 /л	7,5±0,5 (4,4-10,1)	6,8±0,6 (4,1-10,0)	6,5±0,6 (4,0-9,8)	5,8±0,3 (4,1-8,2)
Нейтрофильные гранулоциты (НГ), %	63,6±1,4 (55-72)	65,2±2,4 (54-75)	58,8±3,3 (44-74)	54,4±2,7 (33-70)
% Фагоцитарной активности НГ (%ФАН)	91,2±1,9 (80-99)	82,4±1,4 (75-90)	74,3±4,1 (52-90)	76,5±4,2 (56-92)
Индекс стимуляции НГ (ИС)	47,5±2,3 (33-66)	43,0 ±1,9 (35-55)	36,3±1,9 (26-52)	39,1±2,3 (29-48)
NK- клетки (CD 16+56+$CD3^-$), %	11,6±1,2 (6-18)	14,4±1,4 (7-20)	16,3±1,3 (9-23)	20,4±1,8 (11-33)

Примечание: *группа I – молодой возраст (18-35,n=15); группа II - пожилой возраст (60-74 лет, n=10); группа III- старческий возраст (75-89 лет, n=10); группа IV-долгожители (90-112 лет, n=15)*

Как видно из таблицы 2, относительное содержание в периферической крови общих Т-лимфоцитов ($CD3^+CD19^-$ $CD45^+$) постепенно снижалось. Наибольшее процентное содержание Т-хелперов ($CD3^+CD4^+CD8^-$) и цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD3^+$ $CD8^+CD4^-$), определялось в группе молодых людей и с возрастом постепенно уменьшалось. Соотношение субпопуляции (Т-хелперы/ Т-цитотоксические) более выражено изменялось у долгожителей. Наибольшее процентное содержание В-лимфоцитов ($CD19^+CD3^-CD45^+$) было выявлено у пожилых людей (группа II), затем умерено снижалось с возрастом.

Таблица 2.

Параметры адаптивного иммунитета у разных возрастных групп в сравнительном аспекте

Популяции и субпопуляции лимфоцитов	Группы сравнения			
	Группа I (18-35 лет)	Группа II (60-74 лет)	Группа III (75-89 лет)	Группа IV (90-112 лет)
Лимфоциты, %	28,4±1,2 (20-37)	29,9±1,5 (19-36)	32,7±2,5 (16-45)	34,1±2,2 (20-48)
Т-клетки ($CD3+CD19^-$ CD45+), %	75,5±1,1 (67-83)	65,6±1,9 (58-76)	64,7±2,5 (50-74)	63,7±2,4 (48-79)
Т-хелперы ($CD3+CD4+CD8^-$), %	45,4-1,5 (40-56)	36,3±1,6 (28-45)	35,9±2,9 (22-49)	32,2±1,9 (22-47)
Т- цитотоксические ($CD3+ CD8+CD4^-$), %	30,6±1,0 (24-37)	28,5±1,1 (22-34)	25,5±2,0 (16-36)	24,9±2,5 (14-36)
В-лимфоциты ($CD19+CD3^-CD45+$), %	12,8±0,8 (7-17)	16,1±1,5 (11-25)	15,5±1,7 (9-22)	14,9±1,6 (10-20)

Примечание: *группа I – молодой возраст (18-35,n=15); группа II - пожилой возраст (60-74 лет, n=10); группа III- старческий возраст (75-89 лет, n=10); группа IV –долгожители (90-112 лет, n=15)*

По каждому исследованному показателю был определен и диапазон колебаний, представленный в таблице 1-2. Во всех группах, в меньшей степени в группе молодых людей, наблюдался достаточно широкий диапазон колебаний иммунологических параметров. В целом, по предварительно полученным данным, можно говорить о сохранении, до глубокой старости, на относительно постоянном уровне, исследованных иммунологических показателей.

Следует отметить, что полученные данные не дают возможности делать окончательных выводов ввиду не достаточной выборки. На данном этапе работы можно говорить лишь об общих тенденциях. Для получения более достоверных и окончательных результатов, сбор материала будет продолжаться в рамках комплексной геронтологической темы НИИЭПиТ АНА.

Литература

1. Абхазское долгожительство / Козлов В.И., М.: Наука.-1987.-С.5-16
2. Каландия Т.З. Периферическое звено гемопоэза и некоторые бохимические показатели у лиц различных возрастных групп, проживающих в Абхазии. Автор. дис. к.б.н. Москва.- 2006.- 99с.
3. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Полякова В.О., Дуднов А.В., Кветной И.М. Возрастная динамика дифференцировки иммунных клеток тимуса человека // БЭБИМ-2011.-Том 151.-№5.- С.569-572
4. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М., Медицина, -1999.- С.77-79, 94- 96.
5. Ярилин А.А. Старение иммунной системы и тимуса // Клиническая геронтология.-2003.-Том 9.- №3.-С.8-17.
6. Ярыгин В.Н., Васильева В.И., Волков И.Н., Синельщикова В.В. Биология.-Кн.1.- М., Высшая школа. -2001.- С. 251.
7. Globerson A., Effros R.B. /Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged //Review immunology today.- 2000.- Т.21.-№10.- С. 515-521.

ПРЕВЕНТИВНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ АНТИВОЗРАСТНОЙ МЕДИЦИНЫ

Трофимова С.В.[1], Трофимов А.В.[2]

[1]АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия
dr.s.trofimova@gmail.com,
[2]ООО «Древо жизни. Клиника предиктивной медицины», Санкт-Петербург, Россия
alexander.trofimov@gmail.com

Резюме

В статье представлены основные современные представления о новом направлении - антивозрастной медицине. Описана ее цель - проведение эффективных индивидуальных программ профилактики развития и прогрессирования хронических заболеваний и возраст-ассоциированных состояний, сделан обзор применяемых инновацион-

ных диагностических методов, индивидуализированных профилактических и лечебных программ, основанных на пептидергической регуляции.

Ключевые слова: персонализированная медицина, антивозрастная медицина, молекулярно-генетическое тестирование, оценка биологического возраста, пептидные биорегуляторы, снижение заболеваемости.

PREVENTIVE METHODS OF DIAGNOSTICS AND TREATMENT IN CLINICAL PRACTICE OF ANTI-AGEING MEDICINE

Trofimova S.V.[1], Trofimov A.V.[2]
[1]Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology,St. Petersburg, Russia
dr.s.trofimova@gmail.com
[1]OOO "The Tree of Life. The clinic of predictive medicine", St. Petersburg, Russia
alexander.trofimov@gmail.com

Abstract

The article presents the main modern ideas about a new field - anti-aging medicine. The article describes its purpose - to conduct effective individual programs for the prevention of the development and progression of chronic diseases and age-related conditions, and contains an overview of innovative diagnostic methods used, individualized preventive and curative programs based on peptidergic regulation.

Key words: personalized medicine, anti-aging medicine, molecular genetic testing, assessment of biological age, peptide bioregulators, morbidity reduction.

Основной задачей антивозрастной медицины является индивидуальный подход к каждому пациенту с использованием инновационных технологий диагностики, профилактики, лечения возраст ассоциированных заболеваний, который базируется только на результатах доказательной медицины. Рассмотрим каждый пункт задач современной антивозрастной медицины отдельно.

1. Инновационные технологии диагностики в антивозрастной медицине.

В первую очередь, невозможно внедрение никаких инновационных технологий без осознания каждым пациентом важности здорового образа жизни и личной ответственности за свое здоровье. Это очень четко прописано в вышеупомянутом правительственном документе, и этот же постулат активно пропагандируется всеми специалистами антивозрастной медицины.

Кроме того, очень важным еще является понимание того факта, что использование инновационных методов диагностики возраст-ассоциированных заболеваний или предрасположенности к ним должно базироваться только на стандартных принятых в пропедевтике диагностических мероприятиях. Поэтому базовым компонентом индивидуализированной оценки факторов риска и прогрессирования заболеваний является традиционный клинический осмотр и применение рутинных (лабораторные, опросники и шкалы) методов диагностики, принятых в общеклинической практике [1]. В то же время, основной задачей антивозрастной медицины является ранняя диагностика и профилактика заболеваний. Поэтому использование инновационных методов диагностики, позволяющих выявить заболевания еще в досимптоматический период, является истинно предиктивной задачей данного направления медицины.

Сегодня уровень научных достижений, особенно в области молекулярно-генетических исследований, позволяет предложить пациенту персонализированную диагностику. Благодаря этим исследованиям появилась реальная возможность проводить точную молекулярную диагностику, а также определять предрасположенность человека к различным соматическим и онкологическим заболеваниям. Молекулярно-генетический анализ позволяет выявлять наследственные варианты (полиморфизмы) генов, которые совместимы с жизнью, однако, в сочетании с неблагоприятными внешними факторами (лекарства, продукты питания, вредные привычки, загрязнения окружающей среды, инфекции) могут быть причиной различных патологических состояний и заболеваний как, например, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, остеопороз, сахарный диабет, бронхиальная астма,

некоторые онкологические заболевания и др. Информация об особенностях ДНК конкретного человека положена в основу составления индивидуального «Генетического паспорта» человека. Таким образом, генетический паспорт здоровья содержит информацию об особенностях структуры ДНК, индивидуальной предрасположенности человека к ряду заболеваний, а также рекомендации для пациента и его лечащего врача по профилактике этих заболеваний [5].

В последние годы появляется всё больше научных подтверждений того, что длина теломер является одним из молекулярных маркеров (биомаркеров) старения организма и поэтому может быть использована для определения биологического возраста [8]. Серьезным подтверждением справедливости теломерной теории старения служат результаты работ с клетками людей, страдающих прогериями – наследственными болезнями преждевременного старения. Здесь четко прослеживается корреляция между старением на молекулярном, клеточном и организменном уровнях: в клетках больных синдромами Хатчинсона-Гилфорда, Вернера и атаксией-телеангиэктазией длина теломерукороченна от рождения, лимит Хейфлика резко ограниченный, и фенотипические проявления старения развиваются у таких больных значительно раньше, чем у здоровых лиц. В связи с этим причинная связь естественного старения организмов с репликативным старением его клеток в настоящее время сомнений не вызывает. Кроме того, получены данные, что люди находящиеся в условиях стресса, плохой экологии, имеющие вредные привычки, подверженные частым воспалительным или хроническим заболеваниям, обладают более короткими теломерами, чем их сверстники. При отсутствии патологий и прочих стрессовых воздействий, скорость зависимого от возраста укорочения хромосом является более или менее постоянной величиной [10]. Наивысшие скорости укорочения теломер отмечены в лимфоцитах крови, что позволяет использовать венозную кровь в качестве биоматериала для проведения анализа для оценки длины теломер.

К настоящему времени опубликовано большое количество работ, в которых была измерена длина теломер у пациентов с различными заболеваниями, которые принято считать заболеваниями старшего возраста. Результаты исследований показали, что каждое укорочение

теломер лимфоцитов периферической крови на одну тысячу пар нуклеотидов соответствует троекратному увеличению риска инфаркта миокарда и инсульта, а также развития хронической сердечной недостаточности, диабета, болезни Альцгеймера [10].

Еще одни важным маркером оценки биологического возраста является оценка уровня мелатонина. Чем меньше по сравнению со среднепопуляционными показателями уровень мелатонина в организме человека, тем больше его биологический возраст [2]. Известно, что ведущую роль в физиологических механизмах старения и развития возрастной патологии отводится нарушениям в работе нейроэндокринной системы и прежде всего снижению функциональной активности пинеальной железы. Снижение с возрастом уровня мелатонина приводит не только к возрастным нарушениям хронобиотического характера, но и к возникновению некоторых нейродегенеративных заболеваний, метаболического синдрома, сердечно-сосудистых заболеваний и онкологии. Известно, что мелатонин обладает мощным антистрессовым эффектом. Этот факт обусловлен непосредственным влиянием мелатонина на нейромедиаторные системы, а также на синхронизацию циркадианного ритма. Являясь мощным иммуномодулятором и антиоксидантом, мелатонин нормализует гомеостаз, активируя защиту организма от стресса [2].

Таким образом, информация о длине теломер и уровне мелатонина может быть очень полезной не только для оценки биологического возраста человека, но и для предотвращения преждевременного развития некоторых заболеваний, связанных с возрастом.

2. Инновационные технологии в профилактике и лечении заболеваний в антивозрастной медицине.

Снижение уровня заболеваемости возможно достигнуть, только используя инновационные превентивные методы как диагностики, так и лечения. Ранняя диагностика возраст-ассоциированных заболеваний крайне необходима, однако не имея средств, влияющих на коррекцию, выявленных изменений, говорить о предиктивной медицине некорректно.

Молекулярно-генетическое тестирование позволяет получить заключение по предрасположенности организма пациента к различным заболеваниям и наследственным болезням. Оценка биологического

возраста (теломерный тест, уровень мелатонина) – позволяет оценить темпы старения и резервные возможности организма пациента. Однако, не имея средств, влияющих на темпы старения, экспрессию (работу) генов врач может только констатировать наличие предрасположенности человека к той или иной патологии или, в крайнем случае, рекомендовать таким пациентам определенный образ жизни, диету с целью снижения риска развития их заболеваний. Поэтому разработка и применение лекарственных препаратов, обладающих эпигенетической активностью, является таргетным путем к достижению здорового долголетия.

На сегодняшний день известен ряд препаратов, которые могут влиять на работу генов, и среди них наиболее широко применяются в клинической практике пептидные биорегуляторы. В России создание лекарственных препаратов на основе коротких пептидов активно начало развиваться с 70-х г. XX века сначала в Военно-медицинской академии, а затем было продолжено в Санкт-Петербургском Институте биорегуляции и геронтологии под руководством проф. Хавинсона В.Х. [3,4]. Известно, что в клетках образуются низкомолекулярные вещества пептидной природы, которые осуществляют перенос между клетками определенной информации, записанной с помощью последовательности аминокислот и конформационных модификаций, благодаря чему регулируется пролиферация, дифференцировка и межклеточные взаимодействия. Пептидные биорегуляторы обладают широким спектром биологической активности, воздействуя на экспрессию генов. Пептиды стимулируют синтез белка в клетках организма и регулируют функциональную активность органов и систем человека. Многолетние экспериментальные исследования показали, что короткие пептиды обладают высокой биологической активностью: увеличивают среднюю и максимальную продолжительность жизни животным, снижают частоту образования злокачественных опухолей, способствуют увеличению длины теломер, преодолению лимита деления клеток Хейфлика, восстанавливают функциональную активности клеток иммунной системы и эндокринной системы [7, 9].

Регулируя экспрессию генов, пептидные биорегуляторы стимулируют синтез белка в клетках организма, что способствует улучшению функциональной активности органов и систем человека. Таким обра-

зом, в результате регуляторных процессов, несмотря на действие патогенетических факторов, предупреждаются или ослабляются повреждения ДНК, мутации и патологические трансформации и усиливается течение репаративных процессов, направленных на восстановление клеточного гомеостаза [6]. Поэтому отличительной особенностью биорегулирующей терапии является ее физиологическое регулирующее действие на обменные процессы в клетке, которые, как известно, нарушаются при различных заболеваниях и в процессе старения.

Многолетние экспериментальные и клинические исследования показали, что индивидуальный подбор пептидных биорегуляторов (в зависимости от выявленной генетической предрасположенности к тому или иному заболеванию и оценки биологического возраста) позволяет осуществлять эффективную профилактику, лечение различных заболеваний и значительно улучшить качество жизни пациента. Кроме того, пятнадцатилетний опыт назначения пептидных биоргуляторов с учетом результатов молекулярно-генетического тестирования доказал снижение риска возникновения заболеваний по сравнению с пациентами, не получавшими пептидных препаратов, но имевшими предрасположенность к возникновению генетически детерменированного заболевания [5].

Таким образом, превентивные методы диагностики и применение лекарственных препаратов, обладающих эпигенетической активностью, являются таргетным путем к достижению здорового долголетия.

Литература

1. Ильницкий А., Трофимова С., Белов. Д., Газитаева З., Бирюкова И., Жабоева С. Превентивная гериатрия, как новое направление в клинической практике// Врач. – 2015 - № 6. – С. 29 – 31.
2. Кветная Т.В., И.В. Князькин, И.М. Кветной Мелатонин - нейроиммуноэндокринный маркер возрастной патологии / СПб.: ДЕАН, 2005. - С.106-107.
3. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем – цитомедины// Успехи соврем. Биол. 1983 Т. 96, Вып. 3(6). С. 339-352.
4. Морозов В.Х., Хавинсон Роль клеточных медиаторов (цитомединов) в регуляции генетической активности. ИзвестияАн СССР. Сер.биол. 1984 N 4. С. 581-587.

5. Трофимов А., Трофимова С. 15-летний опыт применения молекулярно-генетического исследования в клинической практике// Врач. – 2015 - № 6. – С. 66 – 68.
6. Хавнсон В.Х., Молекулярные основы пептидергическойрегляции старения// СПб., Наука, 2011, 174 с.
7. Хавинсон, В.Х., Соловьев, А.Ю., Тарновска С.И., Линькова Н.С. Механизм биологической активности коротких пептидов: проникновение в клетку и эпигенетическая регуляция экспрессии генов»// Успехи современной биологии, 2013 том. 133, № 2, с. 197-203
8. Damjanovic A.K., Yang Y., Glaser R. et al. Accelerated telomere erosion is associated with a declining immune function of caregivers of Alzheimer's disease patients. // J. Immunol. – 2007. – Vol.179, № 6 – P.4249–4254.
9. KhavinsonV.Kh.,Malinin V.V. Gerontological Aspects of Genom Peptide Regulation. – Basel (Switzerland): Karger AG.-2005. – 104 p.
10. Njajou O.T., Cawthon R.M., Damcott C.M., et at., Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. // Proc Natl AcadSci USA. – 2007. – Vol. 104, №29. – P. 12135–12139.

ГИПОКОАГУЛЯЦИОННЫЕ ЯВЛЕНИЯ КАК ФАКТОР СНИЖЕНИЯ РИСКА ВОЗРАСТНОЙ ПАТОЛОГИИ И УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ

Каландия Т.З.,Ахуба Л.О., Матуа А.З., Миквабия З.Я., Елистратова Ж.В., Горухчиева Ф.А., Сабекия Ж.Д.
Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Сухум, Абхазия
tea_78@mail.ru

Резюме

В работе представлены результаты обследования жителей Абхазии, разделенных на три возрастные группы: пожилые, старые и долгожители. Обследование включало в себя определение параметров свертывания крови и гемореологического профиля. Отмечен больший разброс результатов в старческой группе, отсутствие гиперкоагуляционных изменений в группе долгожителей. При исследовании гемореологического профиля в группе 60-75 лет была выявлена склонность к

гиперкоагуляции. У долгожителей подтверждается склонность к гипокоагуляции.

Ключевые слова: долгожители, продолжительность жизни, коагулограмма, гемостаз, реология, гиперкоагуляция, гипокоагуляция.

HYPOCOAGULASION EFFECTS AS A FACTOR IN THE REDUTION OF THE RISK OF AGE-RELATED PATHOLOGY AND INCREASE IN THE DURATION OF LIFE

Kalandya T.Z., Akhuba L.O., Matua A.Z., MikvabiaZ.Ya, ElistratovaZh.V.,Goruhchieva F.A., SabekiaZh.D.
Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum.
tea_78@mail.ru

Abstract

The results of inspection of the habitants of Abhazia, divided into three age-related groups, are in-process presented: elderly, old and long-livers. An inspection was plugged in itself by determination of parameters of blood coagulation and heamorheological profile. Greater variation of results in a senile group, absence of hypercoagulative changes in the group of long-livers is marked . At research of heamorheological profile in a group propensity was 60-75 educed to the hypercoagulability. Long-livershaveatendencytohypocoagulation.

Key words:long-livers, life expectancy, coagulogram, hemostasis, rheology, hypercoagulation, hypocoagulation.

Введение. В условиях постоянного роста численности пожилого населения в мире, вопросы сохранения здоровья и увеличения средней продолжительности жизни представляют собой глобальную проблему. Определение понятия здорового старения и изучение механизмов, формирующих его основу, составляет одно из приоритетных исследований в геронтологии. Абхазия относится к признанным регионам

долгожительства. В связи с практически отсутствующими данными по ряду лабораторных показателей, в ходе комплексного обследования представителей старших возрастных групп было проведено обследование гемостазиологических и реологических параметров.

Цель: изучение гемостазиологических и реологических показателей у жителей Абхазии разных возрастов в сравнительном аспекте.

Методы исследования.

Исследование системы гемостаза выполнено на полуавтоматич ескомкоагулометреTS 4000. Коагулограмма включала определение протромбинового времени и индекса, МНО, тромбинового времени, АЧТВ и концентрации фибриногена.

Гемореологический профиль обследованных включал в себя следующие параметры:

- измерение уровня гематокрита на гематокритной центрифуге;
- измерение вязкости крови и плазмы на АКР-2;
- Параметры агрегации и дезагрегации на приборе ЛАДЭ-5

определяли при стандартной гематокритной величине 0,40 л/: Peack, величина, характеризующая способность эритроцитов к деформации -ротационная ригидность, единица измерения у.е.; Т1 – время образования линейных агрегатов, «монетных столбиков», единица измерения секунды (с).

В ходе работы было обследовано 40 жителей Абхазии, в возрасте от 63 до 99 лет. Взятие крови у пациентов осуществляли на дому.Согласно классификации ВОЗ обследуемые были разделены на три возрастные группы: пожилого возраста от 60 до 74 лет (n=8), старческого от 75 до 89 лет (n=17), и долгожителей от 90 лет и старше (n=6). В качестве контрольной группы были обследованы 8 человек в возрасте 20-30 лет.

Состояние относительного здоровья определяли по анамнезу и состоянию пациента на момент обследования. Основными критериями были: состояние сознания, двигательная активность и способность к самообслуживанию, отсутствие серьезных нарушении со стороны основных физиологических систем, которые были исключены дополнительной инструментальной диагностикой и консультацией врачей разного профиля (терапевт, кардиолог, невролог, клинический психолог).

Из хронических заболеваний практически у всех были выявлены гипертоническая болезнь (умеренная I-II степени), реже заболевания опорно-двигательного аппарата и заболевания ЖКТ.

При исследовании протромбинового времени (ПВ) и индекса (ПИ) обнаружилось следующее. (таблица 1) В группе пожилых ПВсоставляет 18,5±3,6 сек, при очень широком разбросе результатов – от 13,7сек до 23 сек. Протромбиновый индекс при этом составил 87,6±13,5% соответственно при чрезвычайно широком диапазоне полученных значений – от 61,5% до 105,7%. МНО при этом в данной возрастной группе составило 1,17±0,9 (0,82-1,6). В группе старческого возраста ПВ в среднем составило 18,7±2,6, диапазон от 15 до 24,7 сек. ПИ соответственно – 81,7±7,4%, диапазон полученных значений –70- 96%. МНО в этой возрастной группе было в пределах 1,04-1,5, при среднем значении 1,25±0,12. В группе долгожителей ПВ было в среднем 18,2±2,3 сек., при колебаниях от 14,7 до 24 сек. ПИ составил 85,2±9,8%, при колебаниях от 70% до 105%. МНО было в пределах 1,03 – 1,63, при среднем значении 1,24±0,2.

Таблица 1.

Показатели внешнего пути свертывания крови

Показатель Возрастная группа	Протромбиновое время, сек (норма 14-18)	Протромбиновый индекс, % (норма 90-105)	МНО (норма 0,85-1,15)
Долгожители	18,2±2,3	85,2±9,8	1,24±0,2
Старческий возраст	18,7±2,6	81,7±7,4	1,04-1,5
Пожилой возраст	18,5±3,6	87,6±13,5	1,17±0,9
Контрольная группа	17,9±0,9	80,8±4,0	1,28±0,1

Обращает на себя внимание концентрация фибриногена в обследованных группах.(таблица 2) У пожилых и старых концентрация фибриногена находится в пределах нормы. У геронтов она близка к нижней границе нормы, а в ряде случаев и ниже нее. Наблюдались колебания от 1,2 до 3,4 г/л, при среднем значении 1,82±0,6. Схожая картина наблюдается в контрольной группе. Показатели пожилой и старческой групп достоверно отличаются от предыдущих.

Таблица 2.

Показатели внутреннегопути свертывания крови

Показатель Возрастная группа	Тромбиновое время, сек (норма 9-12)	АЧТВ, сек (норма 24-34)	Фибриноген, г/л (норма 1,8-4,0)
Долгожители	8,79±1,1	31,15±4,7	1,82±0,6
Старческий возраст	9,1±1,3	30,7±3,6	2,11±0,5
Пожилой возраст	9,87±2,6	31,0±4,6	2,3±0,8
Контрольная группа	8,58±0,6	29,9±2,3	1,47±0,2

Поскольку АЧТВ и тромбиновое время (ТВ) являются показателями внутреннего звена гемостаза, то, видимо, гипофибриногенемия закономерно влечет за собой увеличение АЧТВ. В старших возрастных группах этот показатель приближается к верхней границе нормы при очень широком диапазоне значений. У долгожителей наблюдались колебания АЧТВ от 24,8 сек до 44,8 сек, при этом большая часть результатов была в пределах 30-33 сек, среднее значение составило 31,15±4,7. В пожилой и старческой группе АЧТВ не достигало таких цифр, однако разброс значений составил 22,9-36,0 сек и 25,4-37,9 сек соответственно. Что касается тромбинового времени, то самый большой диапазон значений мы получили в старческой группе – от 7 сек до 13 сек, при среднем значении 9,31±1,3, и в группе пожилых – от 8,2 до 14 сек, при среднем значении 9,87±2,6сек. Следует отметить, что тромбиновое время - показатель, тесно связанный с уровнем фибриногена в крови. Однако в группе долгожителей мы не отметили ожидаемого увеличения ТВ на фоне снижения фибриногена, среднее значение ТВ там составило 8,79±1,1сек, при меньшем диапазоне колебаний полученных цифр. И этот параметр также схож с таковым в контрольной группе.

При анализе гемореологического профиля в группе 60-75 лет была выявлена склонность к гиперкоагуляции. А именно: повышение вязкости крови до 4,5 ±0,2 мПа/с , увеличение вязкости плазмы до 2,3 ±0,4, такая картина на фоне со снижением ротационной ригидности эритро-

цитов (Peak = 57±7,12 у.е.) может привести к застою в микроциркуляторном русле и замедлению тока крови у пожилых людей. В группе геронтов выражена тенденция к гиповискозным явлениям: снижение уровня гематокрита до 0,30 ± 0,0 5л/л, понижение вязкости крови до 2,8 ±0,31 мПа/с, вязкость плазмы не отличается от таковой в контрольной группе группе (до 25 лет). Ротационная ригидность достоверно выше, чем у пожилых людей, и неотличима от показателей контрольной группы: 119,2 ± 25, 34 у.е. и 167 ±31,24 у.е., соответственно. При анализе скорости образования двумерных агрегатов следует отметить, что быстрее всего они образуются в группе пожилых за 10,1±1, 22 с. В контрольной группе это занимает 15±2,25 с. А у долгожителей значительно удлинено:22, 34 ± 3, 15 с, что еще раз подтверждает склонность в этой группе к гипокоагуляции.

Выводы.

1. Несмотря на сходство всех показателей, достоверно ближе всего друг к другу оказались показатели контрольной группы и долгожителей.

2. Следует отметить, что во всех группах (кроме контрольной) наблюдался широкий диапазон показателей, которые как были в норме, так и выходили за ее пределы.

3. В группе старческого и пожилого возраста был выявлен наибольший процент людей с показателями, выпадающими за пределы нормы.

4. В отношении показателей гемостаза можно отметить сохранение концентрации основных показателей на постоянном уровне в группе геронтов со сдвигом в сторону гипокоагуляции, что подтверждается реологическим исследованием крови.

5. При анализе гемореологического профиля в группе 60-75 лет была выявлена склонность к гиперкоагуляции.

Литература

1. Абхазское долгожительство **/** Козлов В.И., М.: «Наука».-1987.-С.5-16
2. Голубева В.Л., Матюхина Е.Б., Адеишвили Т.Ш., и др. Возрастные особенности лабораторных показателей крови у пациентов старшего возраста и

долгожителей г. Москвы // Вестник службы крови России. – 2004. – №2. – С.34-41.
3. Каландия Т.З. Периферическое звено гемопоэза и некоторые биохимические показатели у лиц различных возрастных групп, проживающих в Абхазии. Автор.дис. к.б.н. Москва. – 2006.- 99с.
4. Кытикова О.Ю., Гвозденко Т.А., Веремчук Л.В. Особенности взаимосвязей гомеостаических систем как показателей адаптивных перестроек у пожилых // Успехи геронтологии. – 2015.-Том 28.-№ 2.-С.290-293.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭКОЛОГО-СОЦИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОДЛОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ (НА ПРИМЕРЕ ЖИТЕЛЕЙ АБХАЗИИ СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП)

Каландия Т.З.[1], Джикирба С.К.[2]
[1]Научно-исследовательский центр экспериментальной патологии и терапии Сухум, Абхазия
[2]Абхазский государственный университет, Сухум, Абхазия
tea_78@mail.ru

Резюме

В работе представлены результаты анкетирования жителей Абхазии старческого возраста и долгожителей. Дано описание сведений о наследственности, истории жизни, трудовой деятельности, семейного положения, социально – бытовых условий жизни, места рождения и места проживания на основе опроса респондентов старших возрастных групп. Показано, что благоприятные эколого-социальные факторы, отсутствие резкой смены условий жизни, сохранение физической активности являются условием для сохранения здоровья, увеличения продолжительности жизни и достижения долголетия.

Ключевые слова: долгожители, экология, продолжительность жизни, климат, состояние здоровья.

EVOLUSHON OF ECOLOGICOL AND SOCIAL FACTORS IN FLUENCING LONGEVITY OF LIFE (ON EXAMPLE OF RESIDENTS OF ABKHAZIA OF OLD AGE GROUPS)

Kalandya T.Z., Djkirba C.K.

Abstract

The results of questionnairing residents of old age and long-living males in Abkhazia are summed up in this work. Some information on heredity, history of life, labor activity, family status, conditions of daily life, place of birth, place of residence is given on the basis of questioning the respondents of old age groups. It is shown that favourable ecological and social factors, absence of sudden change of living conditions, keeping up the physical activity are the reasons for health preserving, age of life increasing and achievement of long living.

Key words: long-living males, ecology, age of life, climate, health status.

Введение. В течение последних 160 лет ожидаемая продолжительность жизни в экономический развитых странах постоянно увеличивалась со средней скоростью 3 месяца в год. Этот феномен, равно как и существенное постарение населения экономический развитых и развивающихся стран, т.е. увеличение в его структуре доли пожилых, ставшее особенно заметным в последней части XXI века, вызвали закономерное и значительное увеличение интереса к геронтологии и прежде всего к изучению первичных механизмов старения организмов и популяций, и факторов, определяющих продолжительность жизни. В мире растет понимание того, что построение общества, в котором все члены могут рассчитывать на долгую здоровую жизнь, является важнейшей задачей. Высокая актуальность проблем долгожительства в современный период развития человечества требует практического решения, как для экономики, так и для реформирования системы здравоохранения. Феномен долгожительства с этой точки зрения представляет собой модель естественного физиологического старения.[1]

Целью данной работы является: опираясь на встречи и беседы с долгожителями и людьми старческого возраста показать влияние экологических и социальных факторов на продолжительность жизни (на примере жителей Абхазии).

Методы исследования. В соответствии с поставленной целью в исследовании решались следующие задачи:

- Опрос и составление анкет жителей Абхазии в возрасте 74-89 лет
- Опрос и составление анкет жителей Абхазии в возрасте 90 лет и старше.
- Описание сведений о наследственности, истории жизни, трудовой деятельности, семейного положения, социально – бытовых условий жизни, места рождения и места проживания на основе опроса респондентов обеих возрастных групп.

Результаты и их обсуждение. В процессах старения на возрастные изменения органов и тканей наслаиваются и те, что вызваны внешними воздействиями. Обусловленные старением изменения – это физиологические процессы, которые, по мнению многих ученых, первично не являются заболеваниями, но все же приводят к ограничению функциональных возможностей организма и снижению его устойчивости к различным вредным влияниям.[6]

Эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 80-х гг. XX в. определили ориентировочное соотношение различных факторов обеспечения здоровья современного человека, выделив в качестве основных четыре группы таких факторов. [1, 4, 5]

Таблица №1.

Факторы, влияющие на здоровье человека

Факторы, влияющие на здоровье (по данным ВОЗ). Сфера влияния факторов	Факторы, укрепляющие здоровье	Факторы, ухудшающие здоровье
Генетические – 15-20% (20%)	Здоровая наследственность. Отсутствие морфофункциональных предпосылок возникновения заболевания.	Наследственные заболевания и нарушения. Наследственная предрасположенность к заболеваниям.

Состояние окружающей среды – 20-25% (20%)	Хорошие бытовые и производственные условия, благоприятные климатические и природные условия, экологически благоприятная среда обитания.	Вредные условия быта и производства, неблагоприятные климатические и природные условия, нарушение экологической обстановки.
Медицинское обеспечение 10 -15% (8%)	Медицинский скрининг, высокий уровень профилактических мероприятий, своевременная и полноценная медицинская помощь.	Отсутствие постоянного медицинского контроля за динамикой здоровья, низкий уровень первичной профилактики, некачественное медицинское обслуживание.
Условия и образ жизни – 50-55% (52%)	Рациональная организация жизнедеятельности: оседлый образ жизни, адекватная двигательная активность, социальный образ жизни.	Отсутствие рационального режима жизнедеятельности, миграционные процессы, гипо- или гипердинамия.

Биосфера планеты Земля является древней многокомпонентной биогеохимической и биоэнергетической системой, образующей внешнюю планетарную оболочку, которая является основным и единственным условием существования и процветания живых организмов. Однако исторический опыт показал, что биосфера и ее компоненты крайне хрупки. В 20 веке биосфера планеты вступила в период глубоких и опасных для человека и для жизни вообще локальных и глобальных экологических изменений и катастроф, вызванных недостатками и ошибками хозяйственной деятельности.[3]

Вклад экологических факторов в риск развития нарушений состояния здоровья населения непостоянен и зависит от вида анализируемых нарушений, конкретных географических, экономических и многих других особенностей исследуемого региона. Возрастающее загрязнение окружающей среды стало оказывать значительное влияние на здоровье населения. При этом по данным исследователей около 70 % загрязняющих веществ поступает в организм человека с пищей, поряд-

ка 20 % - из воздуха и приблизительно 10 % - с водой. Все это не может не сказаться на продолжительности жизни человека.[3]

По мнению ученых, состояние окружающей среды в регионе оценивается как кризисное и представляет собой сложную целостную систему взаимосвязанных биологических ресурсов, в том случае если в данном регионе расположены: предприятия черной и цветной металлургии, машиностроения, лесохимического комплекса, электроэнергетики. В этом отношении экологическая обстановка в Абхазии может считаться благополучной, так как в регионе отсутствуют предприятия упомянутых отраслей промышленности.

К числу наиболее важных факторов, определяющих состояние биосферы, также относится климат, оказывающий существенное влияние на человека, хозяйственную деятельность, экономику и окружающую среду в целом.

Если говорить о климатогеографических условиях в контексте изучаемого вопроса, то распространено мнение, что долгожительством отличаются жители гор. И хотя в данное время большинство абхазских селений расположены на высоте до 500-600 метров над уровнем моря, есть основания считать, что в прошлом большая часть абхазов жила на высокогорье. Абхазия, занимающая южный склон западного Закавказья и северную часть Колхидской низменности, характеризуется особенно резко выраженной вертикальной дифференциацией климатических зон и исключительным разнообразием климатических условий сильно связанных с пересеченным горным рельефом.[7]

Климат и природа региона довольно благоприятны. Зимой средняя температура воздуха – около пяти градусов тепла, смена сезонов не сопровождается резкими перепадами температуры. Важным климатическим фактором является Черное море, оказывающее смягчающее влияние на климат побережья. [5]

Что касается места жительства наших респондентов, то большинство представителей обеих возрастных групп проживают в различных селах Очамчырского и Гудаутского районов.

Из 18 опрошенных долгожителей трое живут в городе Сухум. Однако только один из них является коренным жителем, остальные были вынуждены переехать сравнительно недавно, из-за того, что уже не

в состоянии вести самостоятельную жизнь. Трое из города Гал, из них только один является коренным жителем. Остальные из сел Очамчирского района.

Среди 23 опрошенных старческого возраста восемь человек из Гудаутского района. Четверо из города Гудаута, трое из них коренные жители, один из села Куланырхуа. Восемь человек из города Сухум, из них коренных жителей двое. Остальные из различных сел Очамчырского района. 10 человек из группы долгожителей и 14 человек из старческой группы сменили место жительства. При этом следует отметить, что даже при переездах не было резкой смены условий проживания. Поскольку большинство респондентов, согласно опросу, являются сельскими жителями, лишь в последние годы переехавшими в города, то можно сделать вывод, что основная доля долгожителей, как и прежде, проживает в деревнях, что соответствует данным литературы.

