

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С. И. ГЕОРГИЕВСКОГО

КРЫМСКИЙ ЖУРНАЛ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

CRIMEAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL MEDICINE

2020, том 10, № 4

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

А. В. Кубышкин (главный редактор)
И. И. Фомочкина (заместитель главного редактора)
М. А. Плотникова (ответственный секретарь)
В. А. Белоглазов, К. А. Ефетов, А. М. Кацев

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Л. Дубаске (Вашингтон, США), *Е. В. Евстафьева* (Симферополь, Россия),
В. П. Завьялов (Турку, Финляндия), *И. Л. Кляритская* (Симферополь, Россия),
Я. Коки (Люблин, Польша), *Ю. Л. Криворутченко* (Симферополь, Россия),
А. В. Матвеев (Симферополь, Россия), *О. Матсуо* (Осакасама, Япония),
В. Ю. Михайличенко (Симферополь, Россия), *С. Н. Орлов* (Монреаль, Канада),
А. В. Петров (Симферополь, Россия), *А. Петросян* (Оаха, США),
М. Покорский (Ополе, Польша), *О. А. Притуло* (Симферополь, Россия),
А. Г. Резников (Киев, Украина), *И. Д. Сапегин* (Симферополь, Россия),
Г. М. Тарман (Инсбрук, Австрия), *Т. Трояновский* (Люблин, Польша),
С. Э. Шибанов (Симферополь, Россия), *Я. М. Шуба* (Киев, Украина),
А. Б. Хайтович (Симферополь, Россия)

На первой странице обложки — репродукция картины Роберта Тома «Трепанация в Древнем Перу»

АДРЕС РЕДАКЦИИ:
295051, бульвар Ленина, 5/7, г. Симферополь, ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского»
Медицинская академия имени С. И. Георгиевского
E-mail: nauka_3@ma.cfuv.ru

Журнал является правопреемником Трудов КГМУ, издающихся с 1935 г.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций Российской Федерации. Свидетельство ПИ № ФС77-61787 от 18 мая 2015 г.

Индекс издания ISSN: 2224-6444 (печатная версия), 2244-6452 (online)

С 07 декабря 2015 года журнал включен в «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук».

В соответствии с распоряжением Минобрнауки России от 28 декабря 2018 года № 90-р, журнал считается включенным в Перечень ВАК по следующим научным специальностям и соответствующим им отраслям наук:

03.01.02 – Биофизика (медицинские науки); 03.01.03 – Молекулярная биология (биологические науки); 03.01.04 – Биохимия (медицинские науки); 03.01.07 – Молекулярная генетика (биологические науки); 03.01.08 – Биоинженерия (биологические науки); 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика (медицинские науки); 03.03.01 – Физиология (медицинские науки); 03.03.02 – Антропология (медицинские науки); 03.03.03 – Иммунология (медицинские науки); 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология (медицинские науки); 03.03.05 – Биология развития, эмбриология (медицинские науки); 03.03.06 – Нейробиология (медицинские науки); 14.03.01 – Анатомия человека (медицинские науки); 14.03.02 – Патологическая анатомия (медицинские науки); 14.03.03 – Патологическая физиология (медицинские науки); 14.03.05 – Судебная медицина (медицинские науки); 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки); 14.03.07 – Химиотерапия и антибиотики (медицинские науки); 14.03.08 – Авиационная, космическая и морская медицина (медицинские науки); 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология (медицинские науки); 14.03.10 – Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки); 14.03.11 – Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия (медицинские науки).

Подписной индекс издания в каталоге Агентства «Роспечать» — 80124

Рекомендовано к печати ученым советом Медицинской академии имени С. И. Георгиевского (протокол № 8 от 24.09.2020)

УЧРЕДИТЕЛЬ:

ФГАОУ ВО «КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С. И. ГЕОРГИЕВСКОГО