Среди долгожителей из 18-ти респондентов девять женщин и девять мужчин, в группе старческого возраста 12 мужчин и 11 женщин. Из 21 опрошенных и анкетированных мужчин 14 служили, остальные по различным причинам службы в армии не проходили. В основном своем все служившие проходили службу в течение трёх лет. Из 41 опрошенных, семеро участвовали в боевых действиях, двое в ВОВ, пятеро, в Отечественной Войне Абхазии. Среди них одна женщина. Никаких ранений или травм в ходе боевых действий получено не было.

Согласно литературным данным особенности возрастных изменений сердечно-сосудистой и нервной систем в национально-этнических группах послужили основанием высказать предположение о замедленном темпе старения в регионах с высоким уровнем долголетия и сформулировать синдромы старения. У абхазцев синдром старения – сосудистый, а функциональной системой, поддерживающей сохранность здоровья долгожителей, является центральная нервная система. У 75% абхазских долгожителей диагностированы различные стадии ишемической болезни сердца, гипертоническая болезнь, остаточные явления перенесенного инсульта эндартериит нижних конечностей, заболевание нервной системы (паркинсонизм). Ни у одного из долгожителей не отмечено старческого слабоумия.[2]

Эти данные в общем совпадают с данными, полученными нами. Так, говоря о состоянии здоровья респондентов на данном этапе, сре-

ди 18 долгожителей наблюдаются следующие заболевания: возрастные изменения сознания у 4х респондентов (22%), заболевание опорно-двигательной системы у 10х респондентов (55%), среди нарушений опорно-двигательной системы в основном ревматизм остеохондроз. Заболевания сердечно-сосудистой у 8х (44%), в основном гипертоническая болезнь.

Среди старческой группы встречаются следующие заболевания: язвенные болезни желудочно-кишечного тракта(у 5х из 23 человек – 21%). У шестерых респондентов(26%)гипертоническая болезнь. У ещё шестерых (26%) из-за различных травм нарушение двигательного аппарата. Двое страдают артрозом,у одного респондента заболевание щитовидной железы. У двоих катаракта. И только у двоих респондентов жалобна здоровье нет.

Ни у одного из опрошенных по данным историй болезней в семье не было психических заболеваний или каких-либо серьезных наследственных отклонений. Почти все анкетированные вели здоровый образ жизни, никаких серьезных заболеваний в детском и раннем возрасте (по их словам) не было.

Выводы:

1. Почти все опрошенные и анкетированные из группы долгожителей подвержены заболеваниям, являющимся следствием не столько ухудшения экологических условий, сколько связанных с возрастными изменениями. Однако в группе старческого возраста (74-89 лет) выявлено больше различных заболеваний, по сравнению с долгожителями, что согласуется с литературными данными.

2. Поскольку состояние здоровья долгожителей относительно стабильное, мы можем сделать вывод о положительном влиянии благоприятной экологической обстановки на продолжительность жизни.

3. Почти все долгожители, с которыми мы беседовали, утверждают, что труд был нормой на протяжении всей жизни, в пожилом возрасте работа для них была не столько необходимостью, сколько привычкой. Соответственно, двигательная активность положительно влияет на состояние здоровья и продолжительность жизни, что согласуется с литературными данными.

4. Наличие в семье долгожителей, скорее всего, дает большую вероятность, что в последующие поколения доживут до долголетия. Та-

кой вывод мы сделали, основываясь на полученных результатах анкетирования: из 18-ти долгожителей у девятерых один из родителей или оба были долгожителями. Однако, для того чтобы подтвердить или опровергнуть данное заявление необходимы более подробные исследования, в том числе и генетические.

5. Подавляющее большинство респондентов проживает в селах Очамчирского и Гудаутского районов. Среди долгожителей, лишь один является коренным жителем г. Сухум. что позволяет сделать вывод о том, что жители сельских местностей (в основном предгорий), отличаются большей продолжительностью жизни в сравнении с городскими жителями.

Литература

1. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб.: Наука, 2008. — Т. 2. — 434 с.
2. Кузнецова С.М. Средовые и генетические факторы феномена группового долгожительства. // Здоровье Украины, Киев, 2003.
3. Переломов Л.В., Переломова И.В., Венѐвцева Ю.Л. Основы медицинской экологии. Учебное пособие для студентов медицинских высших учебных заведений. – Тула, 2007, 176 с.
4. Профилактика старения для всех: методическое пособие/ Под редакцией В.Н. Анисимова. – М.: Издательство «Учитель», 2015. – 120с.
5. Солонин Ю.Г. Физиологические показатели у женщин на севере при старении. // Клиническая геронтология, т.3, №4, 1997.
6. Титов Д.С. Социальная геронтология: учебное пособие. Томск: Томский филиал Академии права и управления ФСИН России, 2006 – 106 с.
7. Экба Я.А., Дбар Р.С. Экологическая климатология и природные ландшафты Абхазии. – Сочи: «Папирум-М-Дизайн», 2007.- 324с.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОМЕНА ДОЛГОЖИТЕЛЬСТВА АБХАЗОВ: ПОЛИМОРФИЗМ АРОЕ

Квеквескири К.Б.[1], Бец Л.В.[2], Спицын В.А.[3], Гогуа М.Л.[1], Макаров С.В.[3]

Абхазский государственный университет, г. Сухум [1]
Московский государственный университет, биологический факультет, кафедра антропологии, Москва [2]
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико- генетический научный центр», Москва [3]

Резюме

Статья представляет результаты анализа образцов ДНК буккального эпителия, полученного от жителей сел Члоу, Отап, Арасадзых в 2013 году. Были сформированы две группы: лица старшей возрастной группы (от 75 лет до 101 года) и контрольной группы (16 -33 года). Был изучен полиморфизм гена аполипопротеина Е (АПОЕ), ассоциированного с продолжительностью жизни. Была установлена частота генотипа и аллелей гена АПОЕ.

Ключевые слова: долголетие, продолжительность жизни, абхазы, полиморфизм аполипопротеина Е (АПОЕ).

GENETICSTADYOFTHEPHENOMENOFLONGEVETYOFABKHAZIANS: POLYMORPHISMAPOE

Kvekveskiri K.B.[1], Bez L.V.[2], Spitsyn V.A.[3], Gogua M.L.[1], Makarov S.V.[3]

Abkhaz State University, Faculty of Biology and Geography, Department of Ecology and Animal Morphology, Sukhum, e-mail: kristina2002@yandex.ru[1]
Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Anthropology, Moscow[2]
Federal State Budget Scientific Institution "Medico-genetic research center"115478, Moscow[3]

Abstract

The article presents the results of analysis of DNA samples from the buccal epithelium of Abkhazians. The material was collected in the villages of Chlou, Otap, Arasadzykh in 2013; Two samples were selected: those of the older age group (75-101 years) and the control group (16-33 years). Polymorphism of the apolipoprotein E gene (APOE), associated with the effect of life expectancy, was investigated. The frequencies of the genotypes and alleles of the APOE gene are established.

Key words: longevity, life expectancy, Abkhazians, APOE polymorphism.

Ведение. Известный феномен долгожительства в Абхазии и ряде других регионов Кавказа вновь привлекает внимание медиков и биологов в связи с обнаружением полиморфных генов, ответственных за продолжительность жизни. Эффект продолжительности жизни определяется двумя основными факторами- эндогенными (особенности того или иного организма) и экзогенными, или эколого- средовыми. В последнее время в центре внимания оказываются эндогенные факторы, определяющие индивидуальные особенности функционирования сердечно- сосудистой, нервной, эндокринной и других систем.

Этнический аспект генетических факторов долгожительства может быть обусловлен традициями этнической эндогамии- преимущественным заключением браков внутри этносов, в связи с чем и гены (аллели), способствующие долголетию, могут концентрироваться внутри тех или иных этносов [1]. При этом особенностью брачного института абхазов является характерное соблюдение строгой экзогамии по отцовскому и материнскому роду. Экзогамные ограничения распространяются не только на родственников, но и на однофамильцев, приемных детей и т.д. Выработанный необычайно широкий реестр брачных ограничений со строгим соблюдением всех принципов является следствием негативного отношения к возможности кровного родства в браках. Соблюдение в поколениях традиций «структурированной экзогамии» в рамках абхазского этноса приводит к этнической эндогамии и соответственному росту вклада определенного кровного родства [3].

Современные генетические исследования позволяют констатировать, что особого «гена долгожительства» не существует. Речь может идти о наличии у определенной категории людей своего рода генетических факторов жизнестойкости, которые программирую успешное функционирование тех или иных физиологических систем. Удачная комбинация генов и совокупности эколого- средовых факторов может способствовать у конкретных индивидов достижению долголетия.

Важнейшим итогом выполнения Международного проекта «Геном человека» явилась идентификация практически всех генов человека, целый ряд из которых, как показали дальнейшие исследования, прямо или косвенно вовлечен в процесс старения [2]. Особенно перспективной представляется область воздействия на качество здоровья и продолжительность жизни через гены продолжительности жизни, мутации (или аллельные варианты) которых способствуют развитию тяжелых заболеваний.

К числу таких генов принадлежит ген *APOE*, расположенный на 19 хромосоме в локусе q 13.2, состоящим из 4 экзонов и 3 интронов, кодирующий белок аполипопротеин Е (apoE). Методом изоэлектрофокусирования выявляются три общие для человека изоформыapoE: apoE2, apoE3 и apoE4, отличающиеся аминокислотными остатками в положениях 112 (Cys112Arg) и 158 (Arg158Cys), вызванные однонуклеотидными заменами [5]. Аллель Е3, определяющий apoE3, является обычным, наиболее распространенным, тогда как аллели Е2 (кодирует apoE2) и Е4 (кодирует apoE4) являются более редкими формами. Этот полиморфизм в популяциях человека характеризуется 6 генотипами: три гомозиготы (Е3/3, Е2/2, Е4/4) и три гетерозиготы(Е2/3, Е2/4, Е3/4) [7].

Полиморфизм Е2/Е3/Е4 оказывает существенное влияние на метаболизм липопротеинов. Установленным фактом является то, что уровень холестерина последовательно повышается от Е2 к Е3 и Е4 [7]. Таким образом, изоформыapoE оказывают влияние на концентрации липидов и липопротеинов в сыворотке крови, которые являются важными факторами риска сердечно- сосудистых заболеваний. В работе [4] показано, что частота аллеля е4 среди пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) связана с возрастом начала развития заболевания. У пациентов с началом БА до 60 лет и после 80 лет частота аллеля е4 ниже, чем в возрастном промежутке 65-75 лет. Риск возникновения БА

у гомозигот по е4 возрастает с 5- до 15- кратного уровня от 40 до 60 лет, а затем снижается к 90 годам. В 1994 году [6] была обнаружена повышенная частота аллеля*APOE* е2 среди людей, доживших до столетнего возраста. Частота фактора е2 среди людей старше 90 лет вдвое больше, чем среди людей среднего возраста (44-53). Таким образом, система АРОЕ е2 может быть ассоциирована с эффектом долгожительства.

Материалы и методы

В исследование включены образцы буккального эпителия, полученные от жителей сел Члоу, Отап, Арасадзых. Материал был собран весной 2013 года.

Были сформированы две выборки:

1) лица старшей возрастной группы (от 75 лет до 101 года);
2) контрольная выборка средней по возрасту когорты (от 16 до 33 лет). В целом. Было коллекционировано и изучено 170 образцов биологического материала.

Выделение ДНК из образцов буккального эпителия осуществлялось с использованием набора реагентов «ДНК-сорб-В» в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoftInc). Достоверность различий в частотах генотипов и аллелей *APOE* между сравниваемыми группами определяли по величине x^2.

Результаты и обсуждение. Наличие полиморфизма в гене *APOE* в суммарной выборке позволило выявить следующие генотипы: 3/3, 2/3, 3/4, 4/4, 2/4, 2/2 (табл.1). В таблице 2 представлены сравнительные данные по численностям генотипов *APOE* для двух возрастных групп абхазов. Результаты показывают, что среди лиц старшей возрастной группы отсутствуют редкие гомозиготные формы *APOE*2-2 и 4-4, а также только в одном случае наблюдалась гетерозигота 3-4 по редкому аллелю АРО*Е4.

Таблица 3 демонстрирует данные о распределении частот аллелей гена АРОЕ среди лиц старшей возрастной группы и средней по возрасту группе (контроль). Статистически значимые различия констатированы между старшей возрастной группой и контролем по частотам аллелей *APOE*3* и *APOE*4* на уровне P<0,05.

Таким образом, результаты подтверждают тенденцию к максимальному возрастанию среди долгожителей частоты наиболее распространённых в популяциях аллелей. Группа долгожителей также достоверно отличается от контрольной выборки по частотам генотипов при x^2 =10,072; d.f.= 5; P<0,05. Генотипы 3-4 и 4-4, а также аллель *APO*E4* представляются неблагоприятными для достижения индивидами возраста долгожительства. Напротив, для потенциального возрастания продолжительности жизни благоприятными представляется аллель *APO*E3* и генотипы, определяемые данным аллелем.

Таблица 1.

Численности генотипов и частоты аллелей системы APO E в изученной выборке абхазов, в целом

Частоты генотипов	Наблюдаемые	Ожидаемые	Частоты аллелей
3-3	133	131,47	APO E*3 = 0,8794 0,0177
2-3	21	21,11	APO E*2 = 0,0706 0,0139
3-4	12	14,95	APO E*4 = 0,0500 0,0118
2-4	1	1,20	X2 = 6,4981 d.f. = 3 P > 0,05
4-4	2	0,43	
2-2	1	1,20	

Таблица 2.

Численности генотипов APOE в сравниваемых групп долгожителей и контроля

Долгожители (N=78)			Контроль (N=97)		
Генотип	N (obs.)	N (exp.)	Генотип	N (obs.)	N (exp.)
3-3	69	67,32	3-3	64	63,61
2-3	7	7,49	2-3	14	13,30
3-4	1	1,87	3-4	11	12,47
2-4	1	1,10	2-4	0	0,70
4-4	0	0,01	4-4	2	0,61
2-2	0	0,21	2-2	1	1,30

Таблица 3.

Распределение частот аллелей гена APOE при сравнении групп долгожителей и контроля методом χ^2

Частоты аллелей	Долгожители	Контроль
APO*E3	0,93590,0196	0,83150,0276
APO*E2	0,05130,0177	0,08700,0208
APO*E4	0,01280,0090	0,08150,0202
X2(на равновесие Харди-Вайнберга)	χ 2 = 8,5150 d.f. =3 P < 0,05	χ 2 = 4,8038 d.f. =3 P>0,05

Литература

1. Абхазское долгожительство/ отв. ред. В.И. Козлов.- М.: Наука, 1987.-294 с.
2. Генетический паспорт- основа индивидуальной и предиктивной медицины/ под ред. В.С. Баранова.- С-Пб.: Н-Л, 2009.-527 с.
3. СпицынаН.Х. ДемографическийпереходвРоссии.-М.:Наука, 2006.-213 с.
4. Frisioni G., Manfredy M., Geroldi C. et fi. The prevalence of apo E-e4 in Alzheimersdisease is age dependent// Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry.- 1998.- Vol. 31. –P. 545-548.
5. Riddl D.R., Grahm A., Qwen J.S. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L- arginine nitric oxide pathway. Implications for vascular disease//J.Biol. Chem.- 1997.- Vol. 272.- P. 89-95.
6. Schachter F., Faure- Delanef L., Guenot F et al. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci//Nat.Genet.- 1994.- Vol. 6-P. 29-32.
7. Setiest G., Pillot T., Regia-Bailly A. et al. Apolipoprotein E: An important gene and protein to follow in laboratory mtdicine// Clinical Chemystry.-1995.- Vol. 41, № 8.-P 1068- 1086.

ВОЗРАСТНАЯ СПЕЦИФИКА ПОНИМАНИЯ КОНФЛИКТА

Макаревская Ю.Э., Григорьев М.В.
ФБГОУ ВО «Сочинский государственный университет»
г. Сочи, Россия
yuliya-sochi@mail.ru

Резюме

В статье представлены результаты исследования представлений о конфликте субъектами различных возрастных групп. Конфликт рассматривается в статье как актуализированное противоречие и как неотъемлемая часть общения с различных социальных ситуациях. В исследовании использовались методы психологии понимания для стимуляции рефлексивных процессов осмысления конфликтных взаимодействий. Были определены универсальные и специфические компоненты понимания конфликта респондентами различных возрастных групп.

Ключевые слова: психология конфликта, психология понимания, понимание конфликта, возраст оппонента, медиация.

AGE SPECIFICS OF UNDERSTANDING OF THE CONFLICT

Makarevskaya Yu.E., Grigoryev M.V.
Sochi State University
Sochi, Russia
yuliya-sochi@mail.ru

Abstract

Results of a research of ideas of the conflict by subjects of various age groups are presented in article. The conflict is considered in article as the staticized contradiction and as an integral part of communication with various social situations. In a research understanding psychology methods for stimulation of reflexive processes of judgment of conflict interactions were used. Universal and specific components of understanding of the conflict have been defined by respondents of various age groups.

Key words:conflict psychology, understanding psychology, understanding of the conflict, age of the opponent, mediation.

Введение. Проблема конфликтов и поведения личности в конфликтных взаимодействиях является на сегодняшний день неисчерпанной в психологии и конфликтологии.

Видение и понимание конфликта субъективно различается иначе разрешать их было бы намного проще. Современные конфликтологи (модераторы) знают, что именно субъективное представление о конфликте, о его предмете и способе разрешения часто являются «камнем преткновения» из-за которого конфликтующие стороны буквально не слышат друг друга.

Восприятие и понимание некого явления определяет субъективные варианты реагирования. Методы понимания (интроспекция, самоотчет, эмпатия, идентификация и др.) хорошо известны в психологии. Основные исследовательские традиции (когнитивная, герменевтическая, экзистенциальная) и способы понимания (парадигматический, нарративный тезаурусный) определены [6, с.342-375]. Данное направление психологии может охватить своими исследовательскими возможностями обширную область феноменов.

Цель. Основываясь на том, что понимание является преломляющим звеном между отражением реальности и поведением человека, мы сконцентрировались в данном исследовании именно на понимании феномена конфликта представителями разных возрастных групп (от подросткового до пожилого).

Методы. Методологической основой данной работы выступают:

- теоретические положения о природе и структуре конфликта как социально-психологического феномена в Бабосова Е.М., Дружинина В.В., Гришиной Н.В., Шипилова А.И. и др.;

- психологическую концепцию понимания В.В. Знакова.

Сам конфликт как социально-психологический феномен теоретически изучен достаточно хорошо [1,3,4 и др.]. Однако, его эмпирическое изучение затруднено из-за сложности этого феномена и недостаточной разработанностью методов диагностики и исследования конфликта.

В литературе отсутствуют методики понимания конфликта. Однако, получение информации о конфликте психологам необходимо и современная психология понимания располагает для этого достаточным арсеналом методов. В качестве основных в данной работе мы выделили:

1) логически-рациональный мыслительный процесс уяснения сути, смысла явлений, понятий и причинно-следственных связей событий;

2) вчувствование, сопереживание и со-понимание, эмпатия.

Результат использования этих методов, операций и есть понимание, которое в психологическом статусе выступает и как процесс и как результат переработки смысловой информации об объекте познания.

Эмпирическое исследование носило сравнительный характер и направлено было на выявление специфических составляющих в понимании конфликта людьми разных возрастов.

Выборка включала респондентов 6-ти возрастных групп: подросткового возраста (12-16 лет), юношеского возраста (17-21 г), среднего возраста (22-24 года), взрослого возраста (25-35 лет), зрелого возраста (36-60) и пожилого возраста (от 60-ти лет).

Объем выборки: 100 человек, из них подростки – 20 человек, юноши и девушки – 20 человек, представителей среднего возраста 16 человек, взрослого – 16 человек, зрелого – 20 человек и пожилого – 8 человек.

Для исследования на базе научной парадигмы психологии понимания (В.В. Знаков) была разработана методика понимания конфликта методом рефлексивного анализа.

Методически исследование осуществлялось как оформление испытуемыми структурированного самоотчета по предлагаемым заданиям.

Вспомогательные эмпирические методы исследования, позволяющие актуализировать рефлексивные механизмы познания и самосознания, эмпатию испытуемых:

- анкетирование,
- опрос,
- ассоциативный метод,
- визуализация образа конфликта,
- экспресс-диагностика стратегии поведения в конфликте,
- самооценка эмоциональных состояний в конфликте,
- проективный (рисуночный) метод.

Все задания для методик взяты из практикума по основам конструктивного общения [3], но выбраны и скомпонованы в соответствии с основным «принципом рефлексивности», который предполагает, что размышление о ситуации идет с позиции, где в центре «Я», осознающий свои мысли, чувства, эмоции, действия и конфликтную ситуацию в целом.

Итак, в результате методика рефлексивного анализа конфликта включала в себя 17 заданий. Исследование было организовано таким образом, что даже при групповой форме проведения предполагало индивидуальное осмысление вопросов и заданий.

Процедура рефлексивного анализа начиналась (как в индивидуальной, так и в групповой форме) с вступительного слова ведущего (исследователя). Это всегда (с небольшими вариациями) были следующие слова: «В жизни каждого человека случаются конфликты. И если невозможно прожить без них и это касается каждого из нас, то давайте поразмышляем вместе над тем, что такое конфликт?» Затем респондентам сразу предлагалось перейти к работе на бланках.

1. Посмотрите внимательно на первый пункт бланка. Там написано «Конфликт – это …..». Пожалуйста, дайте свое определение конфликта. Не торопитесь, подумайте, отразите свое мнение. Затем предоставлялось немного времени. По реакциям респондентов было видно, когда они уже закончили выполнять первое задание. Если кто-то из участников опроса выражал желание обсудить определения, то это ни в коем случае не пресекалось. При групповой форме работы чаще всего обсуждение данных определений конфликта приводило к тому, что большинство людей понимают под этим словом нечто схожее.

2. Переходим ко второму заданию «С чем ассоциируется слово «конфликт»? Обратите внимание, что вам предложены три ассоциации: мебель, посуда, одежда. Подумайте и напишите, если конфликт – это мебель, то какая? и т.д. Не торопитесь, сосредоточьтесь на своих ассоциациях. После необходимого промежутка времени, ассоциации обсуждались. Далее предложите свои ассоциации и их описания. Потом так же следовало обсуждение предложенных ассоциативных рядов.

3. Третье задание (зачитывается вслух): «Какие образы и мысли приходят в голову, когда Вы думаете о конфликте?» Здесь иногда при-

ходилось пояснять, в чем проявляется образ и как зафиксировать мысли. Но в целом задание не вызывало никаких затруднений. Далее следовало обсуждение при желании испытуемых высказаться.

4. Дальше обратим внимание на ваши чувства. Посмотрите на 4-ое задание: «Какие чувства Вы испытываете, думая о предстоящем конфликте?». Сконцентрируйтесь именно на своих чувствах. Иногда приходилось немного разъяснять задание: «Представьте, что вам предстоит нелегкий разговор с кем-нибудь и вы знаете, что это, наверняка, будет конфликтная встреча. Какие чувства вы испытываете?» И опять делался акцент на чувствах. После выполнения так же чаще всего происходило обсуждение написанного.

5. Переходим к 5-му заданию: «Что беспокоит Вас в связи с конфликтом?» Это задание почти ни разу не потребовало никаких дополнительных высказываний ведущего. После следовало обсуждение. Своими беспокойствами респонденты делились очень охотно.

6. Дальше познакомимся с реакциями человека в конфликте, которые бесконечно разнообразны. Осознание своих привычных способов реагирования необходимо длятого, чтобы иметь возможность выбора новых, более подходящих в той или иной ситуации. В задании 6 в списке реакций, часто встречающихся в конфликтах, найдите свойственные лично Вам и подчеркните их. Это задание позволило провести экспресс-диагностику стилей поведения респондентов в конфликте и дополнительно обсудить возможные поведенческие реакции человека в конфликтных ситуациях.

7. Переходим к следующему заданию. Обратите внимание на схему динамики конфликта (см. Приложение 1 задание 7). Любому конфликту предшествует ситуация, когда еще «все хорошо» (Пункт А), затем что-то происходит и напряжение начинает увеличиваться, затем наступает пик конфликта, затем спад и потом «опять все хорошо» (Пункт В). На каждом из этих 5-ти этапов возможны различные эмоциональные переживания и состояния. Нарисуйте ваши состояния в разные моменты конфликта. Чаще всего респонденты говорили, что они не умеют рисовать, но при мягкой настойчивости ведущего все в результате как-то отображали свои состояния. Затем обсуждались рисунки.

8. Из 8-го задания выберите характерные для вас чувства и состояния, проходящие через конфликт от его возникновения, до момента

разрешения. Выбранные слова допишите в схему задания №7. Обычно это задание не вызывало затруднений. Только испытуемые удивлялись, что предложены слова, описывающие только отрицательные эмоциональные переживания. Далее следовало обсуждение.

9. Продолжаем дальше, подумайте, пожалуйста, и напишите в 9-ом задании что помогает Вам оставаться спокойным в конфликте? Здесь по возможности надо было вызвать респондентов на формулирование конкретных способов саморегуляции в конфликте. Написанное обсуждалось. Это задание традиционно вызывало большой интерес.

10. Переходим к 10-му заданию. Представьте себе человека в конфликтной ситуации, как будто он ваш оппонент. Какие первые признаки его возбуждения в конфликте вы бы заметили? По каким внешним признакам вы бы поняли, что ваш оппонент уже вне себя? Обсуждение результатов задания всегда проходило очень оживленно.

11. Обратим внимание на собственные ощущения в конфликте. В задании 11 напишите, какие симптомы (внутренние предупреждающие сигналы) свойственны лично Вам в конфликтах? Сосредоточьтесь на ощущениях вашего тела. Какие сигналы оно вам посылает при конфликтных взаимодействиях? По каким внутренним признакам, телесным реакциям вы можете понять, что сами уже достаточно возбуждены и находитесь на грани взрыва? После выполнения задания обсуждались результаты.

12. В следующем задании обсудим положительные стороны конфликта. В 12-м пункте напишите, пожалуйста, что может быть для вас привлекательным в конфликте? Задание вызывало заинтересованность. Видно было, что многие из опрашиваемых над этой стороной конфликтных взаимодействий не задумывались.

13. В 13-м задании назовите виды конфликтов ил разногласий, которые вы предпочитаете. Это задание должно выполняться без дополнительных разъяснений, чтобы максимально стимулировать мыслительную деятельность респондентов.

14. Стремление к конфликту в определенных ситуациях может быть заложено в детстве. Мы видели, как ссорились наши родители. На экране телевизора герои любимых сериалов также демонстрировали нам те или иные реакции. Ролевые модели, заложенные в детстве, за-

висят от ситуации и времени, в котором мы выросли. Выбор определенных конфликтных реакций, сделанный нами в детстве, может быть непригоден для применения в дальнейшей жизни, но он продолжает влиять на наше поведение. Часто мы сами недовольны своими действиями, словами, пораженные их разрушительными последствиями. Если же мы мысленно вернемся в прошлое и выявим источник своих реакций, то сможем изменить свое поведение, приспособив его к нуждам сегодняшнего дня.

Попробуйте понять и вспомнить, кто был вашей ролевой моделью, и как этот человек реагировал на конфликты. Переберите в памяти людей, которых вы наблюдали в детстве, вспомните их реакции в конфликтных ситуациях, — это могут быть родители, соседи, братья, сестры, а также характерные роли, виденные по телевизору, в кино и карикатурах, и заполните таблицу. Задание вызывало затруднения у многих респондентов. Большинство опрошенных никогда не задумывались об этом. Обсуждения были единичные. Почти никто не захотел делиться дополнительно информацией этого задания.

15. Далее подумаем о том, как на ваше поведение и отношение к конфликту влияет то, что вы пережили ранее (имеется в виду Ваш жизненный опыт)? Здесь не требуется никаких дополнительных рассуждений. В большинстве случаев эти задания не обсуждались.

16. В 16-м пункте подумайте и напишите, какие мысли пришли вам в голову и какие выводы возникли на основании сделанных наблюдений в процессе выполнения заданий? Чаще всего активность респондентов к концу методики уже падала и это задание выполнялось как-то вяло, без энтузиазма. Но, возможно, и потому, что рефлексия требует сосредоточенности, тренировки опыта, которых не было у респондентов. Результаты не обсуждались.

В завершении методики опишите, пожалуйста, как должна действовать в конфликте положительная, по вашему мнению, ролевая поведенческая модель? Задание выполнялось с интересом. Результаты обсуждались.

Процедура исследования занимала от 20-ти минут до 1,5 часов.

Результаты. Первичные качественные данные подвергались частотному анализу и были выделены повторяющиеся (хотя бы 2 раза) и

наиболее часто встречающиеся слова для каждой возрастной группы испытуемых. Также выделялись уникальные для каждой группы слова (если таковые имелись).

Доля повторений оценивалась в процентном отношении к общему количеству испытуемых в каждой конкретной группе.

Для объединения схожих по смыслу слов в группы применялся контент-анализ полученных текстов и материалов, основанный на выделение объединяющих категорий анализа.

Обсуждение результатов:

1. Универсальным признаком конфликта для всех возрастов является недопонимание сторонами друг друга.

2. Люди всех возрастов ассоциируют конфликт с плохой погодой и сопровождающими ее явлениями природы (дождь, тучи, гроза, молния).

3. Драка является общим образом конфликта для людей всех возрастов, кроме пожилых.

4. Универсальными эмоциями в предшествии конфликта является тревога – для всех возрастов, кроме подросткового (то есть, начиная с 17-ти лет), Для подростков предшественник конфликта - страх.

5. Общее для людей всех возрастов (кроме пожилого) переживание по поводу конфликта заключается в беспокойстве о дальнейших отношениях с оппонентами.

6. Самоконтроль в конфликте зависит от уверенности в себе (для всех возрастов, кроме зрелого), знания своей правоты (для всех, кроме среднего возраста), самовнушения (для всех, кроме юношеского и среднего возраста), лекарственных препаратов (для всех, начиная с 25 лет).

7. Универсальными признаками возбуждения человека в конфликте люди всех возрастов считают изменение тона голоса и крики. Универсальный внутренний симптом возбуждения для всех респондентов - учащенное сердцебиение.

8. Привлекательность конфликта определяется следующими универсальными признаками:

- возможностью сбросить эмоциональное напряжение и доказать свою правоту (для всех, кроме подростков и зрелых людей);

- возможностью узнать человека (для диапазона от 17 до 35 лет).

9. Ничего не видят позитивного в конфликте люди юношеского и пожилого возраста.

10. Ролевая модель.

Друзья и подруги являются универсальными и постоянными источниками формирования ролевых моделей конфликтного поведения для людей всех возрастов.

Члены семьи (мама, папа, брат/сестра) оказывают влияние на формирование моделей конфликтного поведения вплоть до пожилого возраста.

Члены собственной семьи (муж, жена, дети, внуки, племянники) становятся моделями ролевого поведения для людей зрелого и пожилого возраста (начиная с 36 лет).

Прошлый жизненный опыт влияет на поведение в конфликте людей всех возрастов, но на подростков меньше других.

Универсальными составляющими идеальной ролевой поведенческой модели в конфликте для людей всех возрастов является способность человека избежать конфликта, не доводить до него.

Выводы.

Таким образом, подводя итог можно сказать, что разница в возрасте означает разное понимание такого социально-психологического феномена как конфликт.

В исследовании выделены как универсальные, так и специфические компоненты понимания конфликта людьми разных возрастов.

Данные результаты можно учитывать в семейной, организационной, школьной модерации между сторонами, представленными как оппонентами одной возрастной группы, так и разных возрастов.

Литература

1. Анцупов А.Я., Шипилов А.И. Конфликтология. Учебное пособие. - М., 2001.
2. Богин Г. И. Обретение способности понимать: Введение в филологическую герменевтику. – Москва: Психология и Бизнес ОнЛайн, 2001. – 516 с.
3. Григорьева Т.Г. Основы конструктивного общения. Практикум. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. Ун-та; М.: Совершенство, 1997. – 116 с.

4. Гришина Н. В. Психология конфликта: хрестоматия/ Гришина Е. В. 2-е изд. – СПб: ПИТЕР, 2008
5. Знаков В.В. Психология понимания: Проблемы и перспективы. – м.: Изд-во «Институт психологии РСН», 2005. – 448 с.
6. Знаков В.В. Психология понимания мира человека. – М.: Изд-во «Институт психологии РАН», 2016, - 488 с.
7. Карпов А. В.Психология рефлексивных механизмов деятельности. – М.: Изд-во «Институт психологии РАН», 2004. – 424 с.
8. Петров А.В. «Дискуссия и принятие решений в группе: технология модерации». – СПб.: Изд-во «Речь», 2005.
9. Шаповаленко И. В. Возрастная психология: (психология развития и возрастная психология) – М.: Гардарики, 2005 . – 349 с.

IV.
ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ
IV.
GENERAL BIOLOGY

ДЕЙСТВИЕ КРАТКОВРЕМЕННОГО ХОЛОДА НА СОСТОЯНИЕ ФАГОЦИТОЗА

Еникеев Д.А., Хисамов Э.Н., Еникеев О.А., Еникеева С.А., Идрисова Л.Т., Срубилин Д.В.
ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет Минздрава РФ», г.Уфа, Россия.
E-mail:Hisamov7958@yandex.ru

Резюме

Актуальность действия фактора холода на организм сохраняется, как с точки зрения патологии, так и закаливания организма. В настоящем исследовании целью ставилось установить характер влияния кратковременного холода на уровне +4ºС. разной экспозиции на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови белых крыс. В ходе проведённого исследования было выявлено стимулирующее влияние 15-минутного холодового воздействия на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови, сохраняющееся в течение 24 часов. В то же время было установлено угнетающее влияние 2-часового холодового воздействия на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови, сохраняющееся в течение 72 часов.

Ключевые слова. Фагоцитоз, кратковременный холод - 15 мин. 2 часа.

ACTION OF SHORT-TERM COLD ON THE STATE OF PHAGOCYTOSIS

Enikeev D.A., Khisamov E.N., Enikeev O.A., Enikeeva S.A., Idrisova L.T., Srubilin D.V.
FGBOU IN Bashkir State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation “, Ufa, Russia.
E-mail: Hisamov7958@yandex.ru

Abstract

The influence of the cold factor remains relevant from the point of view of the pathology and the impaction of the organism. In this study, the goal was to establish the nature of the effect of a short-term cold factor of different exposures on the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils in white rats. In the course of the study, a stimulating effect of a 15-minute cold effect on the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils in white rats was observed, which lasts for 24 hours. At the same time, the oppressive effect of a 2-hour cold exposure on the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils in white rats was observed, which lasted for 72 hours.

Key words. Phagocytosis, short-term cold -15min. 2 hours.

Введение. Пока трудно установить, что преобладает, положительный или отрицательный эффект при воздействии на организм кратковременного холода. Также не совсем ясно, какой диапазон включает понятие «кратковременный холод». Однако вполне очевидно, что речь об эффективности может идти только при конкретных параметрах с позиции высоты низкой температуры, а также времени воздействия. Для использования фактора кратковременного холода в практических целях требуются точно проверенные научные факты исследования. Различные морфо-физиологические системы реагируют на кратковременный холод по-разному. В литературе приводятся результаты исследований, когда наблюдалось положительное действие кратковременного фактора холода на организм, в частности, на систему крови [2,3,4]. В целом, реакция организма на холод проявляется на разных аспектах. Это и влияние на кислородообеспечивающие системы через механизмы тканевой гипоксии, а также опосредованно по нейро-гуморальной системе. Однако, наиболее значительная роль отводится к адаптационно-приспособительным процессам, а также интенсивности и продолжительности воздействия фактора холода [1]. Естественно, широко известно снижение иммунитета при охлаждении тела, а также способы закаливания организма дозированным воздействием холода. В этой связи представляет интерес состояние фагоцитоза в условиях действия кратковременного холода в разной экспозиции.

В данной работе нами были представлены результаты влияния кратковременного холода на иммунную систему, в частности, на функциональное состояние фагоцитов, в том числе нейтрофилов циркулирующей крови в разных экспозициях воздействия.

Цель исследования. Установить характер влияния кратковременного холодового фактора (+4ºС.) разной экспозиции – 15мин. и 2 часа на фагоцитарное функцию нейтрофилов циркулирующей крови белых крыс.

Материалы и методы исследования. Эксперимент выполнен на 20 здоровых половозрелых белых крысах мужского пола массой от 250 до 300 г. Животных содержали на стандартном рационе вивария. При выполнении экспериментов соблюдались Международные рекомендации по использованию животных в биологических и медицинских исследованиях согласно Хельсинской декларации. Холодовой стресс индуцировали помещением животных в холодильную камеру при температуре +4ºС. В соответствии с целью исследования были сформированы две экспериментальные группы. Длительность пребывания в холодильной камере первой экспериментальной группе составляла 15 мин., второй - 2 часа. Третья группа служила контролем. Поглотительную активность нейтрофилов периферической крови белых крыс определяли по методу А.Н. Маянского и др. (1993). Инкубация смеси латекса и крови проводилась в термостате в течение 30 мин. Учёт реакции проводили с помощью иммерсионного микроскопа. Статистическую обработку результатов проводили с применением современных программных пакетов математико-статистического анализа Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.0.

Результаты исследования и их обсуждение. В первой экспериментальной группе через 30 минут инкубации смеси латекса с кровью в термостате на первые сутки после холодового воздействия в продолжении 15 мин. фагоцитарный показатель (активность фагоцитоза) составила 92,74±2,11%; на третьи сутки – 80,01±2,25%; на пятые сутки – 78,59±2,19%. В контрольной группе этот же показатель соответствовал на первые сутки – 79,42±2,26%; на третьи сутки – 79,17±2,24%; на пятые сутки - 79,58±2,33%. Фагоцитарное число (фагоцитарный индекс) в первой экспериментальной группе через 30 минут инкубации смеси

латекса с кровью первые сутки после холодового воздействия в течение 15 мин. равнялось 7,45±0,02; на третьи сутки – 5,04±0,016; на пятые сутки – 4,02±0,011. В контрольной группе этот же показатель составлял на первые сутки –4,08±0,015; на третьи сутки – 4,06±0,012; на пятые сутки - 4,11±0,014.

Следовательно, воздействие 15-минутной холодовой травмы приводило к статистически значимому ($p<0,05$) повышению фагоцитарных данных нейтрофилов периферической крови животных. Эти изменения сохранялись в течение первых 24 часов после воздействия холода. В более поздние сроки статистически значимые различия между основной и контрольной группами по основным показателям фагоцитоза отсутствовали.

Таким образом, в ходе проведённого исследования было выявлено стимулирующее влияние 15-минутного холодового воздействия на фагоцитарную способность нейтрофилов периферической крови белых крыс, которое сохранилось в течение 24 часов.

Во второй экспериментальной группе после 2 часового холодового воздействия через 30 минут инкубации смеси латекса с кровью в термостате на первые сутки фагоцитарный показатель (фагоцитарная активность) составила 60,61±1,15%; на третьи сутки – 61,48±1,21%; на пятые сутки – 78,59±1,19%. Этот же показатель в контрольной группе на первые сутки равнялся 79,42±1,26%; на третьи сутки – 79,17±1,24%; на пятые сутки - 79,58±1,33%.

Фагоцитарное число (фагоцитарный индекс) во второй экспериментальной группе через 30 минут инкубации смеси латекса с кровью в термостате на первые сутки после 2 часового холодового воздействия составило 3,04±0,013; на третьи сутки – 3,08±0,014; на пятые сутки – 4,02±0,011; Этот же показатель в контрольной группе соответствовал на первые сутки –4,08±0,015; на третьи сутки – 4,06±0,011; на пятые сутки - 4,11±0,014.

Следовательно, воздействие 2-часовой холодовой травмы приводило к статистически значимому ($p<0,05$) угнетению фагоцитарного показателя (фагоцитарной активности) и фагоцитарного числа (фагоцитарного индекса) нейтрофилов периферической крови белых крыс. Данные изменения сохранялись в течение первых 72 часов после воз-

действия холода. В более поздние сроки статистически значимые различия между экспериментальной и контрольной группами по основным показателям фагоцитоза отсутствовали.

Выводы:

1. Результаты проведенных исследований установили неоднозначные эффекты на фагоцитарную способность нейтрофилов циркулирующей крови крыс кратковременного воздействия холодового фактора на уровне +4 градуса С.

2. В ходе проведённого исследования было выявлено стимулирующее влияние 15-минутного холодового воздействия на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови белых крыс, сохраняющееся в течение 24 часов, о чём свидетельствовали статистически значимое повышение фагоцитарного показателя (фагоцитарной активности) и фагоцитарного числа (фагоцитарного индекса).

3. В тоже время было установлено негативное влияние 2-часового холодового фактора на фагоцитарную функцию нейтрофилов периферической крови белых крыс, сохраняющееся в течение 72 часов, которое отражалось в снижении фагоцитарного показателя (фагоцитарной активности) и фагоцитарного числа (фагоцитарного индекса).

Литература

1. Катаева Л.Н., Пиксендеева О.В. Охлаждение и периферическая кровь белых крыс разных возрастов // Деп. в ВИНИТИ 24.05.96. № 1688-В96. 14 с.
2. Пиксендеева О.В. Эффект воздействия кратковременной адаптации к холоду на эритропоэз белых крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза // Вестник Иванов, мед. акад. 1997. Т. 2. № 1-2. С. 45-49.
3. Пиксендсева О.В., Катаева Л.Н. Влияние холода на формирование адаптационных реакций системы эритрона белых крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза // Мат. конф. “Молекулярно-клеточные основы кислотно-основного и температурного гомеостаза: физиология, биохимия, клиника”. Сыктывкар, 1997. С. 9599.
4. Катаева Л.Н., Пиксендеева О.В. Состояние системы эритрона белых крыс, подвергавшихся серии кратковременных холодовых экспозиций // Тез. докл. Ш съезда физиологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 1997.

ПРИМЕНЕНИЕ СУКЦИНАТА 1,3,6-ТРИМЕТИЛ-5-ГИДРОКСИУРАЦИЛ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ У СТАРЫХ КРЫС

В.А. Мышкин, Д.А. Еникеев, И.Д. Габдрахманова, Д.В. Срубилин, А.Р. Гимадиева, Э.Ф. Ренина

Научно-исследовательский институт медицины и труда и экологии человека ФГБУН Уфимского Института Химии РАН ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет Минздрава РФ», г.Уфа, Россия.

E-mail: enikeyev@mail.ru

Резюме

В эксперименте изучено влияние нового комплексного соединения 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила с янтарной кислотой на антиоксидантную систему и морфо-функциональное состояние печени старых крыс при воздействии тетрахлорметана.

Целью работы явилось изучение влияния соединения 1 (1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила и сукцината) на процессы свободнорадикального окисления, АОС систему регулирующую эти процессы и морфофункциональное состояние печени старых крыс при повреждении органа тетрахлорметаном.

Результаты: комплексное соединение 1 в условиях профилактического применения у старых крыс (внутрибрюшинно по 50 мг/кг трехкратно/день*4, затем внутрибрюшинно 50 мг/кг однократно/день*3) ограничивало некрозогенное действие ТХМ (подкожно 2 г/кг/день*4), частично сохраняло функционально-метаболическую активность за счет благоприятного влияния на ферменты (АлАТ, ЩФ), содержание общего билирубина холестерина в крови, а также за счет частичной нормализации нарушенного равновесия ПОЛ/АОС.

По большинству показателей соединение 1 эффективно и сопоставлено с действием гепатопротектора силимарина.

Заключение. Профилактическое применение соединения 1 позволило снизить интенсивность и распространённость дистрофических и некротических процессов, клеточные реакции со стороны тканей печени у старых крыс и существенно ограничить выраженность гепатотоксического действия ТХМ посредством корригирующего влияния на глутатионовую и ферментативную систему антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: комплексное соединение «1,3,6-триметил-5- гидроксиурацил + сукцинат», «3,6-диметил-5-гидроксиурацил + сукцинат», тетрахлорметан, гепатотоксическое действие, гепатопротекторный эффект, антитоксические свойства.

THE USE OF SUCCINATE 1,3,6-TRIMETHYL-5-GIDROKSIMETIL FOR CORRECTION OF TOXIC LIVER INJURY IN OLD RATS

V. A. Myshkin, D. A. Enikeev, I. D. Gabdrakhmanova, D. V. Trubilin, A. R. Gimadieva, E. F. Renin
Scientific-research Institute of medicine , labor and human ecology
The DIRECTOR of the Ufa Institute of Chemistry SB RAS
Of the "Bashkir state medical University of the Ministry of health", Ufa, Russia.
E-mail: enikeyev@mail.ru

Abstract

In the experiment was studied the impact of the new complex compounds 1,3,6-trimethyl-5-gidroksimetil with succinic acid on the antioxidant system and morpho-functional state of the liver of old rats when exposed to carbon tetrachloride.

The aim of this work was to study the influence of compound 1 (1,3,6 - trimethyl-5-gidroksimetil and succinate) on the processes of free radical oxidation, the AOC system regulates these processes and morpho-functional state of the liver of old rats when organ damage with carbon tetrachloride.

Results: compound 1 in terms of the prevention of the use in old rats (intraperitoneal 50 mg/kg three times/day*4, then intraperitoneal 50 mg/kg once/day*3) limited Nekrosiene action CTC (subcutaneously 2 g/kg/day*4), partially preserved functional-metabolic activity due to the favorable effects on enzymes (Alat, alkaline phosphatase), total bilirubin cholesterol in the blood and also due to partial normalization of the disturbed balance GENDER/AOC.

By most measures the compound 1 effectively and compared with the effect of the hepatoprotector silymarin.

Conclusion. Prophylactic use of compound 1 allowed to reduce the intensity and prevalence of dystrophic and necrotic processes , cellular reactions of the tissues of the liver in old rats and significantly limit the severity of hepatotoxicity CTC through a corrective effect on glutathione and enzymatic antioxidant defense system.

Key words: complex connection “1,3,6-trimethyl-5 - gidroksimetil + succinate”, “3,6-dimethyl-5-gidroksimetil + succinate”, carbon tetrachloride, hepatotoxic effect, hepatoprotective effect, anti-toxic

Введение. Известно, что частота и выраженность реакций печени на гепатотоксические средства увеличивается с возрастом [1,2] . В частности у старых животных обнаружены существенные изменения активности свободнорадикальных процессов в результате интоксикации тетрахлорметаном [2,3]. Установлено, что сукцинат оксиметилурацила является эффективным средством коррекции метаболизма и нарушений в системе ПОЛ/АОС у старых крыс [3]. Ранее проведённые исследования выявили антиоксидантную и гепатозащитную активность некоторых представителей среди производных урацила и янтарной кислоты в варианте монотерапии при интоксикации хлорированными углеводородами, в том числе и у старых крыс [5,6]. Эффективность препаратов была подтверждена также на моделях токсического поражения печени ПХБ – содержащими препаратами - соволом и совтолом, этанолом, парацетамол и комплексом противотуберкулезных препаратов [6]. Молекулярный комплекс с сукцинатом (соединение 1) имеет более высокую растворимость в воде и меньшую токсичность, по сравнению с составляющими субстанциями и позволяет считать данное

направление исследований перспективным для целей профилактики и лечения токсических гепатитов у лиц пожилого возраста.

Целью работы явилось изучение влияния соединения 1 на процессы свободно-радикального окисления, антиоксидантную систему и морфофункциональное состояние печени старых крыс при повреждении органа тетрахлорметаном.

Методы исследования. Опыты выполнены на 50 белых беспородных крысах – самцах, массой более 400г., животных содержали на обычном рационе питания. Токсическое поражение печени вызвали путем подкожного введения 50% масляного раствора тетрахлорметана (ТХМ) в дозе 2г/кг на протяжении 4 дней [8]. Исследуемый препарат – соединение 1 и референтный препарат – силимарин вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг 3 раза в сутки на протяжении первых 4 дней, а в последующем 1 раз в сутки на протяжении всего опыта (до 7 суток, когда осуществляли тестирование). Исследованию подвергали сыворотку крови и печень.

Животных разделяли на группы:

1-я – интактные;

2-я – контроль (ТХМ);

3-я – силимарин +ТХМ;

4-я – соединение 1 + ТХМ.

Состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) исследовали методом прямой спектрометрии – путём определения содержания в гомогенатах печени количества диеновых конъюгатов (ДК) и триеновых конъюгатов (ТК) [9,10]. Одновременно с процессами ПОЛ регистрировали активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы [11,12]. Проведена оценка показателей, характеризующих функциональное состояние печени: активность уроканиназы (УРН) [13], аспарагиновой аминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфотазы (ЩФ), определявшихся по кинетическому методу Henry на биохимическом анализаторе согласно прилагаемым инструкциям, а также исследовали содержание восстановленного глутатиона в печени, концентрацию SH-групп, билирубина и триглицеридов [14,15].

Забор материала для морфологических исследований проводили на 7-8 сутки после последнего введения ТХМ. Печень крыс извлекали и

фиксировали и 10%-ном растворе нейтрального формалина, проводили через спирты и заливали в парафин по стандартной методике приготовления гистологических препаратов [16]. Производили серийные срезы печени, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Изготовленные препараты изучали в светооптическом микроскопе Leica DMD 108 (Германия). Окуляр х10, х20, х40 при 200 и 400 кратном увеличении. Результаты биохимических исследований обрабатывали статистически. Оценка статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях производилась по двустороннему t-критерию Стьюдента для независимых групп. Различия считались статистически значимыми при $p<0,05$. Комплексное соединение 1 синтезировано к.х.н. А.Р. Гимадиевой в Уфимском институте химии РАН.

Результаты и их обсуждение. Как показывали результаты исследований соединение 1 при повторном введении в организм старых крыс оказывает профилактический эффект. Так клиническая, биохимическая и морфологическая картина интоксикации у животных, защищенных препаратом, отличалась более благоприятным течением по сравнению с таковой у крыс контрольной группы. Максимальный эффект наблюдался у животных, которым вводили референтный гепатопротектор силимарин и соединение 1. Эти животные были более активными, охотнее потребляли пищу и воду, более адекватно реагировали на внешние раздражители по сравнению с контрольными крысами. Профилактическая эффективность соединения 1 подтверждается также результатами определения содержания продуктов свободнорадикального окисления липидов и состояния некоторых компонентов антиоксидантной системы, нейтрализующих свободные радикалы и утилизирующих продукты ПОЛ у старых крыс.

Результаты эксперимента представлены в таблице 1. Как видно из представленных данных, острая интоксикация ТХМ сопровождается значительной активацией процессов свободнорадикального окисления, с максимальным уровнем накопления в печени продуктов ПОЛ - ДК и ТК на 7 сутки от момента введения ТХМ (уровень ДК в 1,42 раза, а ТК – в 1,54 раза по сравнению с аналогичным уровнем у интактных животных).

Известно, что столь значительная активация ПОЛ обусловлена образованием агрессивных метаболитов ТХМ в монооксигеназной системе эндоплазматического ретикулума гепатоцитов. Профилактическое введение крысам силимарина, обладающего антирадикальной активностью, существенно ограничивает накопление продуктов ПОЛ, что подтверждается достоверным снижением количества ДК и ТК в печени крыс III группы.

Антиоксидантное действие соединения 1 отчасти также можно объяснить их антирадикальной активностью, поскольку в модельных системах 1,3,6-триметил и диметилпроизводные-5-гидроксиурацила как и профессиональной антиоксидант дибунол имеют примерно одинаковую активность ($K_7 \approx 10^{-4}$ моль/л*сек) [5].

Кроме того, силимарин также как соединение 1 способствуют сохранению восстановленного глутатиона в печени старых крыс. Как видно из данной таблицы поражение старых крыс ТХМ, сопровождается и нарушениями со стороны АОС.

Так на 7 сутки опыта активность супероксиддисмутазы находилась в обратной зависимости от интенсивности ПОЛ. Аналогичная закономерность в печени выявлена и для каталазы.

Подавление активности неферментативного звена глутатионовой системы, а также ферментов АОС, СОД и каталазы, по-видимому, связано с повышением активности процессов ПОЛ, а также с прямым мембрано-токсическим действием ТХМ приводящим в свою очередь к нарушению синтетических процессов. Применение метилпроизводных-5-гидроксиурацила, в особенности соединения 1, привело к достоверному улучшению показателей АОС (таблица 1). На фоне введения крысам силимарина и соединения 1 у подопытных животных сохранялась активность каталазы в печени, содержащее восстановленного глутатиона и сульфгидрильных групп в крови. Препарат в отличие от силимарина не оказал достоверного влияния на активность СОД в печени. Токсическое повреждение печени ТХМ увеличивает концентрации общего билирубина и холестерина в крови, изменяет активность печеночно-специфического фермента – уроканиназы, а также активность ЩФ.

В ходе экспериментов было установлено, что в сыворотке крови у старых крыс II группы, отравленных ТХМ активность УрН в 3,8 раза выше чем у интактных животных (P<0,05). В группах III и IV у отравленных ТХМ старых крыс, которым наряду с токсикантом вводили соответственно силимарин и соединение 1 активность УрН была выше, чем у интактных, но достоверно ниже по сравнению с контролем в 1,6 (P<0,05) и в 1,5 (P<0,05) раза.

Таким образом, соединение 1, наряду с силимарином ослабляет цитолитическое действие ТХМ.

Таблица 1.

Влияние силимарина и соединений 1,2 на функционально-метаболическое состояние печени старых крыс при воздействии тетрахлорметана

Показатели	Группы животных (n=12)			
	I	II	III	IV
УрН, мкмоль/ч*л	4,8±0,44	18,5±4,2 *	11,3±4,4 **	12,2±5,3 **
АсАТ, ммоль/ч*л	19,5±0,33	13,8±0,65 *	25,3±0,45 **	23,0±0,45 **
ЩФ, ммоль/ч*л	21,6±0,56	28,5±1,0 *	22,9±3,1 **	21,3±6,8 **
Общий билирубин, мкмоль/л	32,6±2,48	42,3±2,3 *	38,5±2,7 *	40,8±5,3 *
Холестерин, ммоль/л	5,6±0,18	9,6±0,42 *	6,0±0,17 **	5,8±0,43 **
ДК, усл.ед.опт. плотности	0,454±0,02	0,646±0,02 *	0,458±0,05 **	0,515±0,3 **

Показатели	Группы животных (n=12)			
	I	II	III	IV
ТК, усл.ед.опт. плотности	0,570±0,04	0,880±0,03 *	0,650±0,04 **	0,690±0,07 **
СОД, усл.ед. на г. белка	3,30±0,08	2,05±0,06 *	2,9±0,02 **	2,5±1,0
КАТ, моль в мин на г. белка	307±18	173±12 *	288±17 **	283±15 **
Восстановленный глутатион, мг%	65,6±4,3	48,3±4,4 *	61,5±8,5 **	59,3±6,5 **
SH, мкг/мг белка	13,8±0,12	3,5±0,18 *	10,9±3,3 **	8,8±4,9 **

Примечание: **-P<0,05 к группе I (интактные крысы); **- P<0,05 к группе II (ТХМ).*

У крыс контрольной группы выявлено снижение активности аспарагиновой аминотрасферазы в сравнении с интактными крысами, что связано, вероятно, с более выраженным деструктивным действием ТХМ у старых животных [3]. В опытных группах крыс, получавших по профилактической схеме силимарин и соединение 1 различия с нормативными показателями ЩФ и холестерина были менее выраженными (таблица 1).

При исследовании гистологических препаратов печени крыс, которым вводили тетрахлорметан выявлены нарушения морфологической

структуры органа – обширные области разрушенных и морфологически измененных гепатоцитов. Выявлены признаки зернистой и гидропической вакуольной и балочной дистрофии. Дистрофические изменения усиливались до парциального некроза и полного распада клеточных органелл с потерей радиальной балочной структуры паренхимы органа. Некротические зоны сопровождались инфильтрацией клеток и массивными кровоизлияниями. На препаратах печени крыс, которым вводили соединение 1, степень морфологических нарушений была менее выражена, по сравнению с контролем: структурная организация гепатоцитов сохранялась, активность деструктивных процессов была низкая. Можно предположить существенное торможение некротических процессов и воспалительных реакций.

Выводы:

1. Соединение 1 – эффективное патогенетически обоснованное средство предупредительной коррекции морфо-функциональных нарушений при отравлении ТХМ старых крыс.
2. Положительное влияние соединения 1 на развитие острого токсического поражения печени у старых крыс проявляется улучшением клинической картины болезни, с частичным сохранением структуры печени, снижением уровня продуктов некротического окисления липидов и сохранением компонентов антиоксидантной системы органа.
3. Целесообразно дальнейшее доклиническое изучение соединения 1 с целью обоснования его применения на ранних стадиях токсического поражения печени у стареющих животных.

Литература

1. Юджин Р. Шифф, Майкл Ф. Соррел, Уиллис С. Мэддрей, Болезни печени по Шиффу. Алкогольные, лекарственные, гепатические и метаболические заболевания. Перевод с английского и под редакцией акад. РАМН Н.А. Мухина. Издат. группа «Геотар-Медиа», 2011-480с. – (серия «Болезни печени по Шиффу»).
2. Хавинсон В.Х. Свободнорадикальное окисление и старение/ В.Х. Хавинсон, В.А. Баринов, А.Б. Арутонян, В.В. Маменин – СПб: «Наука», 2003.-236с.

3. Чернов В.Н. Влияние оксиметилурацила на перекисное окисление липидов и функционально-метаболические показатели печени при интоксикации старых крыс тетрахлорметаном/В.Н. Чернов, В.А. Мышкмн, Р.Б. Ибатуллина, Д.А. Еникеев//Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2007, №4, с.29-30.
4. Елькин А.И., Елизаров Д.П., Иванов В.Б., Терехин Г.А. Оценка антитоксических свойств соединений, обладающих выраженной антигипоксической и антиоксидантной активностью при интоксикации хлорированными углеводородами. Токсикологический вестник. 2003; 3: 19-24
5. Мышкин В.А., Еникеев Д.А. Преодоление гепатотоксичности антиоксидантами: реальность и перспективы. Уфа, 2014. 182 с.
6. Черешнев В.А., Мышкин В.А., Еникеев Д.А. Гепатопротекция при химических воздействиях. Москва-Уфа, 2012. 201 с.
7. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л: медицина -1963-132с.
8. Гонский Я.И., Корда М.М., Клищ И.Н. Влияние ацетилцистеина на антиоксидантную систему при экспериментальном токсическом поражении печени. Фармакология и токсикология. 1991; 54(5): 44-8.
9. Волчегорский И.А., Долгушин И.А., Колесников О.Л., Целикман В.А.*Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма.* Челябинск, 2000. 165 с.
10. Гаврилов В.Б., Гаврилов А.Р., Хмара Л.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. *Лабораторное дело.* 1985;2:60-4.
11. Чевари С., Чаба И.. Секей И. Роль супероксидцисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических мембранах. *Лабораторное дело.* 1985; 11: 678-80.
12. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова Н.Н., Токарев В.В. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело.*1988;1:16-9.
13. Буробин В.А., Лихачева Н.В., Абгафорова Г.Е. Определение активности уроканиназы в сыворотке крови и ткани печени. Микрометод. Лабораторное дело. 1978; 11: 650-3.
14. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск, 1976. 312 с.
15. Рубина Х.М., Романчук Д.А. Количественное определение SH-групп в цельной и депротеинизированной крови спектрофотометрическим методом. Вопросы медицинской химии. 1961; 7(6): 652-5.
16. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. М.: Медицина, 1969.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЕНТАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ С НЕМЕДЛЕННОЙ НАГРУЗКОЙ ПРИ ОРТОДОНТИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ

Слабковская А.Б., Панаиотов И.П.
ГБОУ ВПО Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Министерства здравоохранения России, Москва, Россия
slabkovskaya.ann@mail.ru
panaiotov@orthodontist.net

Резюме

В этом исследовании, предлагаем рассмотреть практическое исследование по применению дентальных имплантатов с немедленной нагрузкой на этапе ортодонтического лечения частичного отсутствия зубов и его осложнений, и выделим некоторые случаи их использования при мультидисциплинарном лечении стоматологических пациентов. Хорошо известно, что дентальные имплантаты, могут предложить отличный вариант компенсации отсутствующих зубов, после ортодонтического лечения.

Однако, этот доклад, сосредоточен на использовании имплантатов с немедленной нагрузкой в ортодонтии, в целях повышения качества и сокращения сроков мультидисциплинарного лечения, с особым акцентом на следующее:

1. Винтовые дентальные имплантаты являются отличной альтернативой традиционным методам опоры при проведении ортодонтического лечения. Некоторые типы имплантатов применяются для обеспечения опоры в ортодонтии.

2. Дентальные имплантаты с высокой первичной стабильностью, поддерживают такой же уровень стабильности с течением времени, и немедленная нагрузка представляется возможной сразу после установки имплантата. Дентальный имплантат, источник стабильной ортодонтической опоры.

3. Использование немедленной нагрузки дентальных имплантатов при ортодонтическом лечение частичного отсутствия зубов и его ос-

ложнений является почти на 100% успешным, если выбранный тип имплантата и клиническая ситуация, оценены должным образом.

Ключевые слова: частичная адентия, дентальная имплантация с немедленной нагрузкой, ортооссеоинтеграция, ортодонтически направленная регенерация, абсолютная ортодонтическая опора, мультидисциплинарное лечение.

THE USING OF DENTAL IMPLANTS WITH IMMEDIATE LOADING IN ORTHODONTIC TREATMENT

Slabkovskaya A.B, Panaiotov I.P.
Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia
anna.slabkovskaya@mail.ru
panaiotov@orthodontist.net

Abstract

In this report, we propose to consider a practical study of the using of dental implants with immediate loading at the stage of orthodontic treatment of partially edentulous and its complications, and we will highlight some cases of their uses in the multidisciplinary treatment of dental patients. It is well known that dental implants can offer an excellent choice for compensating for missing teeth, after orthodontic treatment.

However, this report focuses on the use of dental implants with immediate loading in orthodontics, in order to improve the quality and shorten the time of multidisciplinary treatment, with a special accent on the following:

1. Screwed dental implants are an excellent alternative to traditional methods of support during orthodontic treatment. Some types of implants are used to provide anchorage in orthodontics.

2. Dental implants with high primary stability, maintain the same level of stability over time, and immediate loading is possible immediately after implant placement. Dental implant, is a source of absolute orthodontic anchorage.

3. The using of immediate loading of dental implants in orthodontic treatment of partially edentulous and its complications is almost 100% suc-

cessful if the chosen type of implant and the clinical situation are properly evaluated.

Key words: partial edentulous, dental implantation with immediate loading, orthoosseointegration, absolute orthodontic anchorage, orthodotically directed regeneration, multidisciplinary treatment

Введение. Неблагоприятное состояние полости рта, оказывает отрицательное влияние на общее состояние человека, качество его жизни и на семейный бюджет.

Отсутствие информированности у населения, некачественный уход за зубами, пренебрежение периодическими профилактическими осмотрами у стоматолога, а также заболевания полости рта, в большинстве случаев приводят своего обладателя, к их частичной или полной потере.

Из многочисленных источников нам известно, что основной причиной потери зубов является, кариес, его осложнения и заболевания пародонта, также имеется документально подтвержденная прямая взаимосвязь между возрастом и потерей зубов. На основании обзора литературы выявлено , что частичная адентия больше распространенна на верхней челюсти чем на нижней, потеря зубов в заднем отделе предшествует потере в переднем отделе. Распространенность частичной адентии среди мужчин выше, чем у женщин (рис 1).

Адентия (частичная или полная) является ключевым показателем здоровья полости рта у населения. Беззубое пространство в зубном ряду, как правило, обусловлено отсутствием одного или нескольких зубов. Основными причинами, приводящими к потере зубов являются, кариес, болезни пародонта, зубочелюстные аномалии, новообразования и кистозные поражения. Основные проблемы, к которым приводит отсутствие зубов - это смещение и наклон соседних зубов в сторону дефекта, экструзия антагонистов, потеря высоты и объема кости, деформация зубного ряда, проблемы в височно-нижнечелюстном суставе, нарушение дикции и изменение эстетики лица и улыбки, связанные с нарушением артикуляции языка и поддержкой мягких тканей утраченными зубами, психологическая неудовлетворенность. [1, 3, 5, 10, 13]

Отсутствие доверия, потеря веса и ограничения в диете и социальной активности, являются основополагающими факторами, негативно влияющими на качество нашей жизни.

Все выше перечисленные факторы играют решающую роль в реабилитации пациентов с частичной адентией и если эти нарушения значительны, то возникает необходимость в ортодонтической коррекции, а в некоторых случаях полноценном ортодонтическом лечении. [3, 4, 7, 9, 10, 12]

Целью работы является Совершенствование методов ортодонтического лечения пациентов с деформациями зубных рядов, вследствие частичного отсутствия зубов и дисфункцией височно-нижнечелюстного сустава, путем одновременного применения брекет-системы и немедленной ортодонтической нагрузки двукомпонентных винтовых дентальных имплантатов, а также монолитных с интегрированным абатментом для достижения оптимальных результатов ортодонтической подготовки на этапе протетического лечения зубочелюстной системы.

Материалы и методы исследования. Проведенно обследование и мультидисциплинарное лечение 21 пациента с зубочелюстными аномалиями и деформациями зубных рядов связанными с потерей постоянных зубов.

Пациентов распределили на группы в зависимости от пола, возраста и области локализации дефекта зубного ряда по Кеннеди.

Обследование было проведенно до начала лечения, в процессе и по завершению лечения.

Пациентам с зубочелюстными аномалиями осложненными частичным отсутствием одного или несколько зубов установленна несьемная брекет система, после проведения этапа выравнивания положения зубов и коррекции формы зубных рядов в беззубые участки челюстей инсталированы титановые зубные имплантаты далее на зубной имплантат установливается временная композитная коронка с брекетом и в пазы брекетов припасовывается ортодонтическая дуга, тем самым зубной имплантат подвергается немедленной ортодонтической и функциональной нагрузке. По окончании мультидисциплинарного лечения на лингвальную поверхность передних зубов обеих челюстей

фиксируется несъемный ретейнер, а временная композитная коронка заменяется постоянной металокерамической или цельнокерамической коронкой.

Так же, в данный период в НИИ ИЭПИТ АНА проводится клинико-экспериментальное исследование на приматах с целью описания полей напряжений и деформаций возникающих вокруг немедленно нагруженных зубных имплантатов ортодонтической и функциональной нагрузкой, а также анализа распределений напряжений возникающих в пери-имплантной области и на поверхности дентального имплантата и передающихся в окружающую кость методом конечных элементов (МКЕ), результаты которого будут опубликованны в научной статье.

Изучение состояния зубочелюстного комплекса пациентов проводили на основании:

1. Клинического обследования пациентов
2. Биометрического анализа размеров и формы зубов и зубных рядов
3. Лучевых методов диагностики
4. Фотоанализ
5. Функциональных методов исследования зубо-челюстной системы и височно-нижнечелюстного сустава.: кинезиография, миостимуляция(рис. 2).
6. Биомеханического анализа зубо-челюстной системы и височно-нижнечелюстного сустава.

Критерии включения:

Пациенты мужского и женского пола в возрасте от 17 до 65 лет с частичным отсутствием зубов, деформацией зубных рядов ,а так же сопровождаемые дисфункцией височно-нижнечелюстного сустава и нуждающиеся в ортодонтическом, имплатологическом и протетическом лечении.

Критерии не включения:

Пациенты мужского и женского пола младше или старше указанного возрастного периода,

Пациенты с интактными зубными рядами.

Пациенты с заболеваниями крови и кроветворных органов,

С заболеваниями центральной нервной системы.

Злокачественными новообразованиями различных органов и систем
С системными заболеваниями соединительной ткани
С некоторыми заболеваниями слизистой оболочки полости рта
Сахарный диабет I типа
Гипертонусом жевательных мышц
Врожденными заболеваниями челюстнолицевой области.

Результаты и их обсуждение. Оссеоинтегрированные дентальные имплантаты, демонстрируют отличные результаты применения, как при полной, так и частичной адентии и их применение в современной ортодонтии является результатом научно-технического прогресса. Использование имплантатов у пациентов с частичной адентией для ортодонтической опоры, предоставляет улучшенную механику работы ортодонтического аппарата и движения зубов. Однако их использование требует, точного изготовления временной коронки, чтобы оптимально направить ортодонтические силы между имплантатами и зубами, которые требуется переместить(рис. 3). [1, 2, 3, 6, 8, 11, 12,14]

Мультидисциплинарное планирование комплексного лечения, способствует успешному применению дентальных имплантатов. Трехмерное планирование области установки дентального имплантата необходимо, чтобы не идти на компромисс ортодонтическим перемещениям или последующему протетическому лечению.

Выводы. Использование дентальных имплантатов с немедленной нагрузкой при ортодонтическом лечении пациентов с частичным отсутствием зубов требует скоординированного командного подхода врачей стоматологов, особенно при лечении сложных аномалий прикуса, сопровождаемых частичной адентией и дисфункцией ВНЧС, а применение имплантатов в виде скелетной опоры обеспечивает стабильный анкораж и надежную поддержку ортодонтического лечения.

Литература

1. Персин Л.С, Шаров М. Н. Стоматология. Нейростоматология. Дисфункции зубочелюстной системы. Гоэтар-Медиа 2013 с. 328-340.

2. Слабковская А.Б. Теблоева Н.К., Баташвили Ш.М. Возможности применения ортодонтических имплантатов Российская стоматология 2008; 1: с. 56-60.
3. Слабковская А.Б. Панаиотов И.П. Мультдисциплинарное лечение в современной реставрационной стоматологии. Ортодонтия 2014; 2[66]: с 39-47.
4. Шварц А.Д. Роль биомеханики в стоматологии http://stomatolog-shvarc.narod.ru/articles.html
5. Шварц А.Д. Концепция ортопедического лечения дефектов зубных рядов http://stomatolog-shvarc.narod.ru/article67.html
6. Spear F. M., Kokich V. G. and Mathews D. P. Interdisciplinary management of anterior dental esthetics J Am Dent Assoc 2006; 137: 160-169
7. Heymann G. C. DDS. Tulloch C. BDS, D. Orth. Implantable Devices as Orthodontic Anchorage: A Review of Current Treatment Modalities Journal of Esthetic and Restorative Dentistry 2006; 2: 68-79
8. Heng-Li Huang, Jui-Ting Hsu, Lih-Jyh Fuh, Ming-Gene Tu, Chig-Chang Ko, Yen-Wen Shen Bone stress and interfacial sliding analysis of implant designs on an immediately loaded maxillary implant: A non-linear finite element study, Journal of dentistry 2008; 36: 409–417
9. Higuchi K. W. DDS. MS Orthodontic Applications of Osseointegrated Implants. 2000
10. Kokich V. G. Managing Complex Orthodontic Problems: The Use of Implants for Anchorage, Seminars in Orthodontics, 1996; 2: 153-160.
11. *Kokich V. G., DDS, MSD* Excellence in Finishing: Modifications for the Perio-Restorative Patient Seminar Orthodontic 2003; 9: 184-203
12. Mandler W. Fabritius Th. Long-term study on immediate loading of one-piece KOS® implants with fixed complete dentures. www.FranzMedien.com DentalSpiegel 2009; 1/2
13. Melsen B. Adult Orthodontics School of Dentistry, Aarhus University, Denmark 2012; 205-231
14. Proffit W.R, Fields H.W, Sarver D.M. Special Considerations in Treatment for Adults Contemporary Orthodontics, St. Louis, Mosby Inc 2006; 635-651.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ МИКРОВОДОРОСЛИ ХЛОРЕЛЛА В КАЧЕСТВЕ АНТИУЛЬЦЕРАГЕННОГО ФАКТОРА

Мамонова Н.В., Туманова Л.А.
Научно-исследовательский центр курортологии и реабилитации филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Северо-Кавказский федеральный научно-клинический центр» Федерального медико-биологического агентства в городе Сочи
e-mail: nat_mamonova@mail.ru

Резюме

На сегодняшний день микроводоросли имеют очень высокий потенциал для исследования как сырья для фармацевтической и пищевой промышленности, в основе которого лежит чрезвычайно сложный метаболизм одноклеточных фототрофов. Поисковые эксперименты на мышах показали, что есть реальные перспективы для использования препарата на основе микроводоросли хлорелла в качестве антиульцерогенного агента.

Ключевые слова: экспериментальная язва, хлорелла, репарация

POSSIBILITIES OF USING THE MICROALGA CHLORELLA CULTURE MEDIUM AS AN ANTI-ULCEROGENIC FACTOR

Mamonova N.V., Tumanova A.L.
Scientific Research Center of balneology and rehabilitation, a branch of the Federal State Budgetary Institution "North-Caucasian Federal Scientific and Clinical Center" Federal Medical and Biological Agency in the city of Sochi
E-mail: nat_mamonova@mail.ru

Abstract

To date, microalgae have a very high potential for research as a raw material for the pharmaceutical and food industries, which is based on the extremely complex metabolism of unicellular phototrophs. Search experiments on mice have shown that there are real prospects for using the drug based on chlorella microalga as an anti-ulcer agent.

Key words: experimental ulcer, chlorella, repair

Введение. В последние годы все больше внимание специалистов привлекают вопросы комплексного применения природных лечебных факторов для оптимизации физиотерапевтических воздействий и разработке на их основе новых высокоэффективных технологий, направленных на коррекцию протекающих в организме процессов. Ряд преимуществ препаратов растительного происхождения, таких как малая токсичность, хорошая переносимость, возможность длительного использования без опасности развития побочных явлений, делает перспективным изучение лекарственных растений и разработку на их основе эффективных средств для лечения и профилактики многих заболеваний [3; 6; 7].