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ORIGINAL ARTICLES

Бабанин А. А., Уланов В. С. К МОРФОЛОГИИ ИЗМЕНЕНИЙ В ЯИЧКАХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ОТРАВЛЕНИИ АЛКОГОЛЕМ.....	5
Babanin A. A., Ulanov V. S. MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE TESTES OF EXPERIMENTAL ANIMALS IN CHRONIC ALCOHOL POISONING.....	5
Белоглазов В. А., Лугачев Б. И., Малый К. Д., Яцков И. А. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TNFAIP3 (T380G) И ЭКСПРЕССИЯ TNFAIP3 У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ.....	10
Beloglazov V. A., Lugachov B. I., Maliy K. D., Yatskov I. A. POLYMORPHISM OF THE TNFAIP3 GENE (T380G) AND EXPRESSION OF TNFAIP3 IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA	10
Залата О. А., Серeda Е. В., Кравченко А. Н., Гордиенко А. И., Химич Н. В. ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ УРОВНЯ СТРЕССА У СТУДЕНТОВ-МЕДИКОВ.....	17
Zalata O. A., Sereda E. V., Kravchenko A. N., Gordienko A. I., Khimich N. V. PSYCHOPHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL APPROACHES TO ASSESSING THE LEVEL OF STRESS IN MEDICAL STUDENTS.....	17
Иванцова Н. Л., Белякова А. Г., Дмитриевская М. И. НИВЕЛИРОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ L-1В У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ПРИМЕНЕНИИ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА И УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ОБЛУЧЕНИЕМ.....	24
Ivantsova N. L., Belyakova A. G., Dmitrievskaya M. I. LEVELING INDICATORS IL-1B COMBINATION USAGE OF CHOLECALCIFEROL AND UV RADIATION IN COPD.....	24
Мишра А., Цыпандинa Е. В., Гапонов А. М., Румянцев С. А., Ханферьян Р. А., Шестопалов А. В. ВЛИЯНИЕ МИОКИНОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ В МСК И КЛЕТКАХ АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ	29
Mishra A., Tsypankina E. V., Gaponov A. M., Rumyantsev S. A., Khanferyan R. A., Shestopalov A. V. EFFECT OF MYOKINES ON THE QUANTITY OF HORMONE SENSITIVE LIPASE IN MSCS AND THE PRODUCTS OF THEIR ADIPOGENIC DIFFERENTIATION.....	29
Сафи А. Т., Демяшкин Г. А., Оразов М. Р., Калиниченко С. Ю., Шаймарданова Г. М., Карибеков Т. С. РОЛЬ ВИТАМИНА D В РАЗВИТИИ СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ.....	36
Safi A. T., Demyashkin G. A., Orazov M. R., Kalinchenko S. Yu., Shaimardanova G. M., Karibekov T. S. ASSOCIATION OF OVARIAN VITAMIN D AND HORMONE RECEPTORS EXPRESSION IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME	36

Селин А. Д., Терехина Н. А., Терехин Г. А.
ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН43

Selin A. D., Terekhina N. A., Terekhin G. A.
INFLUENCE OF ELECTROMAGNETIC RADIATION ON THE PERMEABILITY OF ERYTHROCYTE
MEMBRANES43

Харченко В. З., Мневец Р. А., Бекетов А. А.
МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РЕПЕРФУЗИОННОМ СИНДРОМЕ И ЕГО
КОРРЕКЦИЯ50

Kharchenko V. Z., Mnevets R. A., Beketov A. A.
MECHANISMS OF DAMAGE TO THE NERVOUS SYSTEM IN A REPERFUSION SYNDROME AND ITS
CORRECTION50

ИСТОРИЯ МЕДИЦИНЫ

HISTORY OF MEDICINE

Фоминых Т. А., Дьяченко А. П., Уланов В. С.
БИША МАРИ ФРАНСУА КСАВЬЕ (1771-1802)58

Fominykh T. A., D'yachenko A. P., Ulanov V. S.
MARIE FRANÇOIS XAVIER BICHAT (1771-1802)58

ОБЗОРЫ

REVIEWS

Цибулевский А. Ю., Дубовая Т. К., Демьяненко И. А.
МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН КОЖИ64

Tsibulevskiy A. Yu., Dubovaya T. K., Demyanenko I. A.
MODELS OF WOUND HEALING64

Ачкасов Е. Е., Фролов В. А., Березин В. В.
ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДИКИ В ЛЕЧЕНИИ И РЕАБИЛИТАЦИИ
КОМБИНИРОВАННОГО (ПРОДОЛЬНО-ПОПЕРЕЧНОГО) ПЛОСКОСТОПИЯ72

Achkasov E. E., Frolov V. A., Berezin V. V.
BASIC APPROACHES AND USED METHODS IN THE TREATMENT OF COMBINED
(LONGITUDINAL-TRANSVERSE) PLATFOOT72