Целью работы явилось изучение влияния антиульцерогенной активности культуральной среды хлореллы на модели экспериментального повреждения слизистой оболочки желудка мышей.

Методы исследования. Антиульцерогенную активность определяли, используя этаноловую модель экспериментального повреждения слизистой желудка. Этаноловое поражение слизистой желудка мышей моделировали путем однократного внутрижелудочного введения этанола (1 мл 96° /200 г массы животного) [1]. Оценку ульцерогенного эффекта производили через 1 ч после введения спирта. Степень повреждений слизистой желудка и ее тяжесть характеризовали на основании расчетов суммарной длины язвенных поражений (в мм) у каждой крысы. О величине противоязвенного эффекта препарата судили по процентному уменьшению тяжести поражений в опытных группах по отношению к этому показателю в контроле.

Эксперименты выполнены на 10 беспородных мышах обоего пола. Исследуемый раствор вводили внутрижелудочно (в дозе 1 мл на 200

г массы животного). Животных умерщвляли на 3-й и 7-й день эксперимента методом дислокации шейного отдела позвоночника, желудки извлекали, вскрывали по малой кривизне, промывали холодным физиологическим раствором и макроскопически с помощью лупы при ярком освещении определяли число и площадь деструкции, которые дифференцировали на точечные (менее 1 мм), крупные (более 1 мм) и полосовидные. Подсчитывали среднее количество изъязвлений на одно животное в группе, процент животных с язвами.

Результаты исследования и обсуждение. Используемый нами раствор уже через 3 дня применения уменьшает среднее число изъязвлений на мышь почти на треть (на 27 %), хотя в последующие дни скорость заживления практически не отличается от таковой в естественных условиях. Противоязвенная активность раствора в первые дни применения на фоне вызванной острой этаноловой язвы равна 2 единицам, что позволяется данное средство считать активным [5].

Многими авторами показано, что при язвенных поражениях слизистой оболочки пищеварительного тракта активность ферментных и неферментных антиоксидантных систем достоверно снижается, следствием чего является ослабление антиоксидантной защиты и значительное усиление процессов перекисного окисления липидов [4]. Активные формы кислорода стимулируют процессы перекисного окисления липидов в биологических мембранах и тканях, идущие с потерей энергии и приводящие к повреждению данных субстратов [2]. Возможно, для исследуемого раствора характерно противовоспалительное действие за счет антиоксидантного противоотечного и капилляроукрепляющего эффекта.

Заключение. Наши поисковые эксперименты показали, что есть реальные перспективы для использования препарата на основе микроводоросли хлорелла в качестве антиульцерогенного и/или репаративного агента, который, как ожидается, будет улучшать микроциркуляцию в регенерирующих и прилежащих к ним тканях, ускорять реакции воспаления, уменьшать выраженность инфекционного процесса, стимулировать клеточную пролиферацию, повышать активность ферментных систем и скорость потребления кислорода, снижать уровень перекисного окисления липидов и др.

На сегодняшний день микроводоросли имеют очень высокий потенциал для исследования как сырья для фармацевтической и пищевой промышленности, в основе которого лежит чрезвычайно сложный метаболизм одноклеточных фототрофов.

Литература

1. Bou Abbound Ch.F., Wayland H. et al. Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rat // Dig. Dis. Sci. - 1988. - vol. 33, № 7 – P. 872 – 882.
2. Marcon N.E. Laser in gastrointestinal haemorrage // Eur. J. Gastroent. – 1990. - Vol. 2, No. 2. – P. 94.
3. Васильев А.В., Полоз Т.П., Соколов Н.Н. Лекарственные растения Сибири – неиссякаемый источник для создания новых высокоэффективных лечебно-профилактических препаратов и биологически активных пищевых добавок // Вопросы мед. химии – 2000 - № 2 – http://www.medi.ru/8800201.htm.
4. Звершхановский Ф.А., Вайнштейн С.Г. Свободнорадикальное окисление липидов и антиоксидантные системы в патогенезе гастродуоденальных изъязвлений // Врачебное дело – 1987. - № 9. – с. 42 – 45
5. Зуева Е.П., Рейхарт Д.В., Крылова С.Г. и др. Лекарственные растения в терапии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. – Томск: Из-во ТГУ, 2003. – 212 с.
6. Пашинский В.Г. Лекарственные растения в терапии язвенной болезни желудка и ДПК / Методич. рекомендации – Томск, 1990 - 28 с.
7. Рузляева Е.А. Фармакологические свойства суммарного экстракта одуванчика лекарственного: Автореф. дис. …к.б.н. – Томск, 1996 – 22 с.

НОВАЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА НА ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА РАСТЕНИЯ ИГЛИЦА ПОНТИЙСКАЯ

Хечумян А.Ф., Ходасевич Л.С.,
Бехтерев В.Н., Наследникова И.О.
Научно-исследовательский центр курортологии и реабилитации филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Северо-Кавказский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» в городе Сочи, Сочи, Россия
ira_naslednikova@mail.ru

Резюме

Исследование посвящено разработке биологически активной добавки с помощью экстракционного вымораживания в поле центробежных сил экстракта растения Иглица понтийская. Доклинические исследования показали перспективность направления по разработке импортозамещающей БАД венотонизирующего действия на основе экстракта растения Иглица понтийская.

Ключевые слова: Иглица понтийская, биологически активные добавки, экстракционное вымораживание в поле центробежных сил, сапонины, рускогенин, венотоники, доклиническое исследование.

NEW BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVE ON THE BASIS OF THE PLANT EXTRACT OF THE NEOTRIC PLANT

Hechumyan A.F., Khodasevich L.S.,
Bekhterev V.N., Naslednikova I.O.
NITSKIR FFGBU SCFNC FMBA Russia in the city of Sochi
Sochi, Russia
ira_naslednikova@mail.ru

Abstract

The research is devoted to the development of a biologically active additive with the help of extraction freezing in the field of centrifugal forces

of the extract of the Ignice Pontic plant. Preclinical studies have shown the promise of a direction for the development of an import-substitution BAA for a venotonic effect on the basis of an extract of the Ignice Pontic plant.

Key words: Pontic Iglinica, biologically active additives, extraction freezing in the centrifugal force field, saponins, Ruskogenin, venotonicks, preclinical research.

Введение. Особую актуальность и значимость в медико-биологическом сопровождении подготовки высококвалифицированных спортсменов в настоящее время приобретают так называемые корректоры функционального состояния, предотвращающие развитие патологических процессов, а также способствующие ускорению восстановления спортсменов после интенсивных физических нагрузок. Перспективным направлением в разработке импортозамещающих препаратов, используемых в спортивной медицине, на наш взгляд, является создание отечественной биологически активной добавки (БАД) на основе растений рода Иглица (лат. Ruscus) [2]. Известно, что это растение содержит сапонины – гликозиды, обладающие специфическими свойствами и оказывающие разнообразные физиологические эффекты [5, 6].

Целью работы явилась разработка и испытание БАД, полученной с помощью инновационной технологии – экстракционного вымораживания из корневища и надземной части эндемичного растения Черноморского побережья Кавказа – Иглицы понтийской (Ruscus ponticus).

Методы исследования. Исследования проводили на спектрофотометре SPECORD-40 (Analytik Jena, Германия) согласно процедуре после выделения биологически активных веществ из Иглицы методом экстракционного вымораживания в поле центробежных сил [1]. Воздействие разработанного БАД на метаболическую функцию печени проводилось в эксперименте на крысах.

Результаты и их обсуждение. Три образца сухого экстракта Иглицы анализировали по одинаковой процедуре. Было установлено, что содержание сапонинов в экстрактах, полученных экстракционным вымораживанием, более чем в 8 раз выше аналогичного показателя для сухого экстракта, получаемого традиционным этанольным извлечением. Обращал на себя внимание и тот факт, что концентрация одного из

основных компонентов БАВ Иглицы понтийской (Ruscus ponticus) – рускогенина, в сухом экстракте, полученном в результате использования технологии экстракционного вымораживания, превышала показатель в этанольном экстракте в 29 раз.

Механизм терапевтического действия рускозидов обусловлен стимуляцией выброса рецепторами норадреналина, который, в свою очередь, способствует вазоконстрикции периферических сосудов и уменьшению капиллярной проницаемости. Рускогенин, кроме того, проявляет выраженное антиэкссудативное действие на моделях формалинового отека лапы и «карманной» гранулемы у крыс, а также на модели термического воспаления прямой кишки у мышей, обусловленное α1-адреномиметической активностью. Препарат не оказывает гепато-, нефро- и гастротоксического действия [2, 4, 6].

Любой БАД имеет многокомпонентный и многоуровневый механизм действия, обусловленный входящими в его состав активными веществами. Сапонины и сапогенины нормализуют функцию эндокринных желез, стимулируют выработку фолликулостимулирующего гормона, нормализуют функцию коры надпочечников, стимулируют секреторную активность поджелудочной железы и инсулинзависимый транспорт глюкозы в клетки, увеличивают поглощение йода щитовидной железой. Сапонины повышают функциональную активность центральной нервной системы, причем, в отличие от психостимуляторов, не за счет вмешательства в рецепторно-медиаторную передачу, а путем улучшения энергетики процессов синтеза в нейронах. Сапогенины имеют структурное сходство с глюкокортикоидными гормонами, благодаря чему проявляют отчетливое противовоспалительное и противоаллергическое действие [3, 5]

Доклинические исследования были проведены на лабораторных крысах. Однократное применение БАД не оказало значимого влияния на показатели метаболической функции печени крыс.

Воздействуя суммой физических и химических свойств на рецепторный аппарат желудка, всасываясь в системный кровоток, БАД, безусловно, оказывает влияние на органы пищеварительной системы, в частности, на печень. Аминотрансферазы печени относятся к ферментам, активность которых повышается при повреждении ткани за счет

гибели и разрушения клеток, в результате чего ферменты выходят в общий кровоток. По нашему мнению, БАД способен оказывать как раз противоположный эффект, способствуя восстановлению и укреплению клеток. По-видимому, печеночные клетки обнаруживают признаки активной регенерации. Возможно, также, что уменьшение активности аминотрансфераз в плазме животных связано и с уменьшением количества самих ферментов. Это может быть связано с процессами регенерации, поскольку последняя, как известно, характеризуется интенсивным синтезом белков, где и могут быть задействованы трансаминазы печени. Этому факту есть подтверждение и в народной медицине, где многие растения описываются как средства, усиливающие регенераторные процессы печени [3].

Уровень общих липидов в плазме крови животных после воздействия фитопрепарата увеличивался. И хотя такое изменение принято считать неблагоприятным, однако гиперлипопротеинемию можно рассматривать и как защитный фактор, например, от поражения коронарных артерий. Гиполипидемия могла быть вызвана за счет улучшения диффузии кислорода через капиллярную систему. Понижение концентрации липидов в крови влечет за собой и снижение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), оказывающих повреждающее действие на эндотелий [3]. Возможно, воздействие БАД на уровень общих липидов в плазме крови может свидетельствовать о понижении в организме степени напряженности регуляторных процессов, что могло произойти вследствие ускорения развития компенсаторных процессов.

Проявление эффектов БАД возможно и за счет влияния его составных компонентов на кровоток, например, через достижение максимального увеличения пульсового кровенаполнения печени, улучшения функционального состояния притока и оттока крови и интенсивности внутрипеченочной микроциркуляции [6].

Выводы. Таким образом, доклинические исследования показали перспективность направления по разработке импортозамещающей БАД действия на основе экстракта растения Иглица понтийская (Ruscus ponticus). Для разработки рекомендаций применения её в комплексной медицинской реабилитации спортсменов, а также в лечении профессионально обусловленных и социально значимых заболеваний, в

том числе по дозировкам, схемам применения и показаниям к применению, необходимо провести клиническое изучение действия данной БАД.

Литература

1. Бехтерев, В.Н. Экстракционное вымораживание одноосновных карбоновых кислот из воды в ацетонитрил в условиях действия центробежных сил / В.Н. Бехтерев // Журнал физической химии. – 2016. – Т. 90, № 10. – С. 1558-1562.
2. Томашевская, О.Ю. Фармакогностическое изучение и стандартизация Иглицы шиповатой и сухого препарата на ее основе: Автореф. дисс. … канд. фарм. наук. – М., 2009. – 24 с.
3. Турищев, С.Н. Основы фитотерапии / С.Н. Турищев. – М.: Рус. врач, 1999. – 128 с.
4. Чеснокова, Н.Н. Экспертная оценка применения венотоников в терапии варикозной болезни нижних конечностей / Н.Н. Чеснокова // Новая наука: от идеи к результату. – 2017. – № 1-3. – С. 173-175.
5. Шадрин, Д.М. Распространение, классификация, методы обнаружения и выделения сапонинов из растительного сырья и их биологическая активность / Д.М. Шадрин, И.Ф. Чадин // Вестник института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. – 2010. – № 1. – С. 15-23.
6. De Marino, S. Novel Steroidal Components from the Underground Parts of Ruscus aculeatus / S. De Marino, C. Festa, F. Zollo, M. Iorizzi // Molecules. – 2012. – Vol. 17. – P. 14002-14014.

ОМАЛИЗУМАБ: ПЕРВЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ РОССИЙСКОГО ПРОИЗВОДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ АСТМЫ

Салимов Р.М., Азарова А.М., Дегтярев М.Б, Лисицина О.М., Пантюшенко М.С., Жиляева М.В., Хамитов Р.А.

«МБЦ «ГЕНЕРИУМ», пос. Вольгинский, Владимирская область, Россия

info@ibcgenerium.ru

Резюме

Воспроизведённый препарат Омализумаб компании АО «Генериум» представляет собой рекомбинантное гуманизированное IgG1κ моноклональное антитело для лечения аллергической астмы, которое селективно связывается с иммуноглобулином Е человека. Выполненные доклинические исследования свидетельствуют о биоаналогичности разработанного биоаналога Омализумаб (АО «ГЕНЕРИУМ») и референтного препарата Ксолар (Новартис Фарма Штейн АГ, Швейцария). Полученные результаты позволили рекомендовать Омализумаб (АО «ГЕНЕРИУМ») для клинических исследований.

Ключевые слова: бронхиальная астма, омализумаб, воспроизведенные лекарственные средства

OMALIZUMABZUMAB: THE FIRST RUSSIAN BIOTECH MEDICINE FOR ALLERGIC ASTHMA TREATMENT

Salimov R. M., Azarova A.M., Degtyarev M. B., Lisitsina O. M., Pastushenko M. S., Zhilyaeva, V. M., Khamitov R. A.

"IBC GENERIUM", village Volginsky, Vladimir region, Russia

info@ibcgenerium.ru

Abstract

The biosimilar medicine Omalizumab produced by AO "Generium" company is a recombinant humanized IgG1κ monoclonal antibody for treatment of allergic asthma that selectively binds to human immunoglobulin E. The full-scale preclinical studies have revealed a complete bio-similarity

of Omalizumab (AO «GENERIUM») and reference medicine Xolair (Novartis Pharma Stein AG, Switzerland). The results allow recommendation of Omalizumab (AO «GENERIUM») for clinical trials.

Key words: bronchial asthma, omalizumab, biosimilar medicines

Введение. Омализумаб относится к фармакологической группе иммунодепрессантов и является первым и пока единственным биопрепаратом для терапии аллергической астмы. В России омализумаб зарегистрирован под торговым наименованием Ксолар (Новартис Фарма Штейн АГ, Швейцария). При терапии омализумабом у пациентов с атопической бронхиальной астмой отмечается заметное уменьшение (приблизительно на 90%) выброса гистамина после стимуляции аллергеном по сравнению с данными, полученными до начала терапии.

Терапевтическое действие осуществляется благодаря тому, что омализумаб связывается и образует комплекс со свободным IgE в плазме человека, предотвращая связывание IgE с высокоаффинными (FcεRI) рецепторами на поверхности тучных клеток, базофилов и антиген-презентирующих клеток. Снижение количества поверхностно-связанного IgE на клетках, имеющих рецепторы FcεRI, лимитирует их дегрануляцию и высвобождение медиаторов аллергического ответа, а также приводит к снижению экспрессии самого рецептора, снижая вероятность дальнейшей активации базофилов/тучных клеток свободными молекулами IgE. За счёт связывания с тем же (Cε3) доменом на IgE, что и FcγRI, омализумаб не вызывает антител-зависимой цитотоксичности.

Омализумаб компании АО «Генериум» представляет собой рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело IgG1κ, которое селективно связывается с иммуноглобулином Е (IgE) человека. Омализумаб производится по технологии рекомбинантной ДНК в клетках яичников китайского хомячка.

Целью работы была оценка биоаналогичности воспроизведённого препарата Омализумаб компании АО «Генериум» (GNR-044) в сравнении с препаратом Ксолар, компании «Новартис Фарма Штейн АГ».

Методы исследования. Исследование биоаналогичности препаратов Омализумаб и Ксолар выполняли с помощью панели физико-химических методов. Фармакодинамику и токсичность оценивали в со-

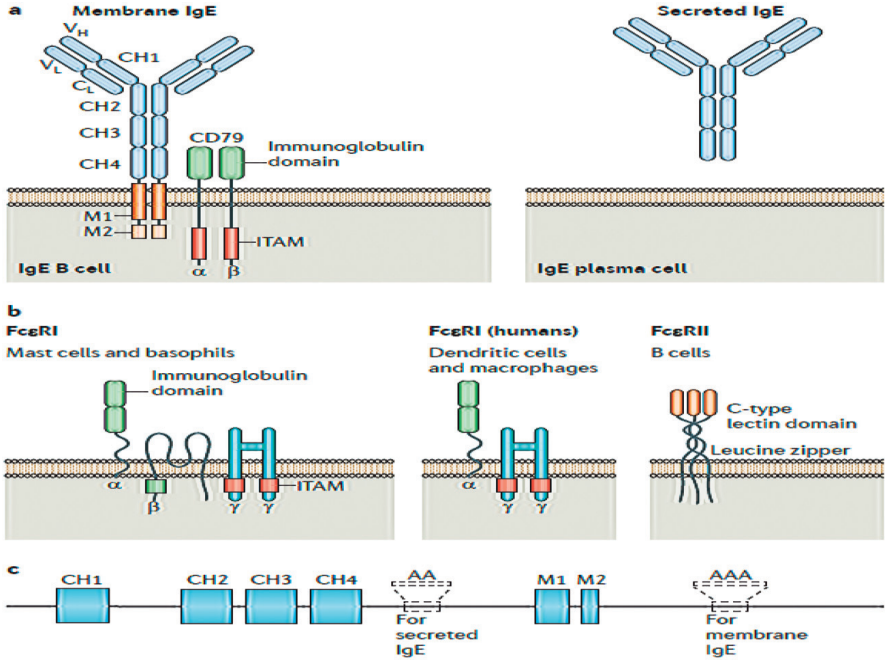


Рисунок 1. *IgE и его рецепторы [2]. a) IgE существует в двух формах: в виде мембран-связанного, экспрессируемого на поверхности B-клеток; и секретируемой форме, экспрессируемой плазматическими клетками. b) Высокоаффинный рецептор FcεRI экспрессируется в виде тетрамерного комплекса, содержащего по одной α- и в-субъединице и две γ-субъединицы. γ-субъединица содержит ITAM и принимает участие в передаче сигнала рецептором. У человека (но не у мыши) FcεRI также экспрессируется в виде тримера (одна α- и две γ-субъединицы) на дендритных клетках, макрофагах и других типах клеток. Низкоаффинный рецептор FcεRII (CD23) экспрессируется в виде гомотримера на B - и других клетках иммунной системы. c) Геномный локус IgE состоит из экзонов, кодирующих четыре константных домена тяжёлой цепи (CH1–CH4), трансмембранного домена (M1) и цитоплазматического домена (M2). Сайты полиаденилирования (AA) секретируемой формы IgE находятся между экзонами CH4 и M1, в то время как аналогичные сайты (AAA) для мембран-связанной формы IgE, находятся после экзона M2. Условные обозначения: CL, constant region of the immunoglobulin light chain; VH, variable region of the immunoglobulin heavy chain; VL, variable region of the immunoglobulin light chain.*

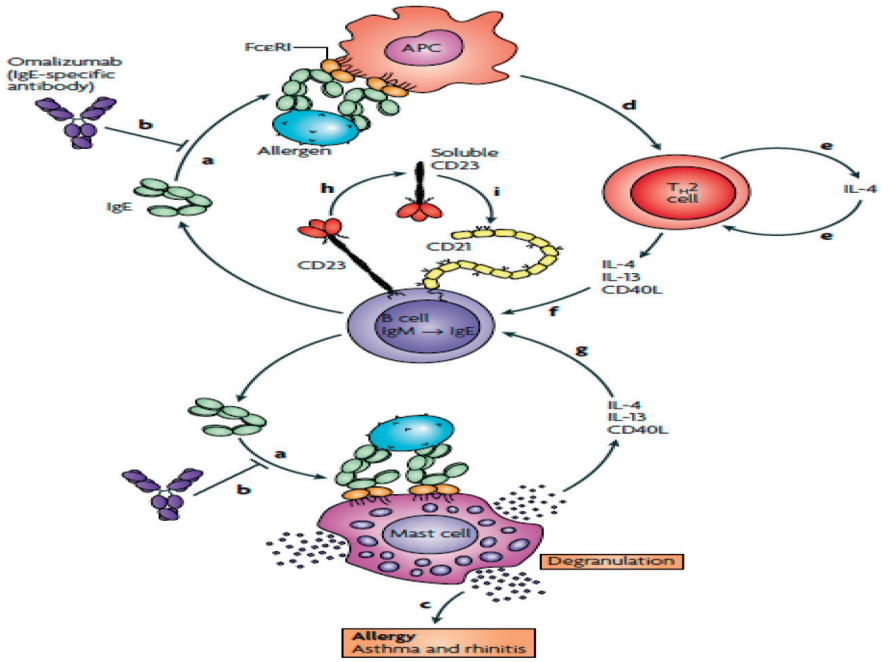


Рисунок 2. *Механизм инициации аллергической реакции и её ингибирование омализумабом [3]. IgE синтезируется и секретируется В-клетками, прошедшими класс-переключение тяжелых цепей иммуноглобулинов с IgM на IgE. IgE связывается с рецептором FcεRI на тучных и антиген-презентирующих клетках (АПК) (a) и сенситизирует их к аллергенам. Омализумаб предотвращает связывание IgE с FcεRI на тучных клетках и АПК (b). Связывание аллергена с IgE вызывает дегрануляцию тучных клеток, приводя к аллергическому ответу (c). Связывание аллергена с АПК приводит к презентации аллергенных пептидов Т хелперам 2 (TH2) (d). Аллерген-активированные TH2 секретируют ИЛ-4 (IL-4) (e) для поддержания TH2 клеток и рекрутирования дополнительных TH клеток в TH2 (e). TH2 также вырабатывают ИЛ-13 (IL-13) и экспрессируют CD40 лиганд (CD40L), который совместно с ИЛ-4 стимулирует класс-переключение тяжелых цепей иммуноглобулинов на IgE (f). Тучные клетки, активированные аллергеном также секретируют ИЛ-4 и ИЛ-13 и экспрессируют CD40L), который также может стимулировать класс-переключение на IgE (g). ИЛ-4, ИЛ-13 и CD40L также стимулируют экспрессию CD23 (FcεRII) и выброс растворимого CD23 (h). У человека, растворимый тримерный CD23 стимулирует синтез и секрецию IgE посредством взаимодействия с CD21 (i).*

ответствии с Правилами проведения исследований биоаналогичности лекарственных средств Евразийского экономического союза [1].

В связи с узкой видовой специфичностью омализумаба и отсутствием связывания омализумаба с IgE большинства видов млекопитающих (не приматов) в доклинических *ex vivo u in vivo* исследованиях оригинатора преимущественно использовались яванские макаки. Данный вид животного является удобной моделью ввиду наличия более высокой базовой концентрации IgE даже по сравнению с пациентами с атопией у человека, участвовавшими в КИ. В связи с этим в наших сравнительных исследования *in vivo* объектом изучения преимущественно являлись яванские макаки.

Результаты и их обсуждение. Исследование биоаналогичности препаратов Омализумаб и Ксолар по их физико-химическим свойствам позволило установить следующее. В результате обращённо-фазовой ВЭЖХ трипсинолизатов двух препаратов уникальных пиков найдено не было. Подтверждена первичная структура (аминокислотная последовательность), молекулярная масса исследованных молекул и близость профилей препаратов Омализумаб и *Ксолар*. Биоаналогичность физико-химических свойств препаратов Ксолар и Омализумаб *установлена с помощью методов* пептидного картирования (ОФ-ВЭЖХ, MS), электрофореза в полиакриламидном геле, измерения молекулярной массы методом ВЭЖХ-МС, определения тиолов с использованием реагента Эллмана, спектроскопии кругового дихроизма, гель-фильтрационной, ионообменной и гидрофобной ВЭЖХ.

Исследование фармакодинамики препаратов Омализумаб и Ксолар позволило установить, что препараты Омализумаб и Ксолар обладают сопоставимыми количественными показателями связывания с человеческим белком C1q и рецепторами FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa, FcγRIIb, FcγRIIb и FcRn человека.

Биоаналогичность Омализумаба и Ксолара показана в экспериментах на нативном человеческом биоматериале: базофилах цельной крови здоровых доноров и сыворотках пациентов - «аллергиков» с моно- или поливалентной сенсибилизацией, имеющих IgE – опосредованную (атопическую) бронхиальную астму:

- Омализумаб и Ксолар не стимулируют дополнительную активацию базофилов с последующим выбросом медиаторов воспаления и демаскированием маркеров CD63 и CD203;

- Омализумаб и Ксолар были сопоставимы по уровню ингибирования связывания сывороточных IgE «аллергиков» с базофилами цельной крови здоровых доноров;

- Омализумаб и Ксолар были сопоставимы по уровню ингибирования аллерген-зависимой активации базофилов периферической крови здорового донора, сенсибилизированных IgE из сывороток пациентов «аллергиков».

Четырёхнедельное исследование общей токсичности с периодом восстановления у яванских макак препаратов Омализумаб (GNR-044) и Ксолар позволило установить, что на всем протяжении исследования животные не проявили признаков интоксикации, летальных случаев зафиксировано не было. Физиологические параметры, а также показатели гематологического и биохимического анализа крови были сопоставимы в группах, получавших Ксолар или Омализумаб. При патоморфологическом исследовании внутренних органов и тканей не выявлено отличий у животных, получавших Ксолар или Омализумаб.

Исследование токсикокинетики Омализумаба у яванских макак после введения препаратов Омализумаб (GNR-044) и Ксолар позволило установить их биоаналогичность.

Оценка местнораздражающего действия с помощью оценки состояния тканей в месте инъекций не обнаружила различий между животными, которым вводили препараты Омализумаб или Ксолар.

При исследовании иммуногенности было установлено, что число животных, в крови которых были выявлены антитела к омализумабу, не обнаруживало статистически значимого различия между группами, которым вводили препараты Омализумаб или Ксолар.

Выводы. Выполненные доклинические исследования свидетельствуют о биоаналогичности Омализумаба (АО «ГЕНЕРИУМ») и референтного препарата Ксолар (Novartis Pharma Stein AG, Швейцария), что позволяет рекомендовать Омализумаб (АО «ГЕНЕРИУМ») для клинических исследований.

Литература

1. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза// Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016г №89-144 л.
2. Wu L.C., Zarrin A.A. The production and regulation of IgE by the immune system. // Nature Reviews Immunology. –2014. – V.14, N4. – P. 247–259.
3. Gould H.J., Sutton B.J. IgE in allergy and asthma today // Nature Reviews Immunology. –2008. – V.8, N3. – P. 205–217.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПЕЦИФИКИ ЛИЧНОСТНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ У МЕДИЦИНСКИХ И БАНКОВСКИХ РАБОТНИКОВ

И.Г. Макаревская, Л.В. Кравченко
Сочинский государственный университет, г.Сочи, Россия
athoc@yandex.ru, ludak@inbox.ru

Резюме

В статье анализируются личностные особенности, которые могут быть рассмотрены в качестве детерминант стрессоустойчивости как профессионально важного качества в таких выборках, как медицинские и банковские работники. В качестве личностных детерминант в статье рассмотрены: мотивация деятельности, локус контроля, толерантность, личностные черты и смысложизненные ориентации.

Ключевые слова: профессиональная деятельность, стрессоустойчивость, личностные особенности

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE SPECIFICITY OF PERSONAL DETERMINANTS OF STRESS RESISTANCE IN MEDICAL AND BANK SPECIALISTS

I.G. Makarevskaya, L.V. Kravchenko
Sochi State University, Sochi, Russia
athoc@yandex.ru, ludak@inbox.ru

Abstract

Personality peculiarities are analyzed in the article, which can be considered as determinants of stress tolerance as professionally important quality in such samples as medical and bank employees. As personal determinants in the article are considered: motivation of activity, locus of control, tolerance, personal traits and sense of life.

Key words*:* professional activity, stress tolerance, personal characteristics

Введение

В современной жизни стрессы играют значительную роль. Они влияют на поведение человека, его работоспособность, здоровье, взаимоотношения с окружающими и в семье. Современному обществу на сегодняшний день необходимы люди, способные не только сосуществовать с окружающей средой, но и умеющие самореализоваться в ней как личность, несмотря на огромное количество стрессогенных факторов.

Подверженность стрессу зависит и от профессии человека. Наибольший интерес представляют индивидуальные особенности человека, от которых зависит возникновение и течение стресса в профессиональной деятельности. Знание этих личностных качеств поможет предотвратить многие стрессовые ситуации и повысить эффективность труда.

В целом, актуальность проблемы исследования стресса и стрессоустойчивости обусловлена также характерной для современного общества интенсификацией процесса трудовой деятельности, часто сопряженной для специалистов с высокими информационными и эмоциональными нагрузками. Для исследования специфики личностных детерминант стрессоустойчивости в контексте профессиональной деятельности нами были выбраны две выборки с достаточно серьезно различающимися условиями профессиональной деятельности, но при этом стрессовые нагрузки характерны для профессиональной деятельности, как медицинских работников, так и для деятельности специалистов, занятых в банковском секторе.

О типичности стресса для деятельности медицинских работников из-за ее насыщенности такими стресс-агентами, как социальная оценка, неопределенность, повседневная рутина, говорят многие зарубеж-

ные и отечественные исследователи. Проявления стресса в деятельности медицинских работников разнообразны и обширны. Так, в первую очередь выделяются фрустрированность, тревожность, изможденность и выгорание, способные оказать мощное негативное воздействие на качество выполнения профессиональных обязанностей специалистов, социальная значимость деятельности которых огромна.

Профессиональная деятельность банковских служащих отличается сложностью межличностного общения. Ситуации с высокой эмоциональной напряженностью требуют от них личного вклада в установление положительных отношений и умения управлять конфликтами, а все это может послужить источником стресса [2, с.8]. Л.Н. Артамонова и А.Б. Леонова объясняют высокий уровень стрессовой нагрузки работников банковской сферы «направленностью работы персонала на взаимодействие с клиентами, физически и эмоционально тяжелыми условиями труда, несколько пренебрежительным отношением со стороны руководства [1]».

Цель исследования: осуществить сопоставительный анализ личностных факторов стрессоустойчивости медицинских и банковских работников

Методы исследования

В исследовании были использованы следующие методики: методика определения нервно-психической устойчивости в стрессе «Прогноз»; методика диагностики особенностей мотивации профессиональной деятельности; методика диагностики уровня субъективного контроля Дж.Роттера (УСК); методика диагностики коммуникативной толерантности Бойко; опросник «Big Five» Косты и Мак-Крея; методика диагностики смысложизненных ориентаций (СЖО) Д.А.Леонтьева.

Наше исследование проходило в три этапа:

1. На первом этапе мы проанализировали личностные особенности и особенности стрессоустойчивости в выборке медицинских работников

2. На втором этапе мы исследовали личностные особенности и уровень стрессоустойчивости у специалистов экономического профиля

3. На заключительном этапе исследования мы анализировали, какие из личностных особенностей можно рассматривать в качестве детерминант стрессоустойчивости у специалистов-медиков и экономистов.

Выборка состояла из 105 испытуемых мужского и женского пола в возрасте от 23 до 55 лет. Испытуемые, участвующие в нашем исследовании заняты:

- в медицине (врачи-кардиологи, травматологи, анестезиологи, невропатологи, онкологи, врачи общей практики – терапевты, медицинские сестры онкологического, кардиологического, травматологического отделений, врачи и медицинские сестры со станции скорой медицинской помощи) – 53 человека

- в банковском деле (начальники и заместители начальники отделов, специалисты кредитных отделов, специалисты клиентских отделов, специалисты отделов рассчетно-кассового обслуживания юридических лиц, кассиры-операционисты) – 52 человека

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенного нами исследования были получены следующие результаты:

В выборке банковских работников несколько больше испытуемых имеют высокий уровень стрессоустойчивости, но в целом распределение испытуемых по показателю стрессоустойчивости в группе медиков и банковских служащих значимо не отличается.

В группе медицинских работников значимо преобладает по сравнению с выборкой специалистов, занятых в банковском деле, 1 тип мотивационной структуры, который, по мнению К.Замфир, и является наиболее благоприятным – это преобладание внутренней мотивации деятельности над внешней положительной и внешней отрицательной мотивацией. В целом, в группе медицинских работников большее число испытуемых имеют преобладающую внутреннюю мотивацию деятельности, по сравнению с группой испытуемых- работников банков. Таким образом, можно констатировать, что в целом для выборки испытуемых-медиков характерно преобладание оптимальных мотивационных комплексов.

Полученные в исследовании данные, позволяют нам проследить в группе медицинских работников определенную связь между мотивацией профессиональной деятельности и уровнем стрессоустойчивости. Наибольшие значения стрессоустойчивости характерны в этой выборке для испытуемых с преобладающей внутренней мотивацией

профессиональной деятельности, наименьшие – для испытуемых с преобладающей внешней отрицательной мотивацией трудовой деятельности.

Таким образом, на основании этих данных мы можем предположить, что мотивация профессиональной деятельности в группе медицинских работников может быть рассмотрена как фактор, влияющий на стрессоустойчивость личности.

Для того, что бы проверить, верно ли наше предположение, проведем статистическую обработку полученных данных. Для обработки данных мы выбрали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, обработка данных осуществлялась в статистическом пакете SPSS-21,0. Проведенный статистический анализ показывает, что в группе медицинских работников мотивация профессиональной деятельности значимо влияет на показатели стрессоустойчивости личности ($F=19,1$; $p=0,001$), при этом наибольшие значения стрессоустойчивости характерны для испытуемых с преобладающей внутренней мотивацией профессиональной деятельности.

В группе банковских работников тенденции к изменению уровня стрессоустойчивости в зависимости от типа мотивации профессиональной деятельности на основании статистического анализа обнаружить не удалось. Но интересен тот факт, что наибольшие значения стрессоустойчивости в группе банковских служащих были диагностированы у испытуемых с преобладающей внешней мотивацией достижения, что в какой-то мере можно рассматривать как тенденцию, противоположную той, что мы получили в группе медиков.

Таким образом, мотивация деятельности является фактором, значимо влияющим на стрессоустойчивость медицинских работников, и не оказывает значимого влияния на стрессоустойчивость банковских служащих.

На основании проведенного статистического анализа, значимого влияния локуса контроля на стрессоустойчивость выявить не удалось ни в группе медиков ($F=0,34$; $p=0,56$), ни в группе банковских служащих ($F=0,09$; $p=0,92$).

Проанализируем, является ли коммуникативная толерантность фактором стрессоустойчивости личности. Статистический анализ по-

казал, что в группе медицинских работников коммуникативная толерантность значимо влияет на стрессоустойчивость (F= 12,7; p=0,001), в группе банковских работников значимого влияния коммуникативной толерантности на стрессоустойчивость выявлено не было (F= 0,65; p=0,53).

Таким образом, по данным нашего исследования, коммуникативная толерантность значимо влияет на стрессоустойчивость медицинских работников и не оказывает значимого влияния на стрессоустойчивость в группе банковских специалистов. При этом, чем выше коммуникативная толерантность медицинского работника, тем выше уровень его стрессоустойчивости.

Проанализируем далее смысложизненные ориентации как фактор стрессоустойчивости личности. При этом проанализируем как показатель общей осмысленности жизни, так и отдельные смысложизненные ориентации.

Существенно отличаются в группах испытуемых только показатель общей осмысленности жизни – он выше в группе медиков и показатель локус контроля жизни, более высокие средние значения этого показателя также характерны для группы медицинских работников.

Проведенный статистический анализ позволил выявить одну статистическую закономерность. В качестве фактора, влияющего на стрессоустойчивость личности в группе банковских работников можно рассмотреть «процесс жизни» или интерес, эмоциональную насыщенность жизни. Испытуемые этой группы, которые воспринимают сам процесс своей жизни как интересный, эмоционально насыщенный и наполненный смыслом, более стрессоустойчивы, чем испытуемые, неудовлетворенные своей жизнью в настоящем.