Хайтович А. Б.
КОРОНАВИРУСЫ (СТРУКТУРА ГЕНОМА, РЕПЛИКАЦИЯ)78

Khaitovich A. B.
CORONAVIRUS (GENOME STRUCTURE, REPLICATION)78

УДК: 615.099.07+615.917+616.681+616-092.9

DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-4-5-9

К МОРФОЛОГИИ ИЗМЕНЕНИЙ В ЯИЧКАХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ОТРАВЛЕНИИ АЛКОГОЛЕМ

Бабанин А. А.¹, Уланов В. С.²

¹Советник ректора ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» по медицинскому образованию и науке, 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

²Кафедра судебной медицины. Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Уланов Владимир Сергеевич, старший преподаватель кафедры судебной медицины, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», e-mail: ylyan4ik@mail.ru

For correspondence: Ulanov Vladimir Sergeevich, senior lecturer of the Department of Forensic Medicine of Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: ylyan4ik@mail.ru

Information about authors:

Babanin A. A., <http://orcid.org/0000-0002-8907-6655>

Ulanov V. S., <http://orcid.org/0000-0002-4096-2787>

РЕЗЮМЕ

Эксперимент с хроническим воздействием алкоголя на животных в определенной степени может отражать картину длительного его употребления человеком при алкоголизме. Изучить ультраструктурные изменения внутренних органов, в том числе репродуктивной системы, у человека, как при остром, так хроническом употреблении алкоголя в полной мере невозможно, но при этом результаты, полученные в эксперименте, могут быть экстраполированы на человека.

Полученные результаты показали, что изменения в паренхиматозно-стромальных элементах тестикул при хронической алкоголизации сводятся к дистрофическим изменениям и соединительнотканной трансформации сперматогенного эпителия. Ткань яичек характеризуется выраженными циркуляторными расстройствами с полнокровием и стазом в посткапиллярах и мелких венах, разволокнением стенок капилляров, что приводит к отеку, явлениями периваскулярного и интерстициального склероза, с очагами выраженного гиалиноза. Клетки Лейдига испытывают трофический дефицит, что подтверждается скоплением митохондрий на периферии клеток в местах контакта с капиллярами. Множественные липидные включения, расположенные в цитоплазме клеток Сертоли, также свидетельствуют о нарушении трофики сперматогенного эпителия и развитии жировой дистрофии. Наиболее выраженные изменения отмечаются к 2 и 3 месяцу алкоголизации. К 6 месяцам модельного эксперимента динамика нарастания морфологических изменений, как в паренхиме, так и в строме органа замедляется, что свидетельствует о частичной его адаптации к постоянной интоксикации этиловым алкоголем.

Ключевые слова: алкоголь; яички; хроническое отравление; ультраструктура.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE TESTES OF EXPERIMENTAL ANIMALS IN CHRONIC ALCOHOL POISONING

Babanin A. A.¹, Ulanov V. S.²

¹V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

²Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

The experiment with the chronic effects of alcohol on experimental animals reflects the picture of long-term use of alcoholic beverages by a person with alcoholism. It is impossible to fully study the ultrastructural changes in internal organs, including the reproductive system, in humans, both in acute and chronic alcohol consumption, but the results obtained in the experiment can be extrapolated to humans.

The results obtained showed that changes in the parenchymal-stromal elements of the testicles during chronic alcoholization are reduced to dystrophic transformation of the spermatogenic epithelium. The testicular stroma is characterized by pronounced circulatory disorders with plethora and stasis in the postcapillaries and small veins, edema, phenomena of perivascular and interstitial sclerosis, with foci of pronounced hyalinosis, most expressed by 2-3 months of alcoholism. By 6 months of the model experiment, there was no dynamics of the growth of morphological changes, partial adaptation to constant intoxication with ethyl alcohol.

Key words: alcohol; testicles; chronic poisoning; ultrastructure.

Свыше 15% семейных пар в Российской Федерации страдают бесплодием, при этом мужское бесплодие предопределяет до 50% бесплодных пар. Чрезмерное употребление алкоголя,

согласно многочисленным исследованиям [1; 2; 3; 11; 12], является одной из основных причин мужского бесплодия. При настоящих объемах употребления этилового алкоголя мужчинами

репродуктивного возраста это представляет, как медицинскую, так и социальную проблему, да- лёкую от своего решения [8; 10].

Изучение особенностей и динамики морфологических изменений в яичках при хронической алкогольной интоксикации на ультраструктурном уровне представляет большой интерес для определения основных звеньев патогенеза нарушений репродуктивной функции у лиц мужского пола при длительном (хроническом) употреблении алкогольных напитков [9].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В эксперименте у крыс (половозрелые крысы-самцы линии «Вистар», массой от 160 до 200 грамм) моделировалось состояние хронической алкогольной интоксикации. Ежедневно однократно внутривенно вводили 40% раствор этилового спирта из расчета 7 грамм на килограмм массы тела животного в сутки в течение следующих временных промежутков: 2-х недель, 1, 2, 3, 6 месяца (всего 30 крыс, по 6 крыс в каждой серии опыта). Для проведения эксперимента по хронической алкогольной интоксикации применялась методика Соловьева А. Г. (использование крыс при моделировании органопатологии обусловленной употреблением алкоголя) [4].

Контрольную группу составили 30 крыс-самцов (по 6 крыс на каждую серию опыта). Рацион питания и условия содержания были идентичными для контрольной и экспериментальной группы животных.

Материал для световой микроскопии подвергали стандартной гистологической проводке, использовали окраску гематоксилином и эозином [5].

Материал (ткань яичка размером 1x1x1 мм) для просвечивающей электронной микроскопии, в первую очередь, фиксировали на холоде в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере с pH 7,4. Затем проводили дофиксацию по Millonig 1% раствором OsSO₄ [6]. Далее проводили обезвоживание в батарее ацетонов и пропитки, кусочки органа заливали в смесь эпона с аралдитом, для полимеризации смолы помещали в термостат на 48 часов при температуре 60°C. На ультратоме подготавливали полутонкие срезы, из которых производилась прицельная заточка пирамид. Ультратонкие срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца, изучали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К с последующим фотодокументированием.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При хронической интоксикации у подопытных животных к стромально сосудистым нару-

шениям и отеку яичек, характерным для острой алкогольной интоксикации [7] присоединяются: выраженное расстройство кровообращения, угнетение сперматогенеза, диффузное разрастание соединительной ткани, дистрофические изменения сперматогенного эпителия.

Через 2 недели введения алкоголя животным наблюдается слабовыраженный отек паренхимы с отслоением сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев на фоне полнокровия сосудов микроциркуляторного русла. После месяца хронической алкоголизации животных отмечается истончение сперматогенного эпителия и отслоение его, выраженный отек, стаз и сладж в сосудах преимущественно артериоло-венулярного бассейна (рис. 1).



Рис. 1. Слабо выраженный отек интерстиция. Сохранное строение извитых семенных канальцев. Хроническая интоксикация алкоголем (2 недели). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100.

При этом к стромально-сосудистым нарушениям и отеку органа присоединяются дистрофические изменения сперматогенного эпителия, особенно в участках его массивного отслоения, за счет новообразованных фуксинофильных и коллагеновых волокон наблюдается огрубение соединительно-тканых прослоек, выраженное полнокровие, отек и угнетение сперматогенеза. Клетки-предшественники сперматозоидов расположены рыхло и вдалеке от поддерживающих клеток, это говорит об отсутствии их полноценного питания и малой вероятности завершить полноценный сперматогенез (рис. 2).

К 2-3 месяцу на фоне полнокровия сосудов и отека органа – к вышеуказанным изменениям добавляется увеличение площади соединительной ткани и преобладание склероза над отеком. Увеличиваются поля отслоения сперматогенного эпителия и объем дистрофических изменений, при этом популяции созревающих сперматогенных клеток не имеют плотного контакта с подлежащими sustentocytes и базальным слоем семенных извитых канальцев (рис. 3).



Рис. 2. Отслоение сперматогенного эпителия (1) более выраженное в участках отека (2). Утолщение соединительнотканых прослоек. Хроническая интоксикация алкоголем (1 месяц). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100