На основании статистического анализа в группе медицинских работников смысложизненные ориентации не могут быть рассмотрены как факторы, влияющие на стрессоустойчивость личности.

Заключение

Таким образом, на основании проведенного исследования можно утверждать, что высокий уровень коммуникативной толерантности и преобладание в структуре профессиональной мотивации внутренней мотивации связаны с высоким уровнем стрессоустойчивости профессионала, занятого в медицинской деятельности.

Для банковских служащих в качестве фактора, влияющего на стрессоустойчивость, в нашем исследовании была определена лишь ориентация на процесс жизни, ее эмоциональную насыщенность в настоящем.

Локус контроля и черты личности по данным нашего исследования не оказывают статистически значимого влияния на стрессоустойчивость как медицинских, так и банковских работников.

Литература

1. Артамонова Л.Н. Организационный стресс у сотрудников банка / Л.Н.Артамонова, А.Б. Леонова // Вестник Московского университета. - Сер. 14. Психология. - 2009. -No 1. - С. 56-71.
2. Китаев-Смык Л.А. Выгорание персонала. Выгорание личности. Выгорание души // Вопросы психологии экстремальных ситуаций. - 2007. -No 4. - С. 2-21.
3. Пионтковская Ю.А. Проблема эмоционального выгорания банковских сотрудников // Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов. -2011. -No11.

ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ РАСТЕНИЯ И ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА

А.Г. Дьяченко

Сумской государственный университет Сумы, Украина.

agdyak@gmail.com

Резюме

Генетически модифицированные (ГМ) растения привлекают в последние годы большое внимание общественности. Хотя потребители остаются в основном в неведении относительно того, что собой представляют ГМ-культуры на самом деле, каковы преимущества и недостатки существующих технологий, и в каких сферах экономики эти технологии и их продукты могут использоваться, общество в целом настроено негативно в отношении перспектив их использования в качестве продуктов питания. Более того, парламенты ряда стран, напри-

мер, РФ, принимают законы, запрещающие выращивание ГМ-растений и животных и ввоз их из-за рубежа. В то же время априорное отрицание возможных проблем, связанных с использованием ГМ-культур, было бы также неправильным. На самом деле с появлением первого поколения подобных культур возникли две основные проблемы: риск для окружающей среды и риск для здоровья человека. Поскольку внедрение ГМ-линий растений и животных будет неуклонно возрастать, можно прогнозировать соответствующее повышение общественной озабоченности в связи с потенциальными рисками. Так как СМИ представляют информацию, основанную, зачастую, на ненадежных и нерепрезентативных данных, а то и вовсе лишенную признаков научного исследования, **целью** настоящего обзора является анализ научных данных о возможном влиянии ГМ-растений на здоровье человека как напрямую – через их участие в питании человека и сельскохозяйственных животных и в производстве рекомбинантных лекарственных средств, так и косвенно, через воздействие на окружающую среду.

Ключевые слова: трансгенные продукты, генетически модифицированные организмы, ГМО

GENETICALLY MODIFIED PLANTS AND HUMAN HEALTH

A.G. Dyachenko
Sumy State University, 2 Rimsky-Korsakov st., 40007, Sumy, Ukraine
agdyak@gmail.com

Abstract

Genetically modified (GM) plants attracted in recent years much public attention. Although consumers remain largely unaware of what GM crops really are, what are the advantages and disadvantages of existing technologies, and in what areas of the economy, these technologies and their products can be used, the company overall adjusted negatively in relation to the prospects for their use as food. About the spread of GMO-phobia, says

at least the presence of the label “GMO” on almost all commercial products, including mineral water and salt. Moreover, this marking occurs on non-food items, such as kitchen utensils and even (!) the bags of cement, which once again testifies to a woefully low level of awareness about the subject. Moreover, parliaments of several countries, such as Russia, have introduced laws prohibiting the cultivation of GM plants and animals and the importation of them from abroad. At the same time a priori denial of the possible problems associated with the use of GM crops, it would also be wrong. Actually with the advent of the first generation of such crops two major concerns have emerged: the risk to the environment and risk to human health. Since the introduction of the GM-lines of plants and animals will steadily increase, we can predict a corresponding increase in public concern about potential risks. So, we tried to analyze scientific evidence about the possible impact of GM plants on human health both directly – through their participation in the human diet and farm animals and in the production of recombinant medicines, and indirectly, through the impact on the environment.

Indeed, for the discrimination of GM products being transformed with the gene of interest selective marker genes are often used (e.g., kanamycin, which kills normal cells non-GM plants). According to opponents, this increases the risk of antibiotic resistance (ABR) spreading in the bacterial population. But it is very known that the ABR genes were originally isolated from soil bacteria which are widely distributed in nature. Studies have shown that the probability of ABR transmission from plants to bacteria is extremely low. Getting selectable markers that do not use resistance to AB, as well as procedures that remove the marker from the plant genomes at the end of transformation, almost completely takes off fears this kind [10].

The second related to GM technology problem the transfer to the plant genomes of the unnecessary, redundant DNA was also successfully solved. It was developed minimal gene cassette, which houses a well-defined DNA fragment [8].

The third problem relates to the possible increase of the level of natural mutations result in lowering the stability of the genome, which can cause certain undesirable effects. In principle, in the process of tissue culture may appear in the so-called somoclonal variations and possible rearrangement

of the endogenous DNA around the integrated transgene [15]. In practice, however, these effects are not registered. It should be emphasized that the appearance of GM crops on the market is preceded by a variety of large-scale tests.

Key words: transgenic food, genetically modified organisms, GMO

Введение. Растения с полезными потребительскими характеристиками выводятся тысячи лет с помощью обычных методов селекции. Желательные характеристики с/х культур выбираются, комбинируются и размножаются посредством повторного полового кроссинговера совместимых в этом отношении видов (подвидов) в течение множества поколений. Как правило, требуется не менее 15 лет, чтобы получить новую разновидность (сорт) [26]. Генная инженерия позволяет не только резко ускорить процесс, но и сделать его высоко целенаправленным путем введения небольшого количества соответствующих генов. Она позволяет также преодолеть барьер половой несовместимости между видами растений и значительно увеличить размер имеющегося генофонда [26].

Распространенный, хотя и не вполне научный термин *трансгенные* (ГМ) применяется в отношении тех организмов (в данном контексте, растений), у которых геномы модифицированы с использованием рекомбинантных ДНК-технологий. Они могут экспрессировать гены, не входящие в геном данного растения, или модифицированные эндогенные гены. Функция (белок), кодируемая таким геном, придает растению определенный признак, способствующий его выживанию или повышению продуктивности. Учитывая быстрое развитие технологий манипуляций с генетическим материалом, термин *трансгенные* в научной литературе принято использовать в отношении тех растений, в геномы которых была внесена экзогенная информация, полученная от неродственных часто весьма удаленных видов, в отличие от *сингенных* растений, полученных в результате внутривидового переноса аллелей соответствующих генов или в пределах близкородственных видов, обладающих половой совместимостью. Наконец, для получения *интрагенных* растений перенос гена(ов) вообще не требуется, их собственная наследственная информация лишь определенным об-

разом модифицируется. С помощью генно-инженерных технологий можно повысить сопротивляемость растений к абиотическим (засуха, экстремальные температуры, высокая соленость почвы) и биотическим (насекомые, болезнетворные микроорганизмы) стрессам, которые причиняют огромный ущерб сельскому хозяйству, а также повысить продуктивность и питательную ценность сельхозкультур. Согласно осторожным оценкам FAO, себестоимость производства ГМ-культур как минимум на 20 % ниже обычных. Именно это определяет повсеместное быстрое их распространение: в 23 странах мира в течение 20 лет ежегодный прирост площадей биотехнологических зерновых составлял примерно 12 % [6]. Основными зерновыми ГМ-культурами являются соя и кукуруза, хотя выращивание ГМ-сортов хлопка, рапса и риса также резко увеличилось. Любопытно, что площади под генетически модифицированными культурами в ЕС составляют лишь несколько тыс. га (0,03 % мирового производства), что является, вероятно, отражением европейской оппозиция этой технологии. В то же время значительная часть комбикормов, используемых в Европе, производится из импортного растительного материала и содержит ГМ-продукты. В отличие от Европы в США отсутствуют ограничения к применению ГМ-растений по крайней мере в качестве корма для животных. Аналогичным образом технические ГМ-растения, например, хлопок, широко используются в легкой и других отраслях промышленности. Новые поколения ГМ-культур разрабатывается для производства рекомбинантных медикаментов, таких как моноклональные антитела, вакцины, а также пластмасс и биотоплива.

Генетическая модификация растений

В настоящее время в качестве вектора для переноса рекомбинантной ДНК в растительную клетку наиболее часто используется бактерия *Agrobacteriumtumefaciens*, обладающая естественной способностью переносить участки ДНК в растительный геном, и «генная пушка», которая ‘’стреляет’’ наночастицами золота, покрытыми рекомбинантными фрагментами ДНК. Далее отдельные растительные клетки, содержащие модифицированный геном, выращиваются в зрелые генетически модифицированные растения с использованием техники культуры тканей. Три аспекта этой технологии несут возможные риски в

отношении здоровья человека: использование селективных маркеров для идентификации трансформированных клеток; перенос избыточной чужеродной ДНК в растительный геном; возможное увеличения мутаций в ГМ-растениях по сравнению с природными культурами.

Действительно, для дискриминации ГМ-продуктов в процессе котрансформации вместе с интересующим геном часто используют селективные маркерные гены, которые обеспечивают устойчивость к антибиотикам (например, канамицин, который убивает нормальные клетки не-ГМ-растений). По мнению оппонентов, это повышает риск распространения антибиотикорезистентности в бактериальной популяции в почве или в кишечнике человека при употреблении ГМ-продуктов. Не следует, однако, забывать, что гены резистентности к АБ были первоначально изолированы из почвенных бактерий, широко распространенных в природе. Кроме того, канамицин вообще имеет статус GRAS (GenerallyRegardedAsSafe, т. е. безопасный) и уже более 20 лет используется в животноводстве без каких-либо известных проблем. Исследования показали, что вероятность передачи резистентности к АБ от растений бактериям чрезвычайно низка, а возможный вследствие такого переноса риск представляется в худшем случае незначительным [9]. Получение селективных маркеров, не использующих устойчивость к АБ, а также процедуры, удаляющие маркер из растительного генома по завершении трансформации, практически полностью снимают опасения данного рода [10].

Вторая связанная с ГМ-технологиями проблема – перенос в геном растения ненужной, избыточной ДНК в ходе процесса трансформации – также была успешно решена: была разработана минимальная генная кассета, в которой размещается лишь строго определенный фрагмент ДНК [8].

Наконец, третья проблема связана с возможным повышением уровня естественных мутаций в результате снижения стабильности генома, что может вызвать те или иные нежелательные последствия. В принципе в процессе культивирования тканей могут появляться так называемые сомоклональные вариации, возможна и реаранжировка эндогенной ДНК вокруг интегрированного трансгена [15]. На практике, однако, эти явления не зарегистрированы. Следует подчеркнуть, что

появлению на рынке ГМ-культур предшествуют разнообразные и масштабные испытания.

Применение ГМ-растений

Сегодня в мире около 1 млрд. человек хронически недоедают, потребляя менее 8000 кДж/день (2000 ккал/день). Примерно 1,3 млрд. человек живет менее чем на 1 долл. США в день и не имеет доступа к безопасной еде. Многие из них занимаются сельским хозяйством для их собственного существования и полностью зависят от него. Как правило, эти люди не могут позволить себе ирригацию своих культур, обработку их гербицидами или пестицидами, что приводит к низким урожаям и высокой их пораженностью вредителями. Кроме того, по прогнозам, население планеты удвоится в течение следующих 40–50 лет, причем более 95 % из них родится в развивающихся странах. Таким образом, для решения продовольственной проблемы в глобальных масштабах производство продуктов питания необходимо увеличить, по крайней мере, на те же 40–50 % причем в условиях сокращения площади плодородных земель и водных ресурсов. ГМ-технологии являются одним из наиболее эффективных способов решения продовольственной проблемы через резкое повышение урожайности с/х культур или увеличение содержания в них питательных веществ.

Повышение питательной ценности пищевых продуктов

Известно, что в обеспеченных странах мира питательная ценность пищи соответствует потребностям вследствие высокого разнообразия потребляемых продуктов питания. В развивающихся странах зачастую один (зерновой) продукт доминирует в рационе, вызывая (особенно у детей) дефицит не только белка, но и разнообразных витаминов. Наиболее широко распространен в развивающихся странах дефицит витамина А, который, по оценкам, приводит к гибели примерно 2 млн детей в год. Он же является ведущей причиной слепоты у детей. Организм человека может синтезировать витамин А из предшественника β-каротина, широко распространенного в растительном царстве, но отсутствующего в зерновых культурах. ГМ-технологии позволяют решить некоторые из этих проблем. Показательным примером потенциала этой технологии является проект «Золотой рис». Стратегия проекта заключалась во внедрении в геном риса ряда последовательных

метаболических этапов, обеспечивающих синтез β-каротина. В 2000 г. Ye и соавт. сконструировали рис, содержащий умеренный уровень β-каротина [33]. Через несколько лет появился улучшенный вариант «Золотой рис 2» [18]. Подсчитано, что 72 г сухой крупы «Золотой рис 2» обеспечивает 50 % рекомендуемой суточной нормы витамина А для 1–3-летнего ребенка. Проект «Золотой рис» является прекрасным примером использования биотехнологий для решения сложных задач.

Биотехнологии и повышение продуктивности земледелия

Урожайность с/х культур, полученных средствами классической селекции, под действием патогенных микроорганизмов, паразитов и насекомых по всему миру постепенно снижается. Для сохранения и повышения урожайности чрезвычайно важно повысить сопротивляемость культур к воздействию паразитов и патогенов. Одним из успешных примеров является устойчивая к насекомым кукуруза, экспрессирующая *bt* ген (из бактерии *Bacillusthuringiensis*). В США этой культурой засеяна площадь в 10,6 млн га, что составляет 35 % всех площадей, занятых в стране кукурузой. Однако основной причиной снижения продуктивности земледелия является абиотический стресс, особенно засоленность почвы, засуха и резкие перепады температуры. Ожидается, что засаливание почвы и засухи приведут к резкому сокращению пахотных земель к 2050 г. Проводящиеся в настоящее время исследования могут помочь решить эту проблему.

Безопасны ли ГМ-продукты?

Использование ГМ-культур регулируется несколькими правительственными органами. Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (EFSA, EuropeanFoodSafetyAuthority) и отдельные государства ЕС приняли подробные требования для полной оценки риска, связанного с применением ГМ-растений и произведенными из них пищевыми продуктами, и кормами для животных. Несколько федеральных агентств (FDA, FoodandDrugAgency и другие) принимают участие в разрешении использования ГМ-культур. Это означает, что ГМ-растения должны пройти тщательную проверку на безопасность до их коммерческого применения. Аналогичные правительственные органы имеются и в других странах. Наконец, при ООН существует Организация по питанию и сельскому хозяйству (FAO), занимающаяся изучением этих

вопросов. Авторитетные научные сообщества (Академии Наук США, Китая, РФ) выступили с однозначным заявлением о безопасности применения ГМ-продуктов. Не удивительно, что Еврокомиссия разрешила доступ на рынки ЕС 19 новых генетически модифицированных продуктов.

Продукты, полученные из генетически модифицированных сельскохозяйственных культур, употребляют сотни миллионов людей по всему миру в течение двух десятилетий. Тот же «Золотой рис 2» ежедневно употребляют от 0,3 до 1 млрд. человек. За все время использования ГМ-продуктов не было сообщений о каких-либо неблагоприятных для здоровья человека последствий.

Строгие научные исследования также не обнаружили токсичности ГМ-культур. Единственное исключение было опубликовано в 1999 г. Авторы утверждали, что у крыс, которых кормили рекомбинантными томатами, развилось поражение слизистой кишечника [4]. Однако вскоре Королевское общество заявило, что исследование «является ошибочным по многим аспектам дизайна, выполнения и анализа» и что «никакие выводы не должны быть взяты из него». Например, авторы использовали слишком мало животных в эксперименте, чтобы получить статистически значимый результат.

Имеются ли априорные основания полагать, что ГМ-культуры могут быть вредными для потребителей? На самом деле наличие чужеродных последовательностей ДНК в пищевых продуктах не несет никаких рисков для здоровья человека. И это понятно, ведь любые продукты, которые человек употребляет в пищу в течение всей жизни и всего периода эволюции содержат значительные количества гетерогенных нуклеиновых кислот из разных источников, которые потребляются в диапазоне от 0,1 до 1,0 г в день. Существует потенциальная возможность того, что белковый продукт трансгена может быть токсичным, если трансген кодирует токсин. Такая потенциальная токсичность белка является важным компонентом оценки безопасности, которая должна быть выполнена до внедрения новой ГМ-культуры.

Аллергенность ГМ-продуктов, в отличие от токсичности, в принципе вполне возможна [15]. Тем более что аллергия на природные растительные продукты широко распространена. Для оценки риска

появления аллергических реакций в результате применения трансгенной культуры используются различные тесты, включая модельные эксперименты на животных. Известны примеры запрета таких культур по причине аллергенности [20]. Любопытно, что те же ГМ-технологии можно использовать для идентификации и удаления аллергена из продукта [11]. Однако основной причиной аллергии в современном мире является широкое применение в земледелии минеральных удобрений, стимуляторов роста и разнообразных средств защиты растений. Эти сложные органические вещества часто содержат атомы ртути, галогенов, нитро- и сульфгидридные группы, что делает их высоко токсичными и для человека. Для борьбы с поступающими с пищей подобными ксенобиотиками организму приходится активировать все гомеостатические системы, в том числе иммунную, что и приводит к пищевой аллергии. ГМ-культуры, напротив, по определению гораздо более устойчивы к вредителям и недостатку питательных веществ в почве, что позволяет ограничить применение удобрений и пестицидов, а то и вовсе от них отказаться, что снижает вероятность возникновения аллергических реакций на произведенные в таких условиях продукты питания.

Непищевое применение ГМ-растений

Широчайшие потенциальные возможности генно-инженерных технологий находят свое применение не только в сельском хозяйстве и пищевой промышленности, но и за их пределами, например, в лесном хозяйстве, в производстве бумаги и биотоплива. В области медицины главным направлением является конструирование ГМ-растений, способных продуцировать рекомбинантные фармпрепараты. Первый такой препарат, человеческий сывороточный альбумин, был получен еще в 1990 г. [25]. С тех пор список таких продуктов включает антитела, компоненты крови, гормоны, вакцины и др. [28]. Некоторые из них уже достигли стадии коммерческого применения (например, инсулин, рекомбинантный человеческий врожденный фактор, используемый при дефиците витамина B_{12}), другие – только готовятся к этому. К тому же использование ГМ-растений в качестве платформы для получения различных фармпрепаратов имеет весомые преимущества перед традиционными биогенетическими технологиями, поскольку дает воз-

можность получать сложные мультимерные белки, такие как антитела, которые невозможно получить в микробных системах, причем в любых количествах и по очень низкой цене, что особенно важно для развивающихся стран. Например, производимая в настоящее время ГМ-дрожжами вакцина против гепатита В не может удовлетворить потребности ни по количеству, ни по цене [3]. А вот годовой урожай продуцирующих анти-ГВ вакцину ГМ-томатов с 250 акров парников может полностью удовлетворить потребности в вакцине всей Ю.-В. Азии [3, 14]. Еще одно важное преимуществом растительной ГМ-фармацевтики – переход от приема традиционных лекарственных форм к потреблению пищи, содержащей необходимые препараты.

ГМ-растения и окружающая среда

Любое нежелательное воздействие на окружающую среду в результате масштабного применения ГМ-растений может косвенно воздействовать на человека. Предполагаются следующие потенциальные риски воздействия на природу:

– ГМ-растения могут образовывать половые гибриды с дикими растениями через их опыление ГМ-пыльцой;

– ГМ-растения могут сами распространяться неконтролируемым образом;

– условия, необходимые для роста ГМ-растений, могут локально воздействовать на природные сообщества.

Существует теоретическая возможность неконтролируемой дисперсии ГМ-культур посредством семян или опыления ГМ-пыльцой диких растений. К этому же результату могут привести и неадекватный дизайн процедуры получения ГМ-культуры и ошибки при ее проведении. В 2001 г. появилось сообщение, что трансгены из ГМ-кукурузы перекрестно опыляются с дикой кукурузой, произрастающей в Мексике [21]. Дальнейшие исследования не смогли подтвердить распространения трансгенов в дикой природе Мексики [17]. В 2002 г. компания *Prodigene* была оштрафована за нарушение биобезопасности, когда ГМ-кукуруза была найдена в урожае сои, предназначенном для потребления людьми [7]. Одним из последствий этого стало предложение ограничить молекулярное земледелие непищевыми культурами, такими как табак. В литературе можно найти еще несколько пу-

бликаций, авторы которых обнаруживали токсическое воздействие ГМ-растений (в основном *Bt* кукурузы) на те или иные виды животных, однако последующие тщательные исследования дезавуировали эти утверждения. Чрезвычайно сомнительной кажется также возможность диссеминации в дикой природе трансгенных растений при их широком культивировании, поскольку встроенные гены не дают селективных преимуществ гибриду и, следовательно, не поддерживаются естественным отбором. Любому селекционеру хорошо известно, что без соблюдения ряда правил прицельно выведенные полезные свойства гибридных сортов со временем теряются. Следует, однако, признать, что оценить воздействие (особенно отдаленные эффекты) ГМ-культур на окружающую дикую природу чрезвычайно трудно.

Если неблагоприятный эффект на дикую природу со стороны ГМ-растений представляется лишь гипотетически возможным, то позитивная роль для окружающей среды вполне реальна. Так, уже сконструированы растения, способные удалять различного рода контаминанты (соли тяжелых металлов, летучие соединения) из почвы и воздуха [1]. Такая фитореабилитация позволяет не только очищать почву и атмосферу от загрязняющих веществ, но и может в будущем послужить сырьевой базой извлечение этих веществ.

Перенос генов в окружающую среду

Перенос рекомбинантных генов в окружающую среду, хотя и не несет катастрофических последствий, но нежелателен. Важно отметить, что речь идет лишь о тех ГМ-культурах, которые используются в промышленности и фармацевтике. Возможны две стратегии, ограничивающие нежелательное распространение ГМ-культур: физическое разграничение и генетические манипуляции. Первое предусматривает изоляцию выращиваемых культур, недопущение перекрестного опыления, тщательное удаление остатков семян после сбора урожая и т.п. Генетические манипуляции направлены на ограничение переноса пыльцы, что влияет на фертильность и образование семян (GURTS, GeneticUseRestrictionTechnologies) [16]. Другая генетическая стратегия предусматривает встраивание чужеродных генов в геном хлоропластов, поскольку у очень многих растений хлоропласты наследуются по материнской линии и не содержатся в пыльце.

Как отмечается в докладе Генерального Директората Европейской комиссии по науке и информации: «Главный вывод, вытекающий из усилий более чем 130 научно-исследовательских проектов, охватывающих 25 лет исследований и проведённых с участием более чем 500 независимых исследовательских групп, состоит в том, что биотехнологии и, в частности, ГМО как таковые не более опасны, чем, например, традиционные технологии селекции растений». Можно не сомневаться, что строгие научные аргументы заставят общество преодолеть иррациональные фобии для своего же блага.

Интра- и цисгенез

В настоящее время для многих видов растений, в том числе основных зерновых культур, таких как рис, соевые бобы, кукуруза, хлопок, рапс, картофель, маниока, папайя, арахис, масличные культуры, многочисленные овощи и плоды получены ГМ-сорта. Массовое внедрение трансгенных культур в с/х, а их продуктов в пищевой рацион человека вызвали опасения общества по поводу их безопасности и воздействия на здоровье и окружающую среду. Эти опасения связаны с двумя основными моментами трансгенной технологии: встраивание в геном растений экзогенных генов других видов (бактерий, насекомых), включая маркерные гены, пограничные и связующие последовательности, и случайный характер сайтов вставки, что может иметь непредсказуемый побочный эффект.

Недавний прогресс в области генных технологий привел к появлению пулов множества аллелей/генов близкородственных видов растений, способных к перекрестному опылению, т. е. обладающих половой совместимостью. Такие гены принято называть цисгенами. Увеличение числа цисгенов и разработанные новые протоколы трансформации, исключающие использование маркерных генов, позволили перейти к модификации геномов растений, без переноса экзогенных чужеродных генов и, не меняя расположение генов в хромосоме. Этот новый подход получения ГМ-культур получил название цисгенез [23]. А цисгенные растения определяются как «растения, модифицированные одним или несколькими генами, выделенными из перекрестно совместимого растения-донора». С научной точки зрения, цисгенез описывается как специфические аллели/гены пула генов, встроенные в геном новой разновидности без дополнительных связующих после-

довательностей. Напротив, трансгенные растения получают ген(ы) от нерастительных организмов или от растения-донора, не имеющего половой совместимости с растением-реципиентом [5]. Например, введение гена *R1*, первого гена устойчивости к поздней гнили, от дикого типа картофеля (*Solanumdemissum*) в геном культурного картофеля (*S.tuberosum*) является цисгенезом, в то время как перенос гена *Bt* от бактерий *Bacillus thuringiensis* в геном хлопка с целью выработки устойчивости к вредителям является типичным трансгенезом.

Предполагается, что цисгенные растения будут более приемлемыми для общественности, нежели трансгенные растения. По данным опроса, проведенного в США, 55–77 % участников готовы употреблять цисгенные овощи (в зависимости от количества и источника генов), в то время как только 17–25 % из них будут есть овощи, содержащие гены микроорганизмов или животного. В другом опросе в Миссисипи, 81 % респондентов утверждает, что они будут есть цисгенные овощи, но только 14–23 % из них готовы употреблять трансгенные овощи, содержащие гены из нерастительных источников [31]. В ЕС, как ожидается, цисгенные растения также будут более приемлемыми для потребителей [13].

Еще одним новым инструментом биотехнологий стал интрагенез, т. е. манипуляции с собственными генами растения. Возможности этой технологии также впечатляют. Лишь один пример. Группа американских и китайских исследователей, изучая томаты установила, что размер меристемы растения, а, следовательно, и плодов контролируется генами WUS и CLV. Рецептор последнего, CLV1, связывается с лигандом CLV3, состоящим из пептида и сахара арабинозы. Контроль размера меристемы/плода возможен лишь при полном арабинозилировании CLV3. Появление мутаций в гене арабинозилтрансферазы приводит к гигантизму этих частей растений. В результате получены плоды томатов размеров в среднюю дыню [32]. Поскольку подобные системы генов существуют и у других растений, открываются огромные возможности для увеличения урожайности и других культур.

Цисгенез резко повышает эффективность использования избранных аллелей

Главной проблемой при выведении новых сортов растений является низкое сродство между диким и культивируемым сортами, поэтому в традиционной селекции для получения желаемых характери-

стик необходимо применять весьма сложные методы, позволяющие преодолеть указанное препятствие. При этом выведение нового сорта растягивается на годы и даже десятилетия. К примеру, Hermsen и Ramanna [12] понадобилось 30 лет для выведения с помощью приемов традиционной селекции устойчивого к поздней гнили сорта картофеля “Biogold”. В наше время vanderVossen и др. [29, 30], применив технологию цисгенеза, успешно клонировали, и представили три новых сорта устойчивого к вредителю культурного картофеля в течение всего лишь нескольких лет.

Еще одним препятствием в традиционной селекции является связь генов, определяющих желаемые и нежелаемые характеристики растений. Проблема усугубляется для культур с длительным периодом генерации, а также тем, что для длительной устойчивости необходимо накопление нескольких генов из разных источников. Примером является разведение яблок, устойчивых к парше (*Venturiainaequalis*). Внедрение гена устойчивости к парше *Vf* от *Malusfloribunda* 821 в товарные яблочные культуры высокого качества началось в 50-х годах и продолжалось более 50 лет. Использование цисгенеза позволяет выполнить эту работу за 2–3 года.

Новые технологии повышают возможности цисгенеза в использовании генетических ресурсов

Узким местом в современной селекции растений является ограниченная генетическая вариабельность любых видов культур, так как в процессе селекции растений отбираются только лучшие генотипы с резко сниженной генетической вариабельностью [27]. Такие ограничения генетических вариаций культур являются серьезной проблемой, поскольку это может привести к большим потерям урожайности и качества продукции при появлении нового патогена или в случаях необычных абиотических стрессов. Внедрение новых аллелей из природного генетического пула, которые придают устойчивость к возбудителю, позволяют уменьшить эту генетическую уязвимость [2]. Массовое сиквенирование растительных геномов, начатое в 1995 г., позволило создать огромный пул доступных для манипуляций генов, ассоциированных с экономически важными характеристиками растений [19], а изобретение новых технологий выделения и клонирования генов спо-

собствуют повышению генетической вариабельности в том числе за счет неродственных видов.

Почему так важно различать цисгенные и трансгенные растения?

Получение генетически модифицированых растений в настоящее время регулируется для предотвращения каких-либо негативных последствий для окружающей среды или здоровья человека. Эти правила ориентированы исключительно на трансгенные организмы и не различают трансгенных растений от цисгенных. Это означает, что ГМ-правила для трансгенов (генов от неродственных видов), также применяются для цисгенов (гены от близких видов). Однако цисгенез гораздо больше, чем трансгенез похож на традиционное селекционирование растений. Хотя обе технологии используют те же самые методы генетической модификации для внедрения гена(ов) в растительный геном, при цисгенезе вводят только гены того же вида или близкородственных видов, причем эти гены могут быть также перенесены традиционными методами селекции. Таким образом, цисгенез не отличается от традиционной селекции. Нечто подобное происходит и в природе. Это означает, что цисгенные растения не создают какого-либо риска ни для окружающей среды, ни для человека.

К сожалению, действующие международные правила регулирования ГМО по-прежнему не отличают цисгенные растения от трансгенных, что серьезно затрудняет их использование. Лишь в нескольких странах (Канада, Австралия) система регулирования основана на продукте, а не процессе его получения, что дает юридическую возможность контролировать цисгенные растения менее строго, чем трансгенные. В Австралии, например, как указано в Положении о регулировании генных технологий, «мутантный организм, в котором мутационный событие не включает введение любой экзогенной нуклеиновой кислоты» не классифицируется как ГМО [22]. Приближается к этому пониманию и ЕС: согласно докладу комиссии по безопасности пищевых продуктов (EFSA) опасности, возникающие в результате цисгенеза, аналогичны таковым при традиционной селекции [5].

В Украине Закон № 1103–V, 2007 определяет генетически модифицированный организм (ГМО) как «любой живой измененный организм, в котором генетический материал был изменен при помощи

искусственных приемов переноса генов, которые не происходят в природных условиях». Такая редакция Закона не только резко сужает возможности отечественных селекционеров использовать весь современный арсенал биотехнологических приемов, включая интрагенез и цисгенез, но и ограничивает, точнее, запрещает использование в пищевых и не только целях полученные при помощи этих технологий ГМ-продукты. Помимо этого, в Украине до сих пор отсутствует Реестр ГМ-растений, а значит зарегистрированных (разрешенных) ГМ-культур нет. Отсутствует также нормативная база по проведению контроля пищевых продуктов и сырья на предмет наличия чужеродных/модифицированных генов. В то же время имеется сеть адекватно оснащенных лабораторий, способных выполнять необходимые исследования. Так, в Сумской области эту работу осуществляет лаборатория, аттестованная в соответствии с требованиями ISO/ISE17025:2006. Все исследования проводятся исключительно в инициативном порядке и за счет заказчика. Ассортимент и объем исследований небольшой: в основном определяется наличие последовательностей 35S FMV и терминатора NOS. Кроме рапса контролируется также наличие и содержание ГМ-сои и кукурузы. За 2012–2014 гг. был проведен анализ свыше 4500 образцов, включая 1560 образцов кукурузы, 342 – рапса, 183 – сои. Качественный анализ показал наличие чужеродного генетического материала в 41 пробе. При количественном анализе в 10 пробах (в основном сои) была обнаружена гетерологичная ДНК.

Литература

1. Banuelos G., Leduc D.L., Pilon-Smits E.A.H., Terry N. Transgenic Indian mustard overexpressing selenocysteinelyase or seloncystienemethyltransferase exhibit enhanced potential for selenium phytoremediation under field conditions. *EnvironSciTech*. 2007; 41:599–605.
2. Cox T.S., Wood D. The nature and role of crop biodiversity. In *Agrobiodiversity: Characterization, Utilization, and Management*, eds D. Wood and J.M. Lenne. Wallingford, UK: CABI Publishing, 1999: 35–57.
3. EMBO Reports. Molecular farming for new drugs and vaccines. *EMBO Reports.* 2005;6:593–9.

4. Ewen S.W.B., Pusztai A. Effects of diets containing genetically modified potatoes expressing *GalanthusNivalis* lectin on rat small intestine.*Lancet*. 1999; 354:1353–4.
5. European Food Safety Authority. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA J*. 2012; 10:2561.
6. Executive summary of Global Status of Commercialised Biotech/GM crops: 2007. *ISAAA Briefs No. 37*. Ithaca, NY ISAAA, 2007.
7. Fox J.L. Puzzling industry response to Prodigene fiasco. *NatBiotech*. 2003;21:3–4.
8. Fu X.D., Duc L.T., Fontana S. et al. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number GM plants with simple integration patterns. *TransgenicRes*. 2000;9:11–19.
9. Gay P.B., Gillespie S.H. Antibiotic resistance markers in genetically modified plants; a risk to human health. *LancetInfectDis*. 2005;5:637–646.
10. Hare P.D., Chua N.H. Excision of selectable marker genes from GM plants. *NatBiotech*. 2002;20:575–580.
11. Herman E. Soybean allergenicity and suppression of the immunodominant allergen. *CropSci*. 2005;45:462–467.
12. Hermsen J.G., Ramanna M.S. Double bridge hybrids of Solanumbulbocastanum and cultivars of Solanumtuberosum. *Euphytica*. 1973;2:457–466. doi: 10.1007/BF00036641.
13. Herzog, U. Cisgenesis: A Report on the Practical Consequences of the Application of Novel Techniques in Plant Breeding, 2012. Available at: http://bmg.gv.at/cms/home/attachments/6/6/0/CH1052/CMS1352183689337/cisgenesis_20121105.pdf.
14. Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M. et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASED J*. 1999;13:1796–1799.
15. Latham J.R., Wilson A.K., Steinbrecher R.A. The mutational consequences of plant transformation. *J BiomedBiotech*. 2006;1–7: Article ID 25376.
16. Mascia P.N., Flovell R.B. Safe and acceptable strategies for producing foreign materials in plants. *CurrOpinPlantBiol*. 2004;7:189–195.
17. Ortiz-Garcia S., Ezcurra E., Schoel B., Acevedo F., Soberon J., Snow A.A. Absence of detectable transgenes in local landacres of maize in Oaxaca, Mexico (2003–2004). *ProcNatlAcadSci USA.* 2005;102:12338–12343.
18. Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, et al. Improving the nutritional content of Golden Rice through increased provitamin A content. *NatBiotechnol*. 2005;23:482–487.
19. Pereira,A.Atransgenic perspective on plant functional genomics. *TransgenicRes*. 2000;9:245–260. doi: 10.1023/A:1008967916498.

20. Prescott V.E., Campbell P.M., Moore A. et al. Transgenic expression of bean α-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. *J AgricFoodChem*. 2005;53:9023–9030.
21. Quist D., Chapela J.H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*. 2001;414:541–543.
22. Russell A.W., Sparrow R. The case for regulating intragenic GMOs. *J. Agr. Environ. Ethic*. 2008;21:153–181. doi: 10.1007/s10806-007-9074-5.
23. Schouten H.J., Krens F.A., Jacobsen E. Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nat. Biotech*. 2006; 24:753–753. doi: 10.1038/nbt0706-753.
24. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA J.* 2012;10:2561.
25. Sijmons P.C., Dekker B.M., Schranmeijer B., Verwoerd T.C., van den Elzen P.J., Hoekema A. Production of correctly processed human serum albumin in GM plants. *Biotechnology*. 1990;8:217–221.
26. Southgate E.M., Davey M.R., Power J.B., Merchant R. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnol. Adv*. 1995;13:631–657.
27. Tanksley S.D., McCouch S.R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*. 1997;277:1063–1066. doi: 10.1126/science.277.5329.1063.
28. Twyman R.M., Schillberg S., Fischer R. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert OpinEmerg Drugs*. 2005;10:185–218.
29. van der Vossen E.A., Gros J., Sikkema A. et al. The Rpi2blb2 gene from Solanumbulbocastanum is an Mi21 gene homolog conferring broad spectrum late blight resistance in potato. *Plant J*. 2005;44:208–222. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02527.x.
30. van der Vossen E. A., Sikkema, A., Hekkert B. et al. An ancient R gene from the wild potato species Solanumbulbocastanum confers broad spectrum resistance to Phytophthorainfestans in cultivated potato and tomato. *Plant J*. 2003; 36:867–869. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01934.x.
31. Viswanath V., Strauss S.H. Modifying plant growth the cisgenic way. *Inform. Syst. Biotechnol*. *News Rep*. 2010;1–4.
32. Xu C., Liberatore K.L., MacAlister C.A. et al. A cascade of
arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics*. 2015; doi:10.1038/ng.3309.
33. Ye X.D., Al-Babili S., Kloti A. et al. Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*. 2000;287:303–305.

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ СУХОЙ ПШЕНИЧНОЙ КЛЕЙКОВИНЫ ДЛЯ ПРОДУКТОВ ЛЕЧЕБНОГО И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

Чумикина Л.В.[1], Колпакова В.В.[2], Арабова, Л.И.[1], Топунов А.Ф.[1]

[1]Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов, п. Красково, Московская обл., Россия
chumikina@mail.ru

Резюме

Предложено использование модифицированных белков сухой пшеничной клейковины, полученных в результате ферментативного гидролиза, в качестве ингредиентов при производстве пищевых продуктов, предназначенных для лечебного и функционального питания. Разработан процесс ферментативного гидролиза сухой пшеничной клейковины экзо- и эндопротеиназными препаратами. Установлено, что изменением времени гидролиза можно регулировать функциональные свойства клейковины, являющиеся определяющими показателями для продуктов питания.

Ключевые слова: функциональные свойства, клейковина, протеолитические ферменты, ферментативный гидролиз.

MODIFICATION OF DRY WHEAT GLUTEN PROTEINS IN PRODUCTS FOR CLINICAL AND FUNCTIONAL NUTRITION

Chumikina L.V.[1], Kolpakova V.V.[2], Arabova L.I.[1], Topunov A.F.[1]

[1]Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
[2]Department of Technology of Sugary Products, All-Russian Research Institute of Starch Products, Moscow region, Kraskovo, Russian Federation
chumikina@mail.ru

Abstract

The use of modified dry wheat gluten proteins obtained as the result of enzymatic hydrolysis as an ingredient for the manufacture of food products for clinical and functional nutrition was proposed. The process of enzymatic hydrolysis of dry wheat gluten of different quality with exo- and endoproteinase preparations was for the first time developed. It was shown that changing of the hydrolysis time could regulate the functional properties of gluten, which are the determining parameters for food products.

Key words: functional properties, gluten, proteolytic enzymes, enzymatic hydrolysis.

Введение. Здоровье человека непосредственно связано с пищей, которой он ежедневно употребляет. Еще Гиппократ в V веке до н.э. писал: «Пусть ваша еда будет для вас лекарством, а лекарство – едой», а формула «Здоровье есть функция питания» является базовой для современной пищевой науки. Под термином «функциональное питание» подразумевается употребление в пищу таких продуктов естественного происхождения, которые оказывают позитивное регулирующее воздействие на определенные системы и органы организма или на их функции. Они способствуют укреплению здоровья, поддерживают естественное равновесие в организме и активируют внутренние защитные силы организма.

Исследования сотрудников РАМН показали, что в настоящее время потребляемые россиянами продукты питания не удовлетворяют потребностям человека, вследствие чего возрастает общая заболеваемость, снижается работоспособность, значительно сокращается продолжительность жизни и численность населения РФ.

Поэтому актуальным является создание новых технологий и ассортимента функциональных продуктов питания, обогащенных пищевыми ингредиентами, в роли которых рекомендуется использовать белки, пищевые волокна, витамины, пищевые добавки натурального происхождения им т.д. Использование растительных белковых препаратов обусловлено их функциональными свойствами, под которыми понимают поведение белков в пищевых системах: способность поглощать и удерживать воду, жир, образовывать эмульсии, пену, гели, играть роль

связывающих агентов и т.д. Эти препараты могут улучшать технологические показатели, замедлять дефицитное дорогостоящее сырье и обогащать белками продукты питания.

Белки являются одним из главных и обязательных компонентов здорового и полноценного питания. Поэтому необходимо внедрение белковых препаратов из растительного сырья в технологические процессы производства пищевых продуктов, поскольку белки животного происхождения часто являются дорогостоящими ингредиентами. Здоровье человека непосредственно связано с количеством белков в пище, с его аминокислотным составом, перевариваемостью и усвояемостью.

Дефицит белка в питании и его особенная роль в технологических процессах и в составе пищевых продуктов требует разработки новых форм и модификации уже известных, традиционных, к которым относится сухая пшеничная клейковина (СПК). Хотя СПК довольно широко применяется в производстве хлеба в качестве улучшителя свойств муки, области ее использования могут быть расширены за счет модификации ее белков.

Ферментативное расщепление белкового комплекса СПК, биохимические характеристики гидролизатов и их функциональные свойства, определяющие возможность использования препарата в различных пищевых продуктах, изучены недостаточно. В литературе отсутствуют сведения о физико-химических свойствах белковых гидролизатов СПК разного качества, полученных с различными видами протеиназ, с одновременным анализом их функциональных свойств. Такие данные необходимы для эффективного применения и расширения направлений использования СПК в различных отраслях пищевой промышленности.

Известно, что при переработке муки различного качества добавляют примерно 2% СПК. Однако добавление к муке только одной СПК не решает другой важнейшей задачи – обогащение хлебопродуктов такими важными веществами, как сбалансированные незаменимые аминокислоты. Поэтому должны быть востребованы другие подходы к использованию данного белкового продукта, например, ферментативная модификация СПК.

Целью работы было изучение биохимического процесса модификации СПК разного качества с ограниченной степенью протеолиза,

предназначенной для использования в качестве улучшителя и для обогащения хлеба белком с улучшенным аминокислотным составом.

Методы исследования. В качестве материала использовались 11 образцов СПК разного качества, полученных с предприятия – «БМ» (Казахстан), имеющих сертификаты качества, эндопротеиназные ферментные препараты Neutrase 1,5 MG, Protamex и экзопротеиназа Flavourzyme 500 MG (Novozymes, Дания) с величиной активности 105, 125, 85 Е/г, соответственно, мука пшеничная хлебопекарная высшего сорта - ГОСТ Р 52189-2003.

Массовую долю влаги в препаратах определяли по ГОСТ 9793-74, массовую долю общего белка - по методу Кьельдаля на анализаторе белка/азота (BUCHI K-424) (Швейцария), растворимого – методом Лоури, содержание аминного азота - методом формольного титрования. Протеолитическую активность определяли по методу Ансона в модификации [7]. Степень гидролиза измеряли в % по отношению к общему количеству аминного азота при полном гидролизе белка с 6 н HCl [5]. Полипептидный состав белков исследовали методов электрофореза в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) и градиенте 10-20% ПААГ с додецилсульфатом Na (pH 6,8). Для расчета молекулярных масс белков использовали метчики фирмы «Serva» (ФРГ).

Тесто для хлеба готовили безопарным способом, структурно-механические свойства мякиша хлеба определялись на приборе «Структурометр СТ-1М», показатели качества теста и хлеба оценивались стандартными и общепринятыми методами [6]. Процесс газообразования изучался методом измерения давления водяного столба под влиянием CO_2 (dP/dt). Для обработки результатов использован математический метод 2-факторного планирования эксперимента с программами «Matematica» и «Table Curve».

Результаты и их обсуждение. В нашей работе подобраны оптимальные условия гидролиза СПК разного качества эндопротеазными (Neutrase, Protamex) и экзопротеазным (Flavourzyme) ферментными препаратами, и установлено, что количество аминного азота (по его количеству судили о степени протеолиза), образовавшегося при гидролизе белков СПК, зависит как от ее качества, так и от вида воздействующих на нее протеаз. Чем слабее клейковина, тем больше выделялось

азота под действием экзопротеиназы, и наоборот, чем крепче клейковина, тем более эффективным для нее оказывалось действие эндопротеиназ. Переменными факторами явились концентрация СПК, время гидролиза белков, pH и температура действия ферментов.

Оптимальные параметры гидролиза СПК хорошего качества определяли с применением эндопротеазы Neutrase [2]. Исследования влияния концентрации ФП на содержание аминного азота показало, что чем выше концентрация ФП, тем меньше продолжительность гидролиза СПК, необходимая для эффективного накопления аминного азота. Диапазон данных параметров был использован далее для определения оптимальных параметров гидролиза СПК с другим эндопротеазным препаратом Protamex. Оказалось, что Protamex более эффективен, чем Neutrase, так как практически одинаковое количество аминного азота достигалось за меньшее время.

Степень гидролиза – наиболее объективный критерий этого процесса. Из полученных нами данных следует, что степень гидролиза белков СПК выше с препаратом Protamex, чем Neutrase для крепкой и хорошей СПК, а глубина гидролиза слабой СПК больше с экзопротеазой.

Наиболее эффективные параметры гидролиза (время, концентрация ферментного препарата, температура, pH) уточнены методом электрофореза в ПААГе, определена его глубина, необходимая для достижения определенных молекулярных масс пептидов при использовании их в хлебопечении. Эндопротеиназный препарат Protamex обеспечивал большие различия в молекулярной массе полипептидов гидролизованных белков разного качества, и поэтому его использование будет более целесообразным при проведении ограниченного протеолиза для модификации функциональных свойств пшеничной клейковины.

Для определения роли металла в активности исследуемых нами ферментов было изучено влияние цитрата кальция как активатора. Под влиянием соли кальция структура белковой части фермента стабилизировалась, активность повышалась, далее она оставалась стабильной при окончательно сформировавшейся структур.

Учитывая, что в рационе питания некоторой части населения наблюдается дефицит кальция, то одновременно с остановкой протеолиза на основе гидролизатов СПК возможно создание белковых компо-

зиций, содержащих цитрат кальция. Таким образом, кальций в составе белковой композиции может выполнять одновременно и роль ингибитора протеолиза, и роль минерального вещества, необходимого для лечения и профилактики у человека таких заболеваний, как остеопороз, артериальная гипертензия, разрушение эмали зубов и т.д. Цитрат кальция имеет преимущества по отношению к другим источникам данного металла, он ингибирует образование оксалатов и не образует камни в мочеточниках и почках.

Далее мы изучали физико-химические свойства гидролизованных белков сухой пшеничной клейковины и показали, что гидролизаты клейковины разного качества отличались от исходных белков фракционным составом, агрегирующей способностью, растворимостью и вкладом нековалентных и ковалентных связей в стабилизацию их структуры [1].

Присутствие в одной полипептидной цепи гидрофильных и гидрофобных, полярных и неполярных группировок обеспечивает взаимодействие белков с водой, жиром, углеводами и т.д., что приводит к образованию стабильных дисперсных систем (эмульсии, пены и т.п.) и обеспечению надлежащего качества пищевых изделий. Функциональные свойства белков являются определяющими показателями продуктов питания. Функциональные свойства белковых препаратов оценивали по водосвязывающей (ВВС), жиросвязывающей (ЖСС), пенообразующей (ПОС), жироэмульгирующей (ЖЭС) способности и стабильности пены препаратов, полученных при различном времени гидролиза СПК [4]. Полученные нами данные показали, что чем больше время гидролиза, тем выше у белков способность образовывать пену. Из функциональных свойств в процессе модификации СПК улучшались растворимость и пенообразующие свойства, тогда как водо-, жиросвязывающая и жироэмульгирующая способности понижались.

Таким образом, временем гидролиза можно регулировать функциональные свойства СПК, повышая при этом ее растворимость и ПОС, чтобы использовать СПК в различных отраслях пищевой промышленности, в том числе и для производства диетических продуктов.

Использование гидролизованной СПК для улучшения свойств пшеничной муки и обогащения хлеба белком. Изучение влияния гидроли-

затов на хлебопекарные свойства пшеничной муки высшего сорта осуществлялось с использованием СПК хорошего качества и ФП Protamex как наиболее эффективного для нее при концентрации 1,0; 0,6; 0,3 Е/г белка [3]. Проблема обогащения хлеба белком всегда была взаимосвязана с одновременным улучшением реологических свойств теста в противовес укрепляющему эффекту обогатителя. В нашем случае одновременное присутствие в композитной смеси гидролизата СПК, содержащего цитрат кальция и белковых продуктов, например, белковой муки из амаранта, взятой в количестве 5-25% к массе муки, можно применять для повышения пищевой ценности изделий (рис. 1).

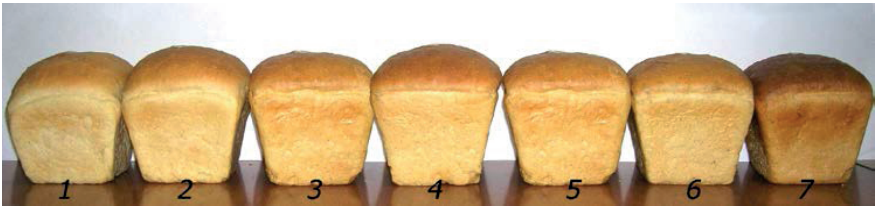


Рисунок 1. *Образцы хлеба с различными композициями гидролизата СПК (0,09%) и амарантовой муки. 1, 7 – контроль; 2-6 – доли амарантовой муки: 2 – 5%; 3 –10%; 4 –15%; 5 – 20%; 6 – 25%*

При добавлении гидролизатов СПК в композиции с белковой мукой из амаранта в количестве до 25% к массе муки содержание белка в хлебе повышалось с 7-8% до 14,7%, скор лизина, треонина и триптофана - до 75-100%. Для больных, например, диабетом, при потреблении белка в сутки 120-140 г, потребность в нем будет удовлетворяться на 30-45%, потребность в Са – на 12,0-24,8% Изделия могут использоваться и для функционального питания.

Заключение. Таким образом, протеолитическое расщепление белков СПК может не только улучшить техно-функциональные свойства, но и повысить ее усвояемость, вследствие чего модифицированная клейковина может использоваться не только как улучшитель, но и как белковая основа для композиций с повышенной пищевой и биологической ценностью при производстве пищевых продуктов различного назначения.

Литература

1. Амонова М.М., Назаров Н.И., Собирова С.К., Бахронова Д.А. Изучение агрегирующей способности сухой пшеничной клейковины // Новый университет. Технические науки. – 2015. – Т.35-36, №1-2. – С.85-89.
2. Колпакова В. В., Чумикина Л. В., Васильев А. В., Арабова Л. И., Топунов А. Ф. Особенности действия эндо- и экзопротеиназных ферментных препаратов на белки пшеничной клейковины // Биотехнология. – 2011. – № 3. – С. 63-73.
3. Колпакова В.В., Васильев А.В., Юдина Т., Чумикина Л.В. Использование ферментативного метода обработки сухой пшеничной клейковины в хлебопечении // Хлебопродукты. – 2008. – №11. – С. 42-43.
4. Колпакова В.В., Чумикина Л.В., Васильев А.В., Фан Куинь Чам., Арабова Л.И., Топунов А.Ф. Функциональные свойства зерновых белков, гидролизованных ферментными препаратами // Известия вузов. Пищевая технология. – 2013. – №1. – С. 47-50.
5. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. – М.: Агропромиздат, 1985. – 255 с.
6. Пучкова Л.И. Лабораторный практикум по технологии хлебопекарного производства. - СПб.: ГИОРД, 2004. - 259 с.
7. Рухлядева А.П., Полыгалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. – Москва.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – С. 288.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С ПРЕДДИАБЕТОМ И ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Милютина-Якушева Д.А., Халепо О.В., Молотков О.В.
ФГБОУ ВО Смоленский государственный медицинский университет Минздравава России, Смоленск, Россия
dasha_cv@mail.ru

Резюме

Проведено исследование микрореологических характеристик эритроцитов, показателей периферической крови, а также параметров транспорта кислорода у пациентов с преддиабетом и впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа. Установлено, что у пациентов исследуемых групп имеются изменения как в состоянии периферического звена эритрона, так и параметров транспорта кислорода. Однако, данные изменения в группах с преддиабетом и впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа носят разнонаправленный характер, и могут рассматриваться, как дополнительные критерии диагностики ранних сосудистых нарушений сахарного диабета 2 типа на этапе до клинических проявлений.

Ключевые слова: деформируемость эритроцитов, скорость агрегации, напряжение кислорода, преддиабет, сахарный диабет 2 типа

FUNCTIONAL STATE OF MICROCIRCULATION SYSTEM IN PATIENTS WITH PREDIABETES AND NEWLY DIAGNOSED DIABETES MELLITUS TYPE 2

Milutina-Yakusheva D.A., Halepo O.V., Molotkov O.V.
Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russia
dasha_cv@mail.ru

Abstract

Studied the microrheological characteristics and the parameters of peripheral blood as well as oxygen transport parameters in patients with prediabetes and ewly diagnosed diabetes mellitus type 2. It was

established that the patients of the studied groups have changes both in the state of the peripheral unit of the erythron and in the parameters of the oxygen transport. However, these changes in groups with pre-diabetes and newly diagnosed diabetes mellitus type 2 are multidirectional, and can be considered as additional criteria for diagnosis of early vascular disorders of diabetes mellitus type 2 at the stage before clinical manifestations.

Keywords: erythrocyte deformability, aggregation rate, oxygen tension, prediabetes, diabetes mellitus type 2

Введение. Известно, что повышенный риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, характерный для сахарного диабета 2 типа (СД2), возникает уже на этапе донозологических расстройств, при развитии нарушения толерантности к глюкозе, формировании преддиабета [3]. Высокая распространенность СД2, особенно среди лиц молодого и среднего возраста, диктует необходимость разработки методов выявления сосудистых осложнений различных форм нарушений углеводного обмена на ранних стадиях.

Наиболее ранние признаки расстройств сердечно-сосудистой системы, характерные для различных вариантов течения СД2 проявляются на уровне микроциркуляции [5]. По мнению ряда авторов, именно расстройства микроциркуляции и реологических свойств крови приводят к нарушению ее кислородтранспортной функции у больных с СД2, что влечет за собой нарастание ишемии тканей и прогрессирование заболевания [4]. Однако, несмотря на определенные успехи, достигнутые при изучении потоковых свойств крови на уровне микроциркуляторного русла, многие вопросы патогенеза реологических и микрососудистых расстройств при СД2, а также преддиабете остаются далёкими от окончательного решения.

Целью работы было изучение особенностей состояния периферического звена эритрона и параметров транспорта кислорода у пациентов с преддиабетом и впервые выявленным СД2 (ВВСД2).

Методы исследования. Для оценки состояния периферического звена эритрона и параметров транспорта кислорода было обследовано 48 пациентов, из которых 22 пациента с преддиабетом и 26 пациентов ВВСД2. Группу контроля составили 29 практически здоровых лиц.

Изучение показателей периферической крови: количество эритроцитов (RBC), уровень гемоглобина (Hgb) и гематокрит (Hct) проводили с помощью стандартных гематологических методов. Средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC) определяли на гематологическом анализаторе «Abacus» (Diatron, Австрия, 2002). Деформируемость эритроцитов определяли фильтрационно-осмотическим методом с помощью прибора ИДА-01. Для оценки процесса агрегатообразования использовали метод определения фракционной СОЭ с помощью прибора для измерения СОЭ фирмы "Drager&HeerhorstGmbH&Co. ЛП" (Германия) с последующим построением кривых седиментации.

Параметры транспорта кислорода изучали методом неинвазивной оксиметрии в условиях пробы с локальной ишемией на кислородном мониторе TCM-2 (Radiometer, Дания). При этом определяли уровень напряжения кислорода (pO_2), длительность латентного периода после прекращения ишемии (Lp_2), скорости утилизации (v_1) и восстановления (v_2) кислорода, а также показатель объемного кровотока (dQ).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft. Inc., USA).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что у лиц с преддиабетом значения количества эритроцитов и гемоглобина достоверно более низкие, чем в группе здоровых лиц. В то время как у пациентов с ВВСД2 обнаружены достоверно более высокие значения показателей RBC, Hgb и Hct по сравнению как с группой контроля, так и группой с преддиабетом. Согласно данным литературы более высокие значения данных показателей у лиц с ВВСД2 могут быть связаны с воздействием инсулина на эритропоэз при гипергликемии. Усиление эритропоэза в этих условиях сопровождается повышением в крови количества ретикулоцитов и выбросом в кровоток юных эритроцитов. Кроме того, рядом авторов [6] установлено, что форма эритроцитов при приобретенной гипергликемии меняется зависимо от степени ее компенсации. Этот факт может объяснить полученные нами данные об увеличении среднего объема эритроцита и уменьшении концентрации гемоглобина в отдельном эритроците у пациентов с ВВСД2, т.е. с некомпенси-

рованной формой гипергликемии. В условиях декомпенсированной гипергликемии у таких пациентов происходит выброс эритроцитов из депо, количество красных клеток в крови увеличивается, однако эти клетки находятся на разных стадиях жизненного цикла, а значит имеют различный размер и неодинаковый кислородный потенциал. Так, на стадии ретикулоцита красная кровяная клетка только формирует ферментные системы, специфичные для эритроцита; происходит приобретение красной кровяной клеткой тороидальной формы, интенсивно идет синтез гемоглобина. Однако общее содержание гемоглобина в ретикулоците все еще меньше, чем в зрелой клетке. Следовательно, увеличение количества эритроцитов у пациентов с ВВСД2 можно рассматривать как компенсаторную реакцию костного мозга в ответ на тканевую гипоксию. Вопрос низких значений показателей количества эритроцитов, концентрации гемоглобина и гематокрита у пациентов с преддиабетом подлежит дальнейшему изучению.

При исследовании гемореологических показателей установлено, что у пациентов с преддиабетом ИРЭ на 59% ($p < 0,001$) больше, чем в группе здоровых лиц и на 144% ($p < 0,001$) по сравнению с группой с ВВСД2. При этом ИРЭ у пациентов с ВВСД2 на 35% ($p < 0,001$) ниже, чем в контроле. Низкое значение ИРЭ у пациентов с ВВСД2 свидетельствует о высокая деформируемости их эритроцитов. Полученные результаты, с нашей точки зрения, могут быть объяснены небольшим стажем заболевания у данных пациентов. Как известно, по данным литературы, при гипергликемии происходит активация свободнорадикальных реакций, которые включают усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ). В эритроцитах ПОЛ ведет к структурно-функциональным изменениям, в частности к изменению свойств эритроцитарной мембраны. Однако вначале (на ранних этапах заболевания) эритроциты реагируют на активацию ПОЛ увеличением деформируемости, а затем по мере накопления продуктов ПОЛ и истощения антиоксидантной защиты, увеличением жесткости эритроцитарной мембраны. Высокий ИРЭ, с нашей точки зрения, при преддиабете может быть связан с одной стороны с тем, что просто не успели включиться компенсаторные механизмы на этапе незначительных метаболических перестроек, характерных для данной формы нарушений углеводного обмена. А с другой стороны,

ухудшение деформируемости может быть связано с большим стажем заболевания у пациентов данной группы.

В отличие от изменений ИРЭ, агрегационная способность эритроцитов у пациентов исследуемых групп зависит от степени нарушения углеводного обмена. У пациентов с преддиабетом не выявлено изменений в значении скорости и времени агрегации. а у пациентов с ВВСД2 наблюдается усиление агрегатообразования. Так, оказалось, что у лиц с ВВСД2 скорость агрегации эритроцитов на 94% ($p < 0,001$) выше, чем в группе практически здоровых лиц. Однако, изменение агрегационной способности эритроцитов у пациентов с ВВСД2 неоднозначно. Нами была выявлена у больных с ВВСД2 отрицательная взаимосвязь между ИРЭ и скоростью агрегации эритроцитов. Согласно данным, имеющимся в литературе, функциональная связь между агрегационными свойствами и деформируемостью (ДЭ) имеет физиологическое значение. В ряде исследований были получены данные, свидетельствующие о наличии корреляции между ДЭ и скоростью агрегации красных клеток крови. Ответственной за данный феномен, по мнению исследователей, является форма эритроцита, непрерывно меняющаяся при физиологических процессах. Действительно, при сферуляции эритроцита снижаются его деформационные способности и число мостикообразующих связей для адсорбции больших молекул на его мембране. При уплощении эритроцита растут его деформируемость и площадь адсорбции, что приводит к возрастанию скорости агрегации. Физиологическое значение выявленного феномена состоит в поддержании газового гомеостаза за счет реципрокных последствий прямой положительной связи реологических детерминант на вязкостные свойства крови.

Те же закономерности выявлены при исследовании СОЭ. Так, значение $СОЭ_1$ и $СОЭ_2$ у пациентов с преддиабетом не отличалось от значений в группе контроля. У пациентов с диагнозом СД2 значение показателя $СОЭ_2$ было достоверно больше, чем в группе контроля.

При изучении показателей транспорта кислорода установлено, что у пациентов с нарушениями углеводного обмена уровень напряжения кислорода находится в пределах нормальных значений. Однако, у лиц с преддиабетом этот показатель достоверно ниже, чем у практически

здоровых лиц (на 24%; $p < 0,01$) и пациентов с ВВСД2 (на 33%; $p < 0,001$). При этом в группе лиц с ВВСД2 значение pO_2 достоверно выше на 13% ($p < 0,05$), чем в группе контроля.

Исследование интегрального кровотока показало, что у лиц с преддиабетом и ВВСД2 интенсивность микроциркуляторного кровотока находится в пределах нормы, что коррелирует с показателями исследования утилизации кислорода. При этом, оценка интенсивности микрошунтового кровотока показала, что у пациентов с ВВСД2 преобладает капиллярный кровоток, а у лиц с преддиабетом микрошунтовой. Так, в группе пациентов с преддиабетом латентный период ишемической пробы на 67% ($p < 0,001$) длиннее, а скорость восстановления кислорода после ишемии на 21% ($p < 0,02$) меньше, чем в группе контроля. При этом у пациентов с ВВСД2 значения Lp_2 достоверно не отличается, а скорость восстановления достоверно выше на 61% ($p < 0,001$) по сравнению с группой практически здоровых лиц.

При оценке характера нервной регуляции на микроциркуляторном уровне методом функциональной оксиметрии установлено, что у пациентов с преддиабетом преобладает парасимпатический тип нервной регуляции, а пациентам с ВВСД2 больше соответствует равновесный тип. Можно отметить, что при равновесном типе нервной регуляции наблюдается практически функциональное соответствие между напряжением кислорода, его тканевым и капиллярным пулами и скоростями утилизации и восстановления кислорода, что мы и видим у пациентов с ВВСД2. По-видимому, этот вариант функционирования системы микроциркуляции является оптимальным и с точки зрения регуляции, поскольку обеспечивает наиболее тесное взаимодействие между элементами микроциркуляции.

Заключение. В ходе проведенного анализа установлены изменения гематологических и гемореологических показателей, а также параметров транспорта кислорода у пациентов исследуемых групп. При этом установлено, что изменения в группах пациентов с преддиабетом и ВВСД2 носили разнонаправленный характер. Данные изменения могут быть использованы в качестве предикторов развития ранних сосудистых осложнений на донозологическом этапе формирования СД2, при преддиабете.

Литература

1. Бондарь Т.П., Коренец Г.И. Морфофункциональное состояние эритроцитов периферической крови при поздних сосудистых осложнений СД (обзор литературы) / Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – №12. – С. 22-34.
2. Ганелина И.Е., Родионова В.И., Катюхин Л.Н., Тепляков Д.В. Данные коронарографии и реологические свойства эритроцитов при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST // Кардиология. – 2011. – №4. – С. 4-9.
3. Древаль А.В., Мисникова И.В., Барсуков И.А. Лечение нарушений углеводного обмена // Лечащий врач. – 2008. – №10. – С. 16-24.
4. Титов Д.В. Роль микроциркуляции органов малого таза и реологических свойств крови в формировании детрузорной гиперактивности. – Томск, 2014. – 114 с.
5. Шилов А.М., Авиалунов А.С., Синицина Е.Н., Марковский В.Б., Полещук О.И. Изменения реологических свойств крови у больных с метаболическим синдромом // Русский медицинский журнал. 28.02.2008. URL: http://www.rmj.ru/articles/kardiologiya
6. Leschke M. Does targeted therapy of type 2 diabetes prevent cardiovascular incidents? // Med. Klin. – 2003. – Vol.98, №1. – P. 12-16.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ НЕВРОЛОГИЧЕСКИМ СТАТУСОМ, ПОКАЗАТЕЛЯМИ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ И ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ РАЗЛИЧНОМ ИСХОДЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Ованесян Р.А.[1], Ованесян И.Г.[2]
[1]Ереванский государственный университет, Ереван, Армения
[2]Медицинский центр «Сурб Григор Лусаворич», Ереван, Армения
hovrouben@gmail.com

Резюме

В исследовании 108 больных ишемическим инсультом выявлено, что у выживших больных положительная динамика показателей агрегации тромбоцитов, ИЛ-1b и ИЛ-4 сопровождается улучшением неврологического статуса, в то время как у экзитировавших больных отрицательная динамика этих показателей сопровождается ухудшением неврологического статуса. Положительная связь между неврологическим статусом и ИЛ-1β говорит о нейродеструктивной роли ИЛ-1β, в то время как отрицательная связь между НС и ИЛ-4 свидетельствует о нейропротекторной роли последнего.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, интерлейкины, ишемический инсульт, неврологический статус.

RELATIONSHIP BETWEEN THE NEUROLOGIC STATUS, INDICATORS OF PLATELET AGGREGATION AND INTERLEYKINS AMONG PATIENTS WITH DIFFERENT OUTCOMES OF ISCHEMIC STROKE

Hovhanessyan R.A.[1], Hovhannisyan I.G.[2]
*[1]*Yerevan State University*, Yerevan, Armenia*
[2]Medical Center 'St. Gregory the Illuminator', Yerevan, Armenia
hovrouben@gmail.com

Abstract

A study involved 108 patients with ischemic stroke. The positive dynamics in platelet aggregation, IL-1β and IL-4 among surviving ischemic stroke patients is accompanied by improvement of the neurological

status, meanwhile the negative dynamics of the mentioned indicators among the non-surviving patients is accompanied by aggravation of the neurological status. The positive relationship between neurological status and IL-1β is testifies of the neurodegenerative role of IL-1β, while the negative relationship between neurological status and IL-4 testifies to the neuroprotective role of IL-4.

Key words: interleukins, ischemic stroke, neurological status, platelet aggregation.

Введение. Проблема профилактики, лечения и реабилитации острых нарушений мозгового кровообращения является актуальной проблемой современной клинической неврологии. В Армении в 2015 г. инциденс ишемического инсульта (ИИ) составил 35,7, преваленс – 113,9, а смертность – 37,9 (на 100000 населения соответственно) [1]. В патогенезе ИИ значительную роль играют расстройства агрегатных свойств тромбоцитов (АТ) [2-4]. Установлено также, что провоспалительные цитокины вызывают и поддерживают в очаге ишемии воспалительную реакцию, что приводит к неблагоприятному исходу заболевания [5-7].

Цель исследования: Выявление корреляционных связей между клиническим состоянием больных и показателями АТ, интерлейкинов ИЛ-1β и ИЛ-4 у выживших и экзитировавших больных ИИ.

Материал и методы. В настоящее проспективное клиническое когортное исследование включены 108 больных ИИ (59 (54,6%) мужчин и 49 (45,4%) женщин), находившихся на лечении в отделении сосудистой неврологии МЦ «Сурб Григор Лусаворич» в период с 2010 по 2013 гг. Возраст больных колебался от 30 до 90 лет, составляя в среднем 67,56± 11,34 лет. Соответственно исходу заболевания было выделено 2 группы больных: 1-ая – выжившие; 2 – с летальным исходом.

Оценку неврологического статуса (НС) больных проводили согласно балльной шкале NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale). Уровень интерлейкинов в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Вектор-Бест» (Россия) и выражали в пг/мл. Определение АТ, индуцированной АДФ, производили нефелометрическим методом при помощи анализатора агрегации «Биола» (Россия) и выражали в процентах. Проверку нормальности распределения переменных проводили согласно одновыборочному критерию χ^2 и критерию Колмогорова-Смирнова. Данные

представлены в виде частот (%), медиан (Me), 25% и 75% квартилей (Q_1 и Q_3) и 95% доверительных интервалов (ДИ). Сравнение показателей проводили согласно критерию χ^2 Пирсона и критерию Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и их обсуждение. В острейшем периоде у больных ИИ 2-ой группы (экзитировавшие больные) показатели НС значительно выше таковых показателей больных ИИ 1-ой группы (выжившие больные): $\chi^2_{(2)} = 13,383$ (p=0,001). В остром периоде ИИ у больных 2-ой группы разница в показателях НС по сравнению с таковыми больных 1-ой группы углубляется: $\chi^2_{(4)} = 108,000$ (p<0,000).

В острейшем периоде показатели АТ больных ИИ 2-ой группы выше таковых больных 1-ой группы: U = 2,045; p=0,041. Показатели ИЛ-1b больных ИИ 2-ой группы значительно выше таковых больных 1-ой группы: U = 5,198; p<0,000. В остром периоде ИИ отмечается дальнейший рост показателей АТ и ИЛ-1b у больных 2-ой группы по сравнению с таковыми у больных 1-ой группы: U = 6,104 и U = 6,214 соответственно; p<0,000.

Обратная картина отмечается при анализе показателей ИЛ-4. В острейшем периоде ИИ эти показатели у больных 1-ой и 2-ой групп практически не отличаются друг от друга: U = -0,765; p=0,444. Однако в остром периоде отмечается снижение показателей ИЛ-4 у больных 2-ой группы по сравнению с таковыми больных 1-ой группы: U = -6,081; p<0,000.

У больных 1-ой группы в острейшем периоде ИИ между НС и АТ отмечалась слабая положительная связь (rs = 0,27, p=0,001); между НС и ИЛ-1b – умеренная положительная связь (rs = 0,38, p<0,001)); между НС и ИЛ-4 связь отсутствовала. В остром периоде ИИ у больных 1-ой группы между НС и АТ отмечалась умеренная положительная связь (rs = 0,31, p=0,001); между НС и ИЛ-1b – связь отсутствовала; между НС и ИЛ-4 – слабая отрицательная связь (rs = –0,25, p=0,02).

У больных 2-ой группы в острейшем периоде ИИ между НС и АТ отмечалась умеренная положительная, однако незначимая связь (rs = 0,33, p=0,236); между НС и ИЛ-1b – слабая положительная, однако незначимая связь (rs = 0,22, p=0,437); между НС и ИЛ-4 – умеренная положительная, однако незначимая связь (rs = 0,30, p=0,280). В остром

периоде ИИ у больных 2-ой группы между НС и АТ отмечалась сильная положительная связь (rs = 0,85, p<0,000); между НС и ИЛ-1b – связь отсутствует; между НС и ИЛ-4 – связь отсутствует.

Таким образом, результаты наших исследований подтверждают существующее мнение о том, что в острейшем периоде ИИ повышается АТ и увеличивается синтез провоспалительных интерлейкинов. Также выявлена существенная разница в показателях НС, АТ и ИЛ-1b в двух группах больных в острейшем периоде ИИ, а именно: эти показатели у экзитировавших больных значительно выше чем у выживших. Имеется также разница в показателях ИЛ-4: у выживших больных эти показатели в остром периоде значительно выше чем у экзитировавших.

Вместе с тем, результаты наших исследований показывают, что в остром периоде ИИ динамика показателей интерлейкинов имеет разнонаправленный характер: у выживших больных происходит снижение уровня провоспалительного интерлейкина ИЛ-1b и, наоборот, повышение уровня противовоспалительного интерлейкина ИЛ-4 по сравнению с острейшим периодом, в то время как у экзитировавших больных происходит дальнейшее повышение уровня ИЛ-1b и снижение уровня ИЛ-4.

Заключение. У выживших больных ИИ в остром периоде положительная динамика показателей АТ, ИЛ-1b и ИЛ-4 сопровождается улучшением неврологического статуса, в то время как у экзитировавших больных отрицательная динамика этих показателей сопровождается ухудшением неврологического статуса. Наличие положительной корреляционной связи между НС, АТ и ИЛ-1β как у выживших, так и у экзитировавших больных дает основание предположить, что интерлейкин ИЛ-1β в процессах повреждения-защиты играет нейродеструктивную роль, в то время как наличие отрицательной корреляционной связи между НС, АТ и ИЛ-4 у выживших больных свидетельствует о нейропротекторной роли последнего.

Литература

1. Статистический ежегодник «Здоровье и здравоохранение». Ереван, 2015. URL: http://www.moh.am/uploadfiles/Health_Stat_Book_2015_PDF.pdf
2. Морозова И.Ю., Страмбовская Н.Н. Лейкоцитоз и агрегационная активность тромбоцитов в прогнозировании исходов острых нарушений мозго-

вого кровообращения // Дальневосточный медицинский журнал – 2013. – №4. – С. 13-16.
3. Tobin WO, Kinsella J, Coughlan T, Collins D, O'Neill D, Murphy R, Egan B, Tierney S, Feeley T, McCabe D. High on-treatment platelet reactivity on commonly prescribed antiplatelet agents following transient ischaemic attack or ischaemic stroke: results from the Trinity Antiplatelet Responsiveness (TRAP) study // Eur J Neurol. – 2013. – V.20, N2. – P. 344-352.
4. Lim S., Coughlan C., Murphy S., Fernandez-Cadenas I., Montaner J., Thijs V., Marquardt L., McCabe D. Platelet function testing in transient ischaemic attack and ischaemic stroke: A comprehensive systematic review of the literature // Platelets. – 2015. – V.26, N5. – P. 402-412.
5. Никифорова (Постникова) Т.А., Доронин Б.М., Песков С.А. Содержание цитокинов в сыворотке крови как предикторов геморрагической трансформации ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – Т.114, №3, (прил. Инсульт). – С. 20-26.
6. Chamorro A. Role of inflammation in stroke and atherothrombosis // Cerebrovasc Dis. – 2004. – V.17, N3. – P. 1-5.
7. Tuttolomondo A., Di Raimondo D., di Sciacca R., Pinto A., Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke // Curr Pharm Des. – 2008. – V.14, N33. – P. 3574-3589.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ИСКУССТВЕННОГО СЕНСОРНОГО ПРОПРИОЦЕПТИВНОГО КАНАЛА НА ПРИМАТАХ

Зобова Л.Н. [1], **Миллер Н.В.** [1], **Рощин В.Ю.** [1,2], **Бадаква А.М.** [1]

[1]*ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия*

[2] *ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

nvmiller@mail.ru

Резюме

Целью проекта является создание научно-методической платформы для разработки научных основ реализации искусственных систем проприоцептивной чувствительности, основанных на пластичности коры и процессе обучения. За первый год создана приматологическая экспериментальная установка для проведения исследований, использующих модель обучения сенсорно-двигательной задаче с использованием скоординированной в реальном времени многоканальной микростимуляции коры мозга. Две обезьяны Macaca mulatta прошли обучение управлению движением маркера в визуальном рабочем пространстве с помощью джойстика.

Ключевые слова: обучение обезьян, микростимуляция коры, проприоцептивная чувствительность, пластичность коры.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF THE ARTIFICIAL PROPRIOCEPTIVE SENSORY CHANNEL ON PRIMATES

Zobova L.N. [1], **Miller N.V** [1], **Roschin V.Y.** [1,2], **Badakva A.M.** [1]

[1]*Institute for Bio-medical Problems, RAS, Moscow, Russia*

[2]*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia*

Abstract

The goal of present work is development of scientific and methodological basis for research on multisensory integration in the cortex in monkey and implementation of artificial channels for proprioceptive sensitivity based on

the cortex plasticity and learning. During the 1-st year preparatory phase a primatology experimental setup was developed to allow investigation in monkey based on learning in sensory-motor task involving real time coordinated multichannel microstimulation of the cortex. Two monkeys Macaca mulatta had been pre-trained to control movement of a circle marker in the visual operational space by means of the joystick.

Keywords: learning of monkey, microstimulation of the cortex, proprioceptive sensitivity, cortex plasticity.

Введение. В настоящее время в мире проводятся интенсивные исследования по разработке и применению ИМК, объем которых стремительно растет. Есть основания считать, что для социальной реабилитации больных с полной потерей двигательных функций наиболее эффективным средством восстановления контакта с внешним миром может оказаться инвазивный тип ИМК, реализуемый с помощью микроэлектродов, вживленных в мозг. Естественно, что принципиальные вопросы его разработки и исследования решаются в экспериментах на обезьянах, которые не могут реагировать на словесные инструкции, чтобы осуществлять необходимые движения и генерировать связанную с этими движениями активность мозга. Поэтому, как правило, их сначала обучают двигательным задачам, связанным с целенаправленными движениями руки или управлением внешними объектами с помощью джойстика и других подобных устройств [5]. Развитие тематики инвазивных ИМК и их исследование в экспериментах на обезьянах показали, что важнейшим фактором использования ИМК является пластичность коры мозга, способная улучшать произвольную модуляцию нейрональной активности и проявляющаяся при тренировке животных с использованием биологической обратной связи, основанной на зрительной афферентации [10]. Обучение обезьяны использованию ИМК фактически означает формирование нового навыка зрительно-двигательной координации, где в качестве исполнительного органа используется виртуальный объект. Между тем, огромное значение при точностных манипуляциях с объектами имеет соматосенсорная обратная связь. Сигналы от механорецепторов кожи дают важную информацию о контакте и силах, действующих на кожу при схватывании объекта, особенно, при сдвиге объекта относительно руки или руки относительно объекта [4]. Без этой информации человек

либо не мог бы удержать объект манипуляции, либо разрушал бы его. Важность проприоцептивной афферентации подчеркивается тем фактом, что при отсутствии проприоцепции человек лишается возможности планировать движение конечности [8]. Кроме того, проприоцепция придает ощущение принадлежности конечности телу [1]. Исследования последних лет [9] позволяют ожидать, что добавление передачи мозгу искусственной «сенсорной» информации посредством многоканальной координированной микростимуляции сенсорных областей коры позволит осуществить интерфейс мозг-компьютер-мозг (ИМКМ), который предоставит новые возможности в области фундаментальных исследований механизмов пластичности коры и обеспечит прорыв в таких прикладных областях, как «естественное» антропоморфное управление многомерными техническими устройствами и двигательная реабилитация больных с тяжелыми поражениями нервной системы. Стимуляция больших областей мозга мешает обработке информации, тогда как стимуляция маленьких областей, называемая микростимуляцией, может вызывать двигательные и сенсорные эффекты, имитирующие естественную активность стимулируемых областей [3]. В ряде исследований показано [6], что обезьяны могут различать амплитуду, частоту и паттерн микростимуляции области тактильного представительства пальцев и ладони руки в первичной соматосенсорной коре и, соответственно, что микростимуляция коры может стать основой «очувствления» управляемого исполнительного устройства. Сигнал искусственной обратной связи должен функционально не отличаться от сигналов естественной обратной связи: обеспечивать необходимую сенсорную информацию и допускать мультисенсорную интеграцию со зрительным каналом для уменьшения вариабельности движения при использовании обоих сигналов. В настоящее время существуют 2 подхода к созданию подобной искусственной сенсорной обратной связи [1]: «биомиметический», при осуществлении которого микростимуляция структур мозга должна основываться на существующих анатомических и физиологических знаниях, и «адаптивный», основанный на использовании пластичности коры и заключающийся в выработке в процессе обучения, на основе мультисенсорной интеграции, в коре новых генерализованных сенсорных карт, позволяющих содержательно интерпретировать паттерны микростимуляции, в которых некоторым искусственным образом закодирована соот-

ветствующая пространственная информация. Полагается, что в рамках адаптивного подхода для микростимуляции может использоваться произвольно выбранная область сенсорной коры [3], что снимает практические ограничения, существующие при биомиметическом подходе. В частности, при биомиметическом подходе задача выбора области коры для микростимуляции для выработки искусственной проприоцептивной чувствительности становится трудно реализуемой, поскольку микростимуляционные импульсы должны подаваться в область проприоцептивного представительства руки, расположенную зачастую на дне центральной борозды. В серии работ [3] в рамках адаптивного подхода проиллюстрирована принципиальная возможность выработки искусственного сенсорного канала для сообщения обезьяне «проприоцептивной» информации о взаимном положении в виртуальном пространстве управляемой обезьяной рабочей точки и конечной цели еѐ движения. В этих работах в результате обучения на основе сенсомоторного опыта пространственную сенсорную значимость приобретал 8-канальный паттерн микростимуляции, который формировался разложением двумерного вектора, определяющего текущее направление от рабочей точки к цели и дистанцию до неѐ, на априорно назначенные каждому из 8 каналов стимуляции искусственно выбранные предпочтительные направления. В то же время существуют модельные исследования [7] показывающие, что нервная система способна успешно осуществлять формирование генерализованных сенсорных полей на основе мультисенсорной интеграции многомерных сигналов, в которых многомерная пространственная информация закодирована распределѐнным образом. Распределѐнное кодирование многомерной информации является естественным для нервной системы и должно обеспечивать большую устойчивость к разнообразным системным помехам, включая временную нестабильность эффективности стимулирующих электродов, по сравнению с кодированием, использующим искусственное разложение по априорно назначенным функциям. Положительный результат упомянутых выше экспериментальных и модельных исследований дает возможность ставить вопрос о разработке технологии создания искусственного проприоцептивного канала на основе обучения произвольно выбранных областей сенсомоторной коры обезьяны с применением распределѐнного кодирования многоканальных паттернов микростимуляции в рамках настоящего проекта.

Целью настоящего проекта, рассчитанного на три года, является создание научно-методической платформы для разработки научных основ реализации искусственных систем проприоцептивной чувствительности, основанных на пластичности коры и процессе обучения, и исследования процессов мультисенсорной интеграции в коре головного мозга обезьян. Задачами первого года исследования были: создание приматологической экспериментальной установки для работы обезьяны в визуальной среде виртуальной реальности, подготовка и начало обучения обезьян выполнению сенсорно-двигательной задачи в среде виртуальной реальности.

Методы исследования. В проекте используются две обезьяны Macaca mulatta. В рамках исследования предполагается сформировать у обезьян искусственный сенсорный канал для передачи в мозг информации о текущем положении рабочей точки виртуального исполнительного органа. По мере обучения обезьяны предполагается тестирование возможности использования ею этой информации для: 1) планирования движения к цели и коррекции такого движения во время его выполнения при отсутствии зрительной информации о взаимном положении рабочей точки и цели и 2) улучшения планирования и коррекции движения при одновременном присутствии зрительной информации. Формирование искусственного сенсорного канала проприоцептивной чувствительности планируется проводить на модели «очувствления» виртуального исполнительного объекта, визуальная информация о положении которого относительно конечной цели движения, наблюдается обезьяной в синтезированном пространстве виртуальной реальности. В простейшей модели предполагается формировать сенсорный канал, обеспечивающий ощущение положения виртуальной рабочей точки относительно произвольной цели в двумерной системе координат. Передача обезьяне информации о положении виртуальной рабочей точки будет производиться посредством многоканальной микростимуляции соматосенсорной коры мозга. Кодирование информации будет основываться на адаптивном подходе, при котором паттерны многоканальной микростимуляции обретают сенсорную значимость за счѐт механизмов нейропластичности в процессе обучения обезьяны. Для формирования многоканальных пространственно-временных паттернов микростимуляции предполагается использовать от 8 до 16 каналов стимуляции.

Хирургическая подготовка животных. При хирургической подготовке с помощью 10 шурупов, ввинченных в кости черепа, на голове обезьяны устанавливается технологическое акриловое кольцо, армированное дюралюминием с набором резьбовых отверстий и позволяющее фиксировать голову животного, а также крепить съемную стереотаксическую пластину. Хирургические операции проводятся под управляемым наркозом с помощью в/в введения золетила.

Картирование коры. Нахождение расположения первичной сенсомоторной коры (S1) обезьяны предполагает предварительное нахождение представительства руки в первичной моторной коре (M1) и центральной борозды. Картирование представительства руки в M1 осуществляется в области с соответствующими стереотаксическими координатами по атласу мозга обезьяны с помощью бифазной микростимуляции (с длительностью импульса 0.2 мсек, частотой бифазной комбинации 200 Гц и общей длительностью 500 мсек) и наблюдения за выраженными длительными движениями предплечья, запястья и пальцев обезьяны, возникающими при таких параметрах стимуляции [3]. Делая треки более каудально, находят точки, в которых моторные ответы руки на микростимуляцию наблюдаются на глубине вплоть до 5-6 мм, что означает нахождение в переднем склоне центральной борозды. Отсутствие моторных реакций на микростимуляцию при наличии нейрональной активности на большой глубине в еще более каудальных точках означает нахождение в заднем склоне центральной борозды и переход в область первичной сенсомоторной коры. Картирование представительства руки в S1 осуществляется при регистрации ответов нейрональной активности на стимуляцию кожи и шерсти плеча, предплечья, запястья, ладони и пальцев контрлатеральной руки обезьяны с помощью волосяной кисточки. Для регистрации активности нейронов при картировании коры используют вольфрамовые микроэлектроды в стеклянной изоляции с сопротивлением кончика в диапазоне от 0,5 до 2,0 МОм на частоте 1 кГц, помещенные в металлическую направляющую канюлю. Для введения электрода в мозг в костях черепа сверлят вручную канал диаметром, равным диаметру направляющей канюли, проводя сверло через отверстие в съемной стереотаксической пластине. Электрод в направляющей канюле вводят через образовавшийся канал до твердой мозговой оболочки. Перемещение микроэлектрода в

коре с помощью микроподачи и выбор позиции регистрации осуществляются при визуальном и аудио-контроле нейрональной активности, а также наблюдении за движениями обезьяны.

Обучение обезьян. На первом этапе обучения обезьян с целью минимизации дискомфорта животных, связанного с ограничением свободы движений рабочей руки, для управления движением маркера выбран компьютерный джойстик, не требующий фиксации кисти и запястья рабочей руки, в отличие от двузвенного рычага, который будет применяться на следующих этапах тренировки. Предварительно животных приучали к извлечению из виварной клетки и фиксации в специальном приматологическом кресле, длительному пребыванию в нем и в экспериментальной установке. После обучения обезьян использованию штуцера для получения сока переходили к обучению выполнения общепринятой двигательной задачи управления маркером на экране компьютерного дисплея с помощью джойстика, которую можно рассматривать как упрощенный способ взаимодействия с виртуальным объектом. Обезьяна, сидящая в экспериментальном кресле перед компьютерным дисплеем, должна была переводить маркер из центра экрана на возникающую мишень-кружок и удерживать маркер в пределах кружка заданное время. В этом случае цвет мишени менялся, а обезьяна получала подкрепление в виде порции яблочного сока из штуцера. Вслед за возвращением маркера в центр экрана начинался следующий цикл предъявления мишени. После «понимания» обезьяной связи между попаданием маркера на мишень и получением подкрепления задача усложнялась путем предъявления мишени в случайном порядке в одном из 8 фиксированных положений, лежащих на окружности с центром, совпадающим с центром экрана.

Экспериментальная установка для работы обезьяны в визуальной среде виртуальной реальности. В ходе выполнения проекта требуется выполнение обезьяной ряда сенсорно-двигательных задач, в которых движения рабочей руки обезьяны должны быть скоординированы со зрительной информацией о взаимном положении виртуального объекта (маркера), управляемого текущим положением рабочей точки руки (кисти), и мишени, предъявляемой в двумерном визуальном пространстве. Для этой цели была создана оригинальная приматологическая экспериментальная установка с соответствующим программным обеспечением.

В установке обезьяна сидит в приматологическом кресле с мягкой фиксацией корпуса и возможностью жёсткой фиксации головы, применяющихся при первичном обучении обезьян. Примерно на уровне плеча животного смонтирован двузвенный рычаг, имеющий на свободном конце шарнирно установленную площадку для мягкой фиксации запястья руки обезьяны и ручку для захвата ее кистью. Эта конструкция обеспечивает возможность движения руки в горизонтальной плоскости и позволяет с помощью гониометров, установленных на двух шарнирах, регистрировать данные, на основе которых вычисляются текущие двумерные координаты рабочей точки. Электрические сигналы гониометров нормализуются с помощью измерителя положения руки обезьяны NBL705 (НейроБиоЛаб, Россия) и оцифровываются с частотой дискретизации не менее 1000 Гц с возможностью дальнейшей обработки данных в реальном времени. Для предъявления обезьяне двумерной картины виртуальной реальности перед её глазами на расстоянии 50 см расположен компьютерный монитор. Размер визуального рабочего пространства, предъявляемого обезьяне, составляет 40х40 см. Поверх рук обезьяны может монтироваться непрозрачный горизонтальный экран, не позволяющий ей видеть положение рабочей руки.

Результаты. Процесс обучения животных выполнению задачи попадания маркером с помощью джойстика на мишени в восьми положениях имел длительный и индивидуальный характер. Одна обезьяна «поняла» задачу значительно раньше второй обезьяны, которая устойчиво избегала движений к двум соседним мишеням. В целом, обе обезьяны удовлетворительно обучались управлению маркером с помощью джойстика. Уменьшалась продолжительность траектории движения маркера на мишень и увеличивался коэффициент генерализации среднего числа попадания маркера на мишень, осредненного по всем мишеням, который характеризует изоморфность этого параметра по направлениям расположения мишени, тем самым давая представление о равномерности работы обезьяны по разным направлениям, т.е. степени ее обучения (чем ближе показатель к 1, тем равномернее работает обезьяна по разным направлениям). Увеличивалась точность движения маркера к мишени, о которой судили по среднему значению косинуса угла между текущим направлением движения маркера (вектором скорости) и текущим направлением на мишень, осреднённому по всем

точкам всех успешных траекторий попаданий (чем ближе показатель к 1, тем траектория движения к мишени ближе к прямой). На следующем этапе тренировки (с использованием двузвенного рычага для управления движением маркера) мишени в виртуальном пространстве будут предъявляться обезьяне по тому же сценарию, как и при обучении сенсорно-двигательной задаче, но будет визуализироваться только информация о взаимном положении маркера и мишени в виртуальном пространстве. Отрезок, соединяющий изображение маркера и мишени в визуальном пространстве, будет задавать текущее направление движения к цели и расстояние до неё, но положения маркера и мишени не будут привязаны к их абсолютному положению в виртуальном пространстве. Указанный отрезок сможет располагаться в различных случайно выбранных местах визуального рабочего пространства для того, чтобы многоканальный паттерн стимуляции формировался на основе направления и расстояния между текущим положением маркера и мишени (ориентации и длины соединяющего их отрезка) независимо от их абсолютных положений, тем самым создавая искусственный «проприоцептивный» канал. На основе информации о взаимном положении виртуальной рабочей точки и мишени компьютер в реальном времени будет формировать многоканальный паттерн для микростимуляции коры через электроды, имплантированные в область S1 обезьяны. Пространственная значимость паттернов микростимуляции будет формироваться на основе пространственной генерализации множественных пространственно-временных ассоциаций визуальной информации об относительном положении виртуальной рабочей точки и паттернов микростимуляции, в которых это положение закодировано.

Заключение. Таким образом, за первый год, являющийся подготовительным этапом, создана приматологическая экспериментальная установка для проведения исследований, использующих модель обучения сенсорно-двигательной задаче с использованием скоординированной в реальном времени многоканальной микростимуляции коры мозга. Установка позволяет обезьяне управлять движениями виртуального объекта в двумерном визуальном рабочем пространстве либо с помощью компьютерного джойстика, либо движениями кисти, закреплённой на концевом шарнире двузвенного рычага, позволяющего совершать движения в горизонтальной плоскости. Две обезьяны Масаса

mulatta прошли предварительное обучение управлению движением маркера в визуальном рабочем пространстве с помощью джойстика.

Исследования проводятся при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-29-08187 офи-м).

Литература

1. Bensmaia S.J., Miller L.E. Restoring sensorimotor function through intracortical interfaces: progress and looming challenges // Nature. Rev. Neurosci. - 2014. - V. 15. - P. 313.
2. Dadarlat M.C., O'Doherty J.E., Sabes P.N. A learning-based approach to artificial sensory feedback leads to optimal integration // Nature Neurosci. -2015. - V. 18. - P. 138.
3. Graziano M.S.A., Taylor C.S.R., Moore T. Complex movements evoked by microstimulation of precentral cortex // Neuron. - 2002. - V. 34. - P. 841.
4. Jones L.A., Smith A.M. Tactile sensory system: encoding from the periphery to the cortex // WIREs Syst. Biol. Med. - 2014. - V. 6. - P. 279.
5. Lebedev M.A., Nicolelis M.A.L. Brain–machine interfaces: past, present and future // Trends Neurosci. – 2006. – V. 29. - N9. – P. - 536-546.
6. O'Doherty J.E., Lebedev M.A., Ifft P.J. et al. Active tactile exploration enabled by a brain-machine-brain interface // Nature. - 2011. - V. 479. - № 7372. - P. 228.
7. Roschin V.Y., Frolov A.A., Burnod Y., Maier M.A. A neural network model for the acquisition of a spatial body scheme through sensory-motor interaction // Neural Computation. – 2011. – V. 23. – N7. - P. - 1821-34.
8. Shenoy K.V., Sahani M., Churchland M.M. Cortical control of arm movements: a dynamical systems perspective // Annu. Rev. Neurosci. - 2013. - V. 36. - P. 337.
9. Venkatraman S., Carmena J.M. Active sensing of target location encoded by cortical microstimulation // IEEE Trans. Neural. Syst. Rehab. Eng. - 2011. - V. 19. - № 3. - P. 317.
10. Wang W., Collinger J.L., Perez M.A. et al. Neural interface technology for rehabilitation: exploiting and promoting neuroplasticity // Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am. - 2010. - V. 21. - № 1. - P. 157.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЭВОЛЮЦИОННО-КОНСЕРВАТИВНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ЛЕЙКОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА: РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СТАРЕНИЯ И ДОЛГОЛЕТИЯ

Эрдман В.В., Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Мустафина О.Е.
Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия
vera_erd@mail.ru

Резюме

Проведен функциональный анализ уровня экспрессии 168 генов IL6/STAT3- и mTOR-сигналинга у 18 здоровых лиц в возрасте от 23 до 100 лет, разделенных на группы среднего, старческого возраста и долгожителей. Получены данные о снижении транскрипционной активности ряда генов IL6/STAT3- и mTOR-сигналинга с возрастом. Экспрессия гена NFKB1 возрастает в группе лиц старческого возраста и снижается у долгожителей.

Ключевые слова: долголетие человека, старение, продолжительность жизни, экспрессия генов, IL6/STAT3-, mTOR-, NFkB-сигнальные пути.

GENE EXPRESSION OF EVOLUTION-CONSERVATIVE SIGNALING PATHWAYS IN HUMAN LEUKOCYTES: RESULTS OF MOLECULAR-GENETIC STUDY OF AGING AND LONGEVITY

Erdman V.V., Nasibullin T.R., Tuktarova I.A., Mustafina O.E.
Institute of biochemistry and genetics of Ufa scientific centre of RAS, Ufa, Russia
vera_erd@mail.ru

Abstract

A functional analysis of expression level of 168 IL6/STAT3- and mTOR- signaling pathways genes in 18 healthy individuals aged from 23 to 100 years, divided into groups of middle-age, aging and long-livers, was performed. It was found, that the transcription activity of a number of IL6/

STAT3- and mTOR-signaling pathways genes is decrease with age. NFKB1 gene expression increases in aging group and decreases among long-livers.

Keywords: human longevity, aging, lifespan, gene expression, IL6/STAT3-, mTOR-, NFkB-signaling pathways.

Введение. Современная демографическая картина мира характеризуется существенным старением населения, что приводит к увеличению доли лиц, страдающих возраст-ассоциированными заболеваниями. Вследствие этого актуальной задачей является идентификация молекулярно-генетических факторов, обеспечивающих продление активного возрастного периода с сохранением физической, психической, умственной активности и, в целом, способствующих успешному долголетию.

Установление взаимосвязей метаболических и сигнальных путей, формирующихся в организме при старении, возможно при анализе экспрессии генов в разные возрастные периоды жизни. Показатель уровня экспрессии гена можно расценивать как количественный генетический маркер возрастных изменений того или иного признака. Транскрипционная активность (ТА) генов исследована в клетках различных тканей, в том числе в клетках крови, при старении модельных организмов и человека. Обнаружены эволюционно консервативные ключевые механизмы старения, имеющие в своей основе изменение экспрессии генов достаточно древних в эволюционном плане метаболических и сигнальных путей. Это позволяет признать существование эволюционно консервативных механизмов регуляции продолжительности жизни [6].

Так, предполагается, что изменения, свойственные организму при старении, являются нарушением баланса между воспалительными и противовоспалительными системами, что приводит к развитию хронического вялотекущего системного воспаления. В реализации множественных эффектов широкого спектра цитокинов и факторов роста, а также при регулировании дифференцировки, про- и противовоспалительной активности иммунных клеток важную роль играет IL6/STAT3-путь сигнальной трансдукции.

Было выявлено снижение риска возникновения заболеваний, ограничивающих продолжительность жизни, – сердечно-сосудистых, онкологических, болезни Альцгеймера – при воздействии препаратом

рапамицин [1, 7, 9]. Основные сигнальные пути, которые блокирует рапамицин, интегрированы в единый молекулярный комплекс, идентифицированный как mTOR (mammalian target of rapamycin). mTOR-путь играет важную регуляторную роль в выживании и росте клеток в ответ на разнообразные сигналы, обусловленные уровнем питательных веществ и энергии в клетке, окислительно-восстановительным статусом, тесно связан с процессами, запускаемыми голоданием, участвует в воспалительном и иммунном ответе [5]. Несмотря на то, что mTOR характеризуют как ключевую молекулу старения и ассоциированных с возрастом заболеваний, механизм влияния mTOR-сигналинга на старение человека остается неясным [4, 5].

Цель работы заключалась в анализе уровня экспрессии основных генов IL6/STAT3- и mTOR-сигнальных путей в лейкоцитах крови людей разного возраста, включая долгожителей.

Методы исследования. Материалом исследования послужили 18 образцов РНК, полученных из лейкоцитов периферической венозной крови женщин в возрасте от 23 до 100 лет, не родственных между собой, принадлежащих к одной этнической группе (татары, проживающие в Республике Башкортостан). Выборка была подразделена на три группы согласно возрастной градации: среднюю (23-32 года), старческую (82-88 лет) и долгожителей (90-100 лет).

Очистку полученных образцов РНК от примесей геномной ДНК и построение первой цепи кДНК осуществляли с использованием набора «RT² First Strand Kit» в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя («Qiagen», США). Количественный анализ содержания мРНК генов в лейкоцитах крови проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием 96-луночных плашек PAHS-160YA-12 (RT2 Profiler™ PCR Array, Human IL6/STAT3 Signaling Pathway, «Qiagen», США) и PAHS-098ZA-12 (RT2 Profiler™ PCR Array, Human mTOR Signaling, «Qiagen», США). В совокупности плашки содержали праймеры к 168 ключевым генам IL6/STAT3- и mTOR-сигнального пути.

Относительное содержание мРНК исследуемых генов определяли с помощью r/Ct-метода с применением программного обеспечения «RT2 Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5», размещенного на сайте производителя (Qiagen, www. qiagen.com, http://pcrdataanalysis.

sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php). Разницу в уровне экспрессии генов между группами лиц разного возраста (fold regulation – FR) считали статистически значимой при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Выявлены гены IL6/STAT3- и mTOR-сигнальных путей, дифференциально экспрессирующиеся в лейкоцитах крови у людей старческого возраста и долгожителей.

Уровень ТА генов CXCL10, IL1A, TNF, IL3, IL23A, FASLG и CD40 понижен у лиц старческого возраста и долгожителей, по сравнению с таковым у лиц зрелого возраста ($FR<-2,0$, $p<0,05$). В старческом возрасте, по сравнению со зрелым, ниже показатели ТА генов IL10 (FR=-2,58), IL11 (FR=-2,44), LIF (FR=-2,84) и выше ТА гена NFKB1 (FR=2,67). Среди долгожителей ТА генов LTA (FR=-3,92), HGF (FR=-3,06), MYC (FR=-3,15) и SOCS1 (FR=-2,78) ниже, чем у лиц зрелого возраста. Уровень ТА гена NFKB1 в группе долгожителей, по сравнению группой лиц зрелого возраста, снижен (FR=-2,72).

Выявленные нами гены с измененной ТА относятся к генам цитокинов и белков, участвующих в IL6/STAT3- и NFkB-сигнальной трансдукции. Плейотропные эффекты этих белков определяют выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование их роста, дифференцировку, функциональную активацию и апоптоз. Они образуют сложнейшую молекулярную сеть, объединяющую разные сигнальные пути и регулирующую многие процессы в организме. Полученные результаты соответствуют гипотезе о роли хронического воспаления в развитии возраст-зависимых заболеваний и старения [2], а также подтверждают на молекулярно-генетическом уровне принятую концепцию, согласно которой при старении развивается сбалансированный Т-иммунодефицит вследствие снижения Т- и В-клеточного иммунного ответа, нарушаются взаимодействия между Т- и В-клетками, изменяется спектр вырабатываемых цитокинов [10].

Обнаружение более высокого уровня экспресии гена NFKB1 у лиц старческого возраста является одним из ключевых результатов исследования. И этот результат представляет еще большую значимость в связи с тем, что у долгожителей уровень экспрессии гена NFKB1 понижен. Повышение уровня экспрессии гена NFKB1 в старческом возрасте согласуется с концепцией о роли NFkB в старении, согласно которой

старение характеризуют как энтропийный дегенеративный процесс, приводимый в движение NFkB-сигналингом [8].

В группе женщин старческого возраста, в сравнении с лицами среднего возраста, статистически значимо понижен уровень мРНК генов PRKCA (FR=-5,43), RPS6 (FR=-4,94), AKT3 (FR=-4,49), VEGFB (FR=-3,94), EIF4E (FR=-3,38), HSPA4 (FR=-2,95), PRKAB2 (FR=-2,64), YWHAQ (FR=-2,49), RRAGB (FR=-2,42), TSC1 (FR=-2,35), MTOR (FR=-2,31), VEGFA (FR=-2,27), CAB39L (FR=-2,21), EIF4B1 (FR=-2,16), RPS6KB1 (FR=-2,10) и PIK3CA (FR=-2,05).

Данные гены образуют единую сеть взаимодействий, в которой главенствующее по числу связей положение занимают MTOR и RPS6KB1. Ген MTOR кодирует серин-треонин-протеин киназу, которая играет центральную роль в регуляции клеточного метаболизма, роста, выживаемости в ответ на влияние гормонов, факторов роста, нутриентов, энергетических сигналов и стресс. Ген RPS6KB1 кодирует серин-треонин киназу рибосомального белка S6, которая в ответ на факторы роста и нутриенты стимулирует пролиферацию и рост клеток, а также прогрессию клеточного цикла через фосфорилирование EIF4B, RPS6, EEF2K. Наблюдаемое нами снижение экспрессии генов MTOR и RPS6KB1 означает снижение биогенезиса рибосом и синтеза белков в старческом возрасте.

Среди долгожительниц обнаружено повышение уровня экспрессии генов RRAGB (FR=2,20) и ULK2 (FR=3,17) относительно такового в старческой группе. Ген ULK2 кодирует серин-треонин-протеинкиназу, вовлеченную в процессы аутофагии в ответ на старвацию и действующую как «даун-стрим» эффектор и негативный регулятор mTORC1 через взаимодействие с RPTOR. Ген RRAGB кодирует белок (Ras-related GTP binding B), который играет критическую роль в активации mTOR-сигналинга посредством аминокислот. В связи с этим можно полагать, что при долгожительстве активно поддерживаются процессы биосинтеза и аутофагии, необходимые для утилизации поврежденных молекул.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности IL6/STAT3- и mTOR-сигналинга и возрастании активности NFkB-сигнального пути в клетках крови с возрастом. Полагают, что ингибирование mTOR-сигналинга при старении важно для выжива-

ния [3]. Развитие сбалансированного Т-иммунодефицита при старении [10] подтверждается полученными данными о снижении ТА генов IL6/STAT3-сигнального пути. Повышение уровня экспрессии гена NFKB1 с возрастом может указывать на роль NFkB-сигналинга в инициации дегенеративных старческих процессов [8]. О возможном ингибировании NFkB-сигнального пути свидетельствует снижение ТА гена NFKB1 у долгожителей.

Литература

1. Alayev A., Salamon R. S., Schwartz N. S. et al. Combination of Rapamycin and Resveratrol for Treatment of Bladder Cancer // Journal of cellular physiology. – 2017. – V. 232, N 2. – P. 436-446.
2. Baylis D., Bartlett D.B., Patel H.P., Roberts H.C. Understanding how we age: insights into inflammaging // Longevity and healthspan. – 2013. – T. 2, N 1. – C. 8.
3. Bjedov I., Partridge L. A longer and healthier life with TOR down-regulation: genetics and drugs // Biochemical Society Transactions. – 2011. –V. 39, N 2. – P. 460-465.
4. Johnson S.C., Martin G.M., Rabinovitch P.S., Kaeberlein M. Preserving youth: does rapamycin deliver? // Science translational medicine. – 2013. – V. 5, N 211. – C. 211fs40-211fs40.
5. Kennedy B.K., Lamming D.W. The mechanistic target of rapamycin: the grand conductor of metabolism and aging // Cell Metabolism. – 2016. – V. 23, N 6. – P. 990-1003.
6. Pitt J.N., Kaeberlein M. Why is aging conserved and what can we do about it? // PLoS biology. – 2015. – V. 13, N 4. – P. e1002131.
7. Richardson A., Galvan V., Lin A.L., Oddo S. How longevity research can lead to therapies for Alzheimer's disease: The rapamycin story // Experimental gerontology. – 2015. –V. 68. – P. 51-58.
8. Salminen A., Kaarniranta K. NF-κB signaling in the aging process // Journal of clinical immunology. – 2009. – V. 29, N 4. – P. 397-405.
9. Sciarretta S., Volpe M., Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease // Circulation research. – 2014. – V. 114, N 3. – P. 549-564.
10. Vasto S., Malavolta M., Pawelec G. Age and immunity // Immunity & Ageing. – 2006. – V. 3, N 1. – P. 2.

ПРОБЛЕМЫ ЛИНГВИКО-СОЦИОКУЛЬТУРНОЙ АДАПТАЦИИ РУССКОГО ВАРИАНТА ТЕСТА (MMSE) К АБХАЗСКОМУ ЯЗЫКУ

Григорьев М.В., Макаревская Ю.Э., Миквабия З.Я.
Научно исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Сухум, Абхазия.
amisha3000@mail.ru

Резюме

В статье представлены этапы и результаты лингвико–социокультурной адаптации русского варианта методики «Mini Mental State Examination» (Краткая шкала оценки психического статуса) к абхазскому языку.

Данная скрининговая методика рекомендована к применению в диагностической работе в неврологических и психиатрических клиниках для оценки когнитивных нарушений.

Методика переведена с русского на абхазский язык, определена ретестовая надежность адаптированной методики, подтверждены нормы.

Русскоязычный и абхазский варианты методик предъявлялись в контрольных и экспериментальных группах без изменения сути инструкции с необходимым перерывом во времени.

Ретестовая надежность шкал определялась на выборке n = 60. Полученные результаты свидетельствуют о высокой устойчивости диагностируемых показателей.

Полученные результаты дают основание использовать методику «Mini Mental State Examination» (Краткая шкала оценки психического статуса) в адаптированном варианте (переведённом на абхазский язык) для диагностики психического статуса личности, в том числе для оценки когнитивных нарушений.

Ключевые слова: психодиагностика, психометрика, психический статус личности, когнитивные нарушения личности.

PROBLEMS OF LINGUISTIC-SOCIOCULTURAL ADAPTATION OF THE RUSSIAN VERSION OF THE TEST (MMSE) TO THE ABKHAZIAN LANGUAGE

Grigoryev MV, Makarevskaya Yu.E., Mikvabiya Z.Ya.
Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy Sukhum, Abkhazia.
Amisha3000@mail.ru

Abstract.

The article presents the stages and results of the linguistic-socio -cultural adaptation of the Russian variant of the "Mini Mental State Examination" methodology to the Abkhazian language.

This screening technique is recommended to use in diagnostic work in neurological and psychiatric clinics to assess cognitive impairment.

The methodology has been translated from Russian into Abkhazian, the retest reliability of the adapted methodology has been determined, and the norms have been confirmed.

The Russian and Abkhazian language variants of the methodologies were presented in control and experimental groups without changing the essence of the instruction with the necessary break in time.

The retest reliability of the scales was determined on the sample of n = 60. The obtained results testify to the high stability of the diagnosed parameters.

The obtained results give the basis to use the "Mini Mental State ¬Examination" technique in the adapted version (translated into the Abkhazian language) for the diagnosis of the mental status of the individual, including the evaluation of cognitive impairments.

Key words: psychodiagnostics, psychometrics, mental status of the individual, cognitive personality impairments.

Введение. В Республике Абхазия в образовательной среде и в быту достаточно широко распространен русский язык, тем не менее, проблема лингвико-социокультурной адаптации психодиагностического инструментария с каждым годом набирает свою актуальность и тем

самым формирует стремление исследователей в решении данной проблемы.

Актуальность данной работы вызвана отсутствием в настоящий момент в Республике Абхазия адаптированной методики по определению психического статуса пациента на абхазском языке, в связи, с чем данная работа имеет практическую значимость.

Оценка психического статуса пациента – одна из основополагающих процедур при общении врача-психиатра, психотерапевта, невролога, клинического психолога с пациентом.

Начинается данная процедура при первой встрече специалиста с пациентом (клиентом) и продолжается в процессе беседы по анамнезу (жизни и болезни).

Прежде чем поставить диагноз, специалист изучает психическое состояние своего пациента, затем он анализирует информацию, которую получает в качестве его ответов, оценивает вербальные и невербальные компоненты поведения.

Неотъемлемой частью психического статуса личности пациента являются когнитивные процессы (восприятие, внимание, память, мышление), которые определяют восприятие информации из окружающего мира, её переработку, оценку, сохранение и воспроизведение.

Психический статус носит описательно-информативный характер и формируется в основном на основе наблюдения. Однако, это не единственный метод и для построения психологического (психопатологического) «портрета» личности пациента специалисты используют диагностические методики, экспериментальные пробы, повышающие его достоверность.

То есть для верификации диагноза врачи клиницисты нередко используют результаты экспериментально-психологического исследования, проводимого клиническими психологами. Специалисты-психологи, решая поставленные перед ними задачи, в своей работе используют стандартизированные методики, которые отвечают критериям надежности и валидности, с целью получения от исследования достоверных результатов.

Методики для определения психического статуса разработаны, применяются специалистами в разных сферах: медицине, педагогике,

психологии управления, психотерапии, психологическом консультировании и др. [4]. Однако на практике специалисты сталкиваются с тем, что применение уже разработанной и хорошо себя зарекомендовавшей методики невозможно в связи с языковыми барьерами. На постсоветском пространстве такие барьеры возникают все чаще на фоне введения государственных языков, в связи с чем, психодиагностический инструментарий на русском языке стал терять свою актуальность.

Помимо клинических психологов, ввиду встречающегося языкового барьера, испытывают трудности и врачи-клиницисты, которые в качестве диагностического инструментария в своей работе применяют скрининговые методики для определения психического статуса пациента.

В данной статье заявленная проблема представлена на примере адаптации русскоязычной версии Краткой шкалы оценки психического статуса (MMSE) к абхазскому языку.

То есть целью работы было проведение лингвико–социокультурную адаптацию русского варианта теста (MMSE) к абхазскому языку.

Исследование.

Как уже говорилось выше, необходимость адаптации русского варианта теста MMSE [1] к абхазской выборке была актуализирована самой ситуацией применения, когда из-за языковых барьеров специалисты утратили доверие к хорошо известному и надёжному диагностическому инструменту.

Краткая шкала оценки психического статуса (англ. Mini Mental State Examination, MMSE) – короткий опросник из 30 пунктов, широко используемый для первичной оценки состояния когнитивных функций и скрининга их нарушений, в том числе, деменции. Исследование занимает 5-10 минут времени и очень легко поддаётся обработки. Данная методика также может использоваться для оценки динамики когнитивных функций на фоне проводимой терапии.

Процедура адаптации включала несколько этапов:

1. Перевод и социокультурная адаптация методики.
2. Формирование выборки:

2.1. формирование контрольной группы (n=60 чел.).

2.2. формирование экспериментальной группы билингвальных респондентов (n=60 чел.)

3. Проведение проверочных процедур тестирования и ретестирования.

4. Математико-статистическая обработка полученных данных.

Итак, начнем с перевода.

Перевод русского варианта методики на абхазский язык производился старшим научным сотрудником, кбн, Квициния П.К. Абхазского института гуманитарных исследований им. Д.И. Гулия Академии наук Абхазии.

В ходе перевода русскоязычного варианта методики Краткая шкала оценки психического статуса возникла не столько лингвистическая, сколько социокультурная проблема, которая выражалась в том, что при назывании слова Адгьыл (слово «земля» по абхазский) в обратном порядке, что требует инструкция при выполнении задания, образуется слово не соответствующее нормативной лекции, в связи с чем, перед исследователями возникла необходимость заменить данное слово на другое. Данная замена была произведена и в адаптированном варианте.

Таким образом, перевод методики был благополучно осуществлён, и мы перешли к следующему этапу адаптации.

Результаты.

В контрольной группе было проведено тестирование русскоязычной методикой MMSE (n=60). Контрольную группу составили 60 человек из которых было равное количество мужчин и женщин молодого (18-44) и зрелого (45-59) возраста, имеющие образование не ниже среднего. Распределение выборки по уровню образования показано ниже на рис.1.

Рис.1

Тестирование и ретестирование было проведено в контрольной группе с промежутком в 1 месяц. Результаты показаны соответственно: *Мар*.=29,55; *Мо* =30; *Мар*.=29,53, *Мо*=30.

Экспериментальную группу также составили 30 мужчин и 30 женщин молодого (18-44) и зрелого (45-59) возраста, имеющие также образовательный уровень не ниже среднего (рис.2):

Рис. 2

В экспериментальную группу вошли респонденты, владеющие и русским и абхазским языком. В этой группе были проведены 2 серии тестирования: русскоязычной адаптированной версией MMSE и версией данной методики, переведённой на абхазский язык. Промежуток между тестированиями составил 14 дней.

То есть именно в данной выборке были проведены процедуры проверки ретестовой надежности, так как было важно проверить устойчивость к ретестированию адаптированной методики, и проверка тестовых норм методики путем сравнения с заявленными нормами в русскоязычной версии MMSE.

Адаптация методики была проведена с соблюдением всех требований к данной процедуре, а именно:

1. Инструкции сообщались испытуемым одним и тем же образом, с одной и той же интонацией.
2. У испытуемых не было преимуществ друг перед другом.
3. Не давались никакие пояснения, кроме пояснений, предусмотренных инструкцией методики.
4. Обследования в разных группах были проведены в одних и тех же условиях.

5. Для всех испытуемых были предоставлены одинаковые временные ограничения.

Далее был проведен статистический анализ полученных экспериментальных данных, целью которого было определение достоверности результатов тестирования адаптированным вариантом методики MMSE после её переконструирования с учетом культурной среды (на примере перевода русскоязычной версии на абхазский язык). Результаты (средние значения) тестирования по 2-м сериям получены идентичные (r=0,98).

Выводы.

Ретестовая надежность адаптированного варианта методики MMSE определялась на выборке n = 60, опрошенных с интервалом 14 дней.

Проверка надёжности свидетельствует о высокой устойчивости диагностируемых показателей.

То есть, подводя итог, можно сделать вывод, что результаты, характеризующие ретестовую надежность, дают основание использовать методику MMSE в научных исследованиях и практической работе специалистов с пациентами говорящими на абхазском языке. Данная методика дает основания делать специалистам (клиническим психологам, психиатрам, психотерапевтам, неврологам) обоснованные выводы о психическом статусе пациентов/клиентов и вариантах когнитивных нарушений (при наличии).

Литература

1. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR . «Mini-mental state». A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. Journal of psychiatric research 1975;12 (3): 189–98.
2. «Руководство по психиатрии», Том№2, под редакцией академика РАМН А.С. Тиганова, Москва 1999 год -134с.
3. Яхно Н.Н. Актуальные вопросы нейрогериатрии. – В кн.: Достижения в нейрогериатрии. Под ред. Н.Н. Яхно, И.В. Дамулина. М., ММА, 1995; 9–29с.
4. Практическая психодиагностика. Методики и тесты» Самара , Изд. дом. «БАХРАХ – М» , 2000 г. 164с.

5. Большой психологический словарь / Сост. и общ. ред. Б. Мещеряков, В. Зинченко. – СПб., 2003. 624с.
6. Психология старения. Ян Стюарт-Гамильтон, 4-е издание, под научно редакцией д.пс.н., профессора Рудкевича. Изд. ПИТЕР, 2010 год -205с.
7. Леманн-Хорн Ф., Лудольф А. Лечение заболеваний нервной системы.- М.:МЕДпресс-информ,2005-528с.
8. Комплексная диагностика сосудистых деменциям, пособие для врачей, Санкт-Петербург 2007 год – 23с.
9. Дамулин И.В. Когнитивные наршения сосудистого генеза.//Трудный пациент-2006-Т.4,№7- 53-58с.
10. Шоломов И.И., Орнатская Н.А., Основы нейропсихологии, издательство СГМУ, Саратов 2010 -121с.
11. «Деменция иллюстрированное руководство», Х. Фёрстл, А. Мелике, К. Вайхель, од общ. ред. О.С.Левина, Москва МЕДпресс-информ, 2011 год -12с.

СОДЕРЖАНИЕ

АҨХЬАЖӘА
Амқәаб З. И.……3
ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО
Миквабия З. Я.……11
OPENING OF THE CONFERENCE
Mikvabiya Z. YA.……19

I. ПРИМАТОЛОГИЯ: ИНФЕКЦИОННАЯ ПАТОЛОГИЯ, ИММУНИТЕТ, КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ПРИМАТОВ, ГЕМОСТАЗ, ПОВЕДЕНИЕ, РАЗНОЕ……27
I. PRIMATOLOGY: INFECTIOUS PATHOLOGY, IMMUNITY, PRIMATE CELL CULTURES, HEMOSTASIS, BEHAVIOR, MISCELLANEOUS……27

Результаты многолетних исследований вирусной патологии обезьян сухумского питомника и моделирования на них инфекции человека
Шевцова З. В.……28
The result of long-term stadies of viral pathology in monkeys of sukhum nursery and modeling of human infections on them
Shevtsova Z.V.……29
Роль приматов в открытии и изучении прионных болезней
В. А. Зуев……46
Role of primates in discover and study of prion diseases
V. A. Zuev……46

История развития лаборатории инфекционной патологии: создание биологических моделей для изучения бактериальных заболеваний человека
Лапин Б. А., Аршба И. М., Стасилевич З. К., Джикидзе Э. К.……53
The history of the progress of the laboratory of infectious pathology: creating biological models to study the human bacterial diseases

Lapin B. A., Arshba I. M., Stasilevitch Z. K., Dzhikidze E. K.……53
Микоплазменные инфекции у обезьян, результаты многолетних исследований
Аршба И. М., Раковская И. В.……63
The results of long-term studies of mycoplasma infections in monkeys
Arshba I.M., Rakovskaya I.V. ……63

Идентификация энтеробактерий у обезьян сухумского питомника
Аршба И. М., Агрба С. Л., Смыр С. Р., Лалыкина О. С., Аргун Э. Н., Чанба А. Г., Ардашелия С. Н.……69
Identification of enterobacteria in monkeys of the sukhum nursery
Arshba I. M., Agrba S. L., SmyrS. R., Lalykina O. S., Argun, E. N., Chanba A. G., Ardashelia S. N.……70

Сравнительное изучение реакции организма обезьян при экспериментальном интраназальном введении рекомбинантных аттенуированных и вирулентных бактерий bordetella pertussis
А. А. Амичба, А. Ю. Медкова, А. З. Матуа, Л. Н. Синяшина, Е. Г. Семин, Кубрава Д. Т., Конджария, В. С. Баркая, З. В. Шевцова, З. Я. Миквабиа, Г. И. Каратаев……76
The comparative study of non-human primates body reaction to experimental intranasal administration of recombinant attenuated and virulent bordetella pertussis bacteria
A. A. Amichba, A. Yu. Medkova, L. N. Sinyashina, E. G. Semin, A. Z. Matua, D. T. Kubrava, I. G. Kondzariya, V.S.Barkaiy, Z.V. Shevtsova , Z. Ya. Mikvabia, G. I. Karataev……77

Протозойные инвазии при острых кишечных заболеваниях у обезьян
Егорова Т. П.……89
Protozoa invasions in acute intestinal diseases in monkeys
Egorova T. P.……89

Динамический анализ особенностей этиологической структуры микрофлоры, выделенной у обезьян при пневмониях

Калашникова В. А., Султанова О. А., Демерчян А. В.……95
Dynamic analysis of the caracteristics of the ethiological structure of microflora, isolated at pneumonia in monkeys
Kalashnikova V. A., Sultanova O. A., Demerchyan A. V.……95

Распространённость заболеваемости острыми кишечными инфекциями и этиологическая структура микробной флоры у обезьян, живущих в условиях неволи
Калашникова В. А., Султанова О. А.……102
The prevalence of morbidity of acute intestinal infections and ethiological structure of microb flora in captivity monkeys
Kalashnikova V. A., Sultanova O. A.……103

Биологические особенности и антибиотикочувствительность условно-патогенных энтеробактерий у обезьян при патологии кишечника
Высоцкая В. И., Аршба И. М., Демерчян А. В.……109
Biological features and antibiotic sensitivity of opportunistic enterobacteria in intestinal pathology of monkeys
Vysotskaya V. I., Arshba I. M., Demerchyan A.V.……110

Оценка терапевтической эффективности препаратов бифидобактерий на обезьянах
Давыдкин В. Ю., Лапин Б. А., Мелихова А. В.,
Джикидзе Э. К., Давыдкин И. Ю., Кебу Т. И.,
Климова Э. В., Холодилова Л. И., Жиленкова О. Г.……118
Evaluation of the therapeutic efficacy of the bifidobacterium drugs on monkeys
Davydkin V. U., Lapin B. A., Melikhova A. V., Dzhikidze E. K., Davydkin I. U., Kebu T. I., Klimova E. V.[3], Holodilova L. I., Gilenkova O. G.……119

Изучение тератогенности вакцинных штаммов вируса краснухи в эксперименте на обезьянах macaca rhesus
Лаврентьева И. Н., Вышемирский О. И., Агрба В. З., Сухобаевская Л. П., Гвоздик Т. Е., Леонтюк А. В., Карал-Оглы Д. Д., Шамсутдинова О. А., Симавонян К. В.……124

Study of the teratogenicity of rubella virus vaccine strains in experiment on macaca rhesus monkeys
Lavrenteva I. N., Veshemirski O. I., Agrba V. Z., Suchobaevskaya L. P., Gvozgik T. E., Leontuk A.V., Chikobava M.G., Shamsutdinova O. A., Simavoniyn K. V.……125

Клиническое значение молекулярной диагностики при инфекционныхзаболеваниях
Шахгильдян В.И., Ядрихинская М. С., Шипулина О.Ю., Сафонова А.П., Альварес Фигероа М.В., Домонова Э.А., Тишкевич О. А.……135
The clinical role of molecular methods in diagnosis of infection diseases
Shakhgildyan V.I., Yadrikhinskaya M.S., Shipulina O.Y., Safonova A.P., Alvares-Figueroa M.V., Domonova E.A, Tishkevich O.A.……136

Анализ циркулирующих зоонозов в малоизученных резервуарах
Алексеев А.Ю., Адаменко Л.С., Гуляева М.А., Дерко А.А., Шестопалов А.М.……149
Study of the circulating zoonotic diseases pathogens in understudied reservoirs
Alekseev A.Yu., Adamenko L.S., Gulyaeva M.A., Derko A.A., Shestopalov A.M.……150

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в субтропической зоне России
Ткаченко Е.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Курашова С.С., Баловнева М.В., Мутных Е.С., Морозов В.Г., Юничева Ю.В., Пиликова О.М., Завора Д.Л., В.А. Бахтина, Городин В.Н.……160
Hemorrhagic fever with renal syndrome in subtropical zone of Russia
Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Kurashova S.S., Balovneva M.V., Mutnih E.S., Morozov V.G., Yunicheva Yu.Yu., Pilikova O.M., Zavora D.L., Bakhtina V.A., Gorodin V.N.……161

Разработка экспериментальной от-ПЦР тест-системы реального времени для детекции каридиовирусов группы А
Калайджян А.А., Агумава А.А.,
Вышемирский О.И., Лапин Б.А.……171
Development of the experimental real-time pcr test system for detection of the viruses of the cardiovirus-a species
Kalaydzhyan A. A., Agumava A. A.,
Vyshemirskii, O. I., Lapin B.A.……172

Specific probiotics modulate gut microflora in Chronically hiv-infected adults
Dyachenko A.G., Horobchenko E.N.……181

Рациональный подбор диагностикумов для оценки иммуноглобулинового профиля макак резусов
Рубальский Е.О., Алешкин В.А., Афанасьев С.С.,
Орлов С.В., Караулов А.В., Теплый Д.Л., Лапин Б.А.,
Джикидзе Э.К., Алешкин А.В., Рубальский О.В.,
Рубальская Е.Е., Аршба И.М., Бочкарева С.С., Даудова А.Д., Афанасьев М.С., Ахминеева А.Х., Рубальский М.О.,
Зулькарнеев Э.Р., Смирнова К.Н.……190
Rational selection of the kits for evaluation of the macaque rhesus immunoglobulin profile
Rubalskii E.O., Aleshkin V.A., Afanasiev S.S., Orlov S.V., Karaulov A.V., Tepliy D.L., Lapin B.A., Dzhikidze E.K., Aleshkin A.V., Rubalsky O.V., Rubalskaya E.E., Arshba I.M., Bochkareva S.S., Daudova A.D., Afanasiev M.S., Akhmineeva A.Kh., Rubalsky M.O., Zulkarneev E.R., Smirnova K.N.……191

Доклиническое изучение на приматах интраназальной формы комплексного иммуноглобулинового препарата
Волков А.В., Новикова Л.И., Алёшкин В.А.,
Зуева М.М., Матвеевская Н.С., Синчугова Т.В.,
Панурина Р.Л., Аршба И.М., Вышемирский О.И.,
Джикидзе Э.К., Чугуева И.И.……198

A preclinical study of intranasal form of the complex immunoglobulin preparation in primates
Volkov A.V., Novikova L.I, Aloyshkin V.A., Zueva M.M., Matveevskaya N.S., Sinchugova T.V., Panurina R. L., Arshba I.M., Vyshemirsky O. I., Dzhikidze E.K., Chugueva I.I.……198

Итоги изучения лимфоидных суспензионных культур клеток лабораторных приматов. Использование клеточных технологий в регенеративной медицине
Агрба В.З., Лапин Б.А., Яковлева Л.А., Тимановская В.В., Инджия Л.В., Деменкова Н.П., Порханов В.А., Коноплянников А.Г., Кальсина С.Ш., Сангулия И.А., Кове Э.М., Карал-оглы Д.Д., Гвоздик Т.Е., Мухаметзянова Е.И., Аравиашвили Д.Э., Чугуев Ю.П., Клоц И.Н., Чувиров Г.Н., Миквабия З.Я.……206
Results of study of laboratory primate lymphoid suspension cell cultures. Application of cell technologies in regenerative medicine
Agrba V.Z., Lapin B.A., Yakovleva L.A., Timanovskaya V.V., Indzhia L.V., Demenkova N.P., Porkhanov V.A., Konopliannikov A.G., Kalsina S.Sh., Sangulia I.A., Kove E.M., Karal-ogly D.D., Gvozdik T.E., Mukhametzianova E.I., Araviashvili D.E., Chuguev Yu.P., Klots I.N., Chuvirov G.N., Mikvabia Z.Ya.……207

Исследование действия доксорубицина на вирусиндуцированный опухолевый процесс у кроликов
Тимановская В.В., Агрба В.З., Миквабия З.Я., Саджая Е.Н., Киласония Э.Ф., Аргун Э.Н.……221
The effect of doxorubicin on the virus-induced tumor process in rabbits
Timanovskaya V. V., Agrba, V. Z., Mikvabia Z. J., Sajaia E. N., Kilasonia E. F., Argun, E. N.……222

Оценка показателей крови, гемостаза и сердечно-сосудистой системы макак яванских (macaca fascicularis) адлерского питомника
Карал-оглы Д.Д., Деменкова Н.П., Мухаметзянова Е.И.,

Агумава А.А., Бакшеева Е.В., Клоц И.Н., Агрба В.З.……229
Evaluation of blood, hemostasis and cardiovascular system parameters of the Long-tailed monkeys (Macaca fascicularis) in Adler monkey colony
Karal-ogly D.D., Demenkova N.P., Mukhametzyanova E.I., Agumava A.A., Baksheeva E.V., Klots I.N., Agrba V.Z.……230

Динамика гемостаза у обезьян молодого возраста
Фоменко В.Н., Баркая В.С., Хашиг Н.Э., Миквабия З.Я.……239
Hemostasis dynamics in junior aged monkeys
Fomenko V.N., Barkaya V.S., Khashig N.E., Mikvabia Z.Ya.……240

Динамика гемостаза у обезьян старшего возраста
Фоменко В.Н., Баркая В.С., Хашиг Н.Э., Миквабия З.Я.……253
Hemostasis dynamics in senior aged monkeys
Fomenko V.N., Barkaya V.S., Khashig N.E., Mikvabia Z. Ya.……253

Действие фенилгидразина на некоторые функциональные системы обезьян при длительном введении в малых дозах
Сабекия Ж.Д., Баркая В.С., Елистратова Ж.В.,
Фоменко В.Н., Ахуба Л.О., Алексян А.А., Джокуа А.А.,
Кулава Н., Шевцова З.В., Матуа А.З.……266
Effect of phenylhydrazin on some functional systems of monkeys at prolonged introduction in small doses
Sabekia Zh.D., Barkaya V.S., Elistratova Zh.V.,
Fomenko V.N., Akhuba L.O., Aleksian A.A., Dzhokua A.A.,
Kulava Z., Shevtsova Z.V., Matua A.Z.……267

Оценка функционального состояния системы гемостаза в условиях экспериментального светового десинхроноза
Антонова В.М., Журкин К.И., Злобина О.В., Андронова Т.А.…272
Evaluation of the functional state of the hemostasis under conditions of experimental light-induced desynchronosis
Antonova V.M., Zhurkin K.I.……272

Влияние дегидроэпиандростерона на высшую нервную деятельность обезьян Сухумского питомника
Аргун С.Н., Джокуа А.А., Кулава З., Баркая В.С.,
Миквабия З.Я.……277

Effect of dehydroepiandrosterone on higher nervous activity of the Sukhumi monkey nursery
Argun S.N., Dzhokua A.A., Kulava Z., Barkaya V.S., Mikvabiya Z.Ja.……278

Ранг, качество отношений и репродуктивные показатели самок павианов гамадрилов
Пачулия И.Г., Чалян В.Г., Мейшвили Н.В.……286
Rank, quality of relations and reproductive indexes success in hamadryas baboon female
Pachuliya I.G., Chalyan V.G., Meishvili N.V.……287

Адаптация приматов к психоэмоциональным нагрузкам: фило-онтогенетический аспект
Кузнецова Т.Г., Голубева И.Ю., Горбачева М.В., Шуваев В.Т.……295
Primates's adaptation to psycho-emotional loads: philo-ontogenetic aspect
Kuznetsova T.G., Golubeva I.U., Gorbacheva M. V., Shuvaev V.T.…295

Разведение свободноживущих павианов гамадрилов в субтропиках черноморского побережья Кавказа
Чалян В.Г., Мейшвили Н.В.……305
Breeding of free-living hamadryas baboons in the subtropics of black sea Coast
Chalyan V.G., Meishvili N.V.……306

Вестибулярные исследования в космосе. Эксперимент «приматы»
Миллер Н.В., Козловская И.Б., Ильин Е.А., Лапин Б.А., Григорьев А.И.……314
Vestibular studies in space. Experiment "primates"
Miller N.V., Kozlovskaya I.B., Ilyin E.A., Lapin B.A., Grigoriev A.I....314

Исследования на обезьянах в космических полетах
Григорьев А.И., Лапин Б.А., Козловская И.Б., Ильин Е.А.……319
Monkeys Research in Space flights
Grigoriev A.I., Lapin B.A., Kozlovskaya I.B., Ilyin E.A.……320

НИИЭПиТ в программах космических исследований
Джокуа А.А., Баркая В.С.……330

RIEP&T in Space research programs
Jokua A.A., Barkaya V.S.……331

Фундаментальных исследования особенностей органа зрения и зрительных функций у приматов
Туманова А.Л., Агрба В.З.,……337
Fundamental research osobennosti of the organ of vision and visual functions in primates
Tumanova A. L., Agrbah, V. Z. ……337

Нормативно-правовые аспекты использования лабораторных животных в научных целях
Мурашев А.Н.……344
legislation aspects of laboratory animals used for scientific purposes
Murashev A.N.……344

Международный опыт: улучшение качества преаналитического этапа лабораторных исследований через инновации
Ковалевская С. Н.……351
International experience: improving quality in the preanalytical phase of laboratory researches through innovation
Kovalevskaya S.N.……352

Взаимодействия ядрышкового белка нуклеофозмина и онкогена c-myc в регуляции клеточной пролиферации и злокачественной трансформации при лимфоме Беркитта
Букаева И.А., Райхлин Н.Т., Пробатова Н.А., Валиев Т.Т., Смирнова Е.А., Шабанов М.А.……356
Relationship between the nucleolar protein Nucleophosmin and oncogene c-myc in the regulation of the cell proliferation and malignant transformation in Burkitt's lymphoma
Bukaeva I.A., Raikhlin N.T., Probatova N.A.,ValievT.T., Smirnova E.A., Shabanov M.A.……357

Выявление генетических маркеров риска формирования экологически обусловленной патологии у жителей Республики Башкортостан
Викторова Т.В., Данилко К.В., Корытина Г.Ф., Измайлова

С.М., Ахмадишина Л.З., Кочетова О.В., Целоусова О.С., Исхакова Г.М., Каримов Д.О.……363

Влияние экстракта асцидии halocynthia aurantium на развитие хронического токсического гепатита
Пономарева Т.И, Добряков Ю.И., Добряков Е.Ю.……368
Influence of the halocynthia aurantium asycida extract on development of chronic toxic hepatitis
Ponomareva T.I., Dobryakov Yu.I., Dobryakov E.Yu.……368

II. МИКРОЦИРКУЛЯЦИЯ, ГЕМАТОЛОГИЯ, РЕОЛОГИЯ……375
II. *MICROCIRCULATION, HEMATOLOGY, RHEOLOGY*……375

Состояние микроциркуляции у больных пожилого и старческого возраста с сердечно-сосудистой патологией как один из факторов долголетия
Халепо О. В., Молотков О. В., Молоткова С. А., Корчигина Н. В., Захаров И. А., Прянчиков С. Н., Додусов В. В.……376
The state of microcirculation in patients of an elderly and senior age with cardiovascular pathology as one of the factors of longevity
Khalepo O.V., Molotkov O.V., Molotkova S.A., Korchigina N.V., Zakharov I.A., Pryanchikov S.N.[1], Dodusov V.V.……377
Корреляция гемодинамических свойств крови с уровнем гематокрита у гематологических больных
Ахуба Л.О.……385
Correlation of the hemodynamic properties of blood with the level of hematocryt in hematological patients
Akhuba L. O.……386

Диагностическая значимость лазерной допплеровской флоуметрии в неинвазивной оценке кожной микроциркуляции у пациентов с сахарным диабетом
Куликов Д.А., Глазков А.А., Куликова П.А., Ковалева Ю.А.……392
Diagnostic significance of laser doppler flowmetry in non-invasive assessment of cutaneous microcirculation in patients with diabetes mellitus
Kulikov D.A., Glazkov A.A., Kulikova P.A., Kovaleva Yu.A.……392

Факторы микроциркуляции, определяющие доставку кислорода тканям
Кислухин В.В.……399
Microciculation's factors for oxygen delivery
Kislukhin V.V.……399

Восстанавливающее действие норадреналина на нейрогенную вазореактивность, сниженную ацидозом
Ярцев В.Н.……404
Restoring effect of noradrenaline on the neurogenic vasoreactivity diminished by acidosis
Yartsev V.N.……405

Ферментативное восстановление гемоглобина и метгемоглобинемия
Топунов А.Ф., Космачевская О.В.……413
Methemoglobinemia and the enzymatic reduction of hemoglobin
Topunov A.F., Kosmachevskaya O.V.……413

Роль эритроцитарного гемоглобина в адсорбционном механизме адаптации клетки
Космачевская О.В., Насыбуллина Э.И., Блиндарь В.Н., Топунов А.Ф.……421
The role of erythrocytic hemoglobin in adsorption mechanism of cell adaptation
Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Blindar V.N., Topunov A.F……422

Метод диагностики состояния микроциркуляторно-тканевой системы на основе совмещения лазерных способов исследований биоткани и функциональной температурной пробы
Сидоров В.В.……429
The diagnostic method for study microcirculation-tissue system based on the combination of the laser methods and the functional temperature probes
Sidorov V.V.……430

Непульсирующая составляющая артериального давления в индивидуальной модели кровообращения какновая гемодинамическая характеристика
Хурса Р.В.……435
Nonpulsing component of blood pressure on individual hemodynamic model as new characteristic of blood circulation
Khursa R.V.……436

Ингибирование динитрозильными комплексами железа гемолиза эритроцитов индуцированного гипогалоидными кислотами
Шумаев К.Б., Горудко И.В., Космачевская О.В., Панасенко О.М., Пугаченко И.С., Топунов А.Ф., Рууге Э.К.……445
Dinitrosyl iron complexes inhidition hemolysis of erythrocytes induced by hypohaloid acids
Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Panasenko O.M., Pugachenko I.S., Topunov A.F., Ruuge E.K.……446

Оптимизация тепловой пробы для диагностики нарушений микроциркуляции у пациентов с сахарным диабетом методом лазерной допплеровской флоуметрии
Глазков А.А., Куликов Д.А.……453
Optimization of a heating test for the diagnosis of microcirculation disorders in patients with diabetes mellitus using laser doppler flowmetry
Glazkov A.A., Kulikov D.A.……453

III. ГЕРОНТОЛОГИЯ……456
III. *GERONTOLOGY*……456

Пептиды регулируют экспрессию генов и увеличивают ресурс организма
Хавинсон В. Х.……457
Peptides regulate gene expression and increase vitality resourses of the body
KhavinsonV.Kh.……457

Исследование некоторых параметров врожденного и адаптивного иммунитета у жителей Абхазии разных возрастов
Матуа А.З., Трапш Х.З., Шевцова З.В., Горухчиева Ф.А., Амаба С.Т, Джидарян А.А., Амичба А.А., Конджария И.Г., Баркая В.С., Елистратова Ж.В., Барциц Э.М., Миквабия З.Я.……463
Study of parameters of innate and adaptive immunity in different ages inhabitants of Abkhazia
Matua A.Z.,Trapsh Kh.Z., Shevtsova Z.V., Goruhchieva F.A., Amaba S.T., Dzhdaryan A.A, Amichba A.A., Konjaria I.G., Barkaia V.S., Elistratova Zh.V., Bartsits E.M, Mikvabia Z.Ya.……464

Превентивные методы диагностики и лечения в клинической практике антивозрастной медицины
Трофимова С.В., Трофимов А.В.……469
Preventive methods of diagnostics and treatment in clinical practice of anti-ageing medicine
Trofimova S.V., Trofimov A.V.……470

Гипокоагуляционные явления как фактор снижения риска возрастной патологии и увеличения продолжительности жизни
Каландия Т.З., Ахуба Л.О., Матуа А.З., Миквабия З.Я., Елистратова Ж.В., Горухчиева Ф.А., Сабекия Ж.Д.……476
Hypocoagulasion effects as a factor in the redution of the risk of age-related pathology and increase in the duration of life
Kalandya T.Z., Akhuba L.O., Matua A.Z., MikvabiaZ.Ya, ElistratovaZh.V., Goruhchieva F.A., SabekiaZh.D.……477

Оценка влияния эколого-социальных факторов на продлолжительность жизни (На примере жителей Абхазии старших возрастных групп)
Каландия Т.З., Джикирба С.К.……482
Evolushon of ecologicol and social factors in fluencing longevity of life (on example of residents of Abkhazia of old age groups)
Kalandya T.Z., Djkirba C.K.……483

Генетическое изучение феномена долгожительства абхазов: полиморфизм APOE
Квеквескири К.Б., Бец Л.В., Спицын В.А.,
Гогуа М.Л., Макаров С.В.……490
Geneticstadyofthephenomenoflongevetyofabkhazians: polymorphism APOE
Kvekveskiri K.B., Bez L.V., Spitsyn V.A.,
Gogua M.L., Makarov S.V.……490

Возрастная специфика понимания конфликта
МакаревскаяЮ.Э.,ГригорьевМ.В.……496
Age specifics of understanding of the conflict
Makarevskaya Yu.E., Grigoryev M.V.……496

IV. ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ……506
IV. *GENERAL BIOLOGY*……..506

Действие кратковременного холода на состояние фагоцитоза
Еникеев Д.А., Хисамов Э.Н., Еникеев О.А.,
Еникеева С.А., Идрисова Л.Т., Срубилин Д.В.……507
Action of short-term cold on the state of phagocytosis
Enikeev D.A., Khisamov E.N., Enikeev O.A., Enikeeva S.A., Idrisova L.T., Srubilin D.V.……507

Применение сукцината 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацил для коррекции токсического поражения печени у старых крыс
В.А. Мышкин, Д.А. Еникеев, И.Д. Габдрахманова,
Д.В. Срубилин, А.Р. Гимадиева, Э.Ф. Ренина……512
The use of succinate 1,3,6-trimethyl-5-gidroksimetil for correction of toxic liver injury in old rats
V. A. Myshkin, D. A. Enikeev, I. D. Gabdrakhmanova,
D. V. Trubilin, A. R. Gimadieva, E. F. Renin……513

Использование дентальных имплантатов с немедленной нагрузкой при ортодонтическом лечении пациентов
Слабковская А.Б., Панаиотов И.П.……522

The using of dental implants with immediate loading in orthodontic treatment
Slabkovskaya A.B, Panaiotov I.P.……523

Возможности применения культуральной среды микроводоросли хлорелла в качестве антиульцерагенного фактора
Мамонова Н.В., Туманова Л.А.……529
Possibilities of using the microalga chlorella culture medium as an anti-ulcerogenic factor
Mamonova N.V., Tumanova A.L.……529

Новая биологически активная добавка на основе экстракта растения Иглица понтийская
Хечумян А.Ф., Ходасевич Л.С.,
Бехтерев В.Н., Наследникова И.О.……533
New biologically active additive on the basis of the plant extract of the Neotric plant
Hechumyan A.F., Khodasevich L.S., Bekhterev V.N.,
Naslednikova I.O.……533

Омализумаб: первый биотехнологический препарат российского производства для лечения аллергической астмы
Салимов Р.М., Азарова А.М., Дегтярев М.Б, Лисицина О.М., Пантюшенко М.С., Жиляева М.В., Хамитов Р.А.……538
Omalizumabzumab: the first russian biotech medicine for allergic asthma treatment
Salimov R. M., Azarova A.M., Degtyarev M. B., Lisitsina O. M., Pastushenko M. S., Zhilyaeva, V. M., Khamitov R. A.……538

Сравнительный анализ специфики личностных детерминант стрессоустойчивости у медицинских и банковских работников
И.Г. Макаревская, Л.В. Кравченко……544
Comparative analysis of the specificity of personal determinants of stress resistance in medical and bank specialists
I.G. Makarevskaya, L.V. Kravchenko……544

Генетически модифицированные растения и здоровье человека
А.Г. Дьяченко……550
Genetically modified plants and human health
A.G.Dyachenko……551

Модификация белков сухой пшеничной клейковины для продуктов лечебного и функционального питания
Чумикина Л.В., Колпакова В.В., Арабова, Л.И., Топунов А.Ф.…569
Modification of dry wheat gluten proteins in products for clinical and functional nutrition
Chumikina L.V., Kolpakova V.V., Arabova L.I., Topunov A.F.……569

Функциональное состояние системы микроциркуляции у пациентов с преддиабетом и впервые выявленным сахарным диабетом 2 типа
Милютина-Якушева Д.А., Халепо О.В., Молотков О.В.……577
Functional state of microcirculation system in patients with prediabetes and newly diagnosed diabetes mellitus type 2
Milutina-Yakusheva D.A., Halepo O.V., Molotkov O.V.……577

Взаимосвязь между неврологическим статусом, показателями агрегации тромбоцитов и интерлейкинов при различном исходе ишемического инсульта
Ованесян Р.А., Ованесян И.Г.……584
Relationship between the neurologic status, indicators of platelet aggregation and interleykins among patients with different outcomes of ischemic stroke
Hovhanessyan R.A., Hovhannisyan I.G.……584

Разработка технологии создания искусственного сенсорного проприоцептивного канала на приматах
Зобова Л.Н., Миллер Н.В., Рощин В.Ю., Бадаква А.М.……589
Development of technology of the artificial proprioceptive sensory channel on primates
Zobova L.N., Miller N.V., Roschin V.Y., Badakva A.M.……589

Экспрессия генов эволюционно-консервативных сигнальных путей в лейкоцитах человека: результаты молекулярно-генетического исследования старения и долголетия
Эрдман В.В., Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Мустафина О.Е.…599
Gene expression of evolution-conservative signaling pathways in human leukocytes: results of molecular-genetic study of aging and longevity
*Erdman V.V., Nasibullin T.R., Tuktarova I.A., Mustafina O.E.……..*599

Проблемы лингвико-социокультурной адаптации русского варианта теста (mmse) к абхазскому языку
Григорьев М.В., Макаревская Ю.Э., Миквабия З.Я.……605
Problems of linguistic-sociocultural adaptation of the russian version of the test (mmse) to the abkhazian language
*Grigoryev MV, Makarevskaya Yu.E., Mikvabiya Z.Ya.……..*605

МАТЕРИАЛЫ СУХУМСКОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ:
90 ЛЕТ НИИЭПИТ АНА

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

20-22 СЕНТЯБРЯ 2017 г.,
Сухум, Абхазия

Формат 60х84 1/16. Тираж 300. Физ. печ. лист 39,5.
Усл. печ. лист 36,74. Заказ № 28.
Отпечатано в РУП «Дом печати», г. Сухум, ул. Эшба, 168.