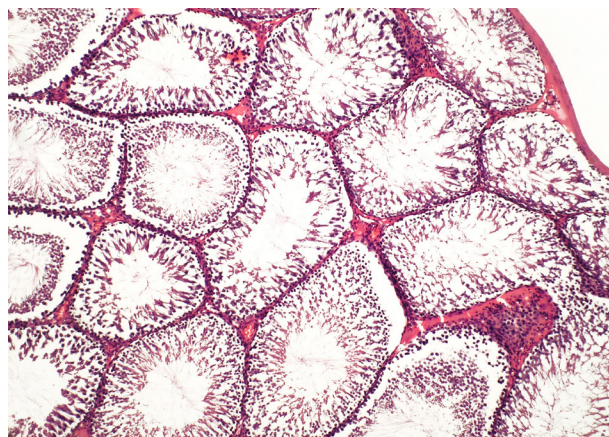


Рис. 3. Поля отслоения сперматогенного эпителия на фоне интерстициального отека. Хроническая интоксикация алкоголем (3 месяца). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100

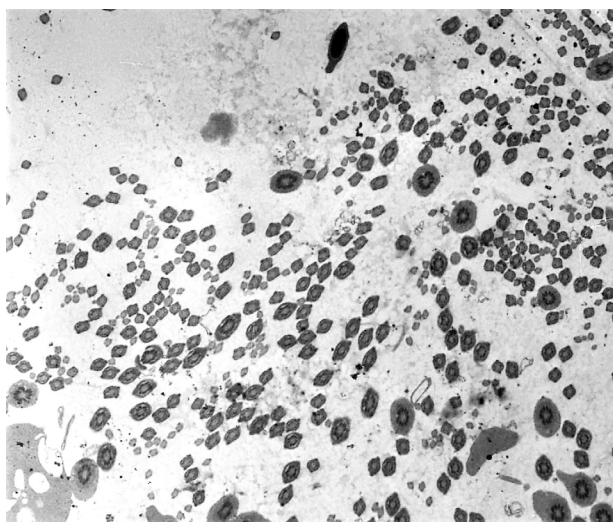


Рис. 4. Просвет извитого семенного канальца крысы Вистар с рыхлым взаиморасположением клеток сперматогенного эпителия. Хроническая интоксикация алкоголем (6 месяцев). Просвечивающая электронная микроскопия. Увеличение 3000

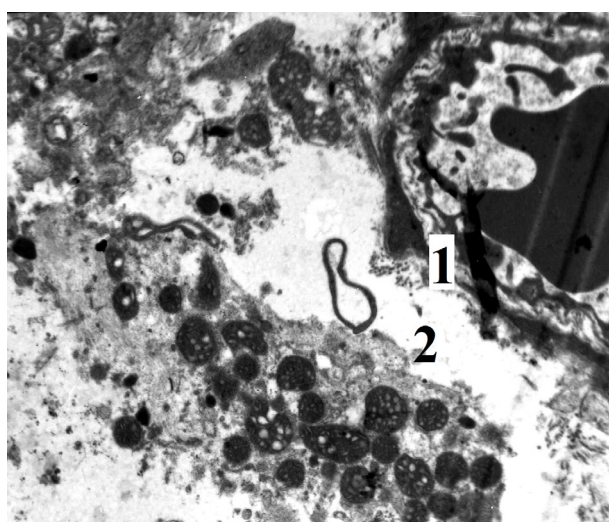


Рис.5. Разволокнение стенки капилляра яичка (1), отечная жидкость между стенкой капилляра и клеткой Лейдига (2). Хроническая интоксикация алкоголем (3 месяца). Просвечивающая электронная микроскопия. Увеличение 3000

Отслоение и отек сперматогенного эпителия при ультрамикроскопии проявляется хаотичным расположением клеток сперматогенного дифферона и нарушением четкого взаиморасположения клеток, характерного для нормального сперматогенеза (рис. 4).

К трем месяцам алкоголизации за счет отечной жидкости между интерстициальными клетками Лейдига и прилежащими капиллярами отсутствует плотный контакт. Наблюдается разволокнение и дезорганизация стенок капилляра (рис. 5). В местах предполагаемого контакта клеток Лейдига со стенкой капилляра наблюдается концентрация митохондрий с четко различимыми кристами и плот-

ным матриксом. Это может свидетельствовать о трофическом дефиците интерстициальных клеток в результате снижения скорости поступления питательных веществ из капилляров в клетку.

На шестом месяце введения этилового алкоголя крысам в их гонадах в сравнении с контрольной группой динамика морфологических изменений несколько снижается. Несколько приостанавливается нарастание склероза органа, что в какой-то степени может говорить о частичной морфо-функциональной адаптации. Явления периваскулярного отека остаются достаточно выраженными, и в большинстве сопровождаются периваскулярным склерозом (рис. 6).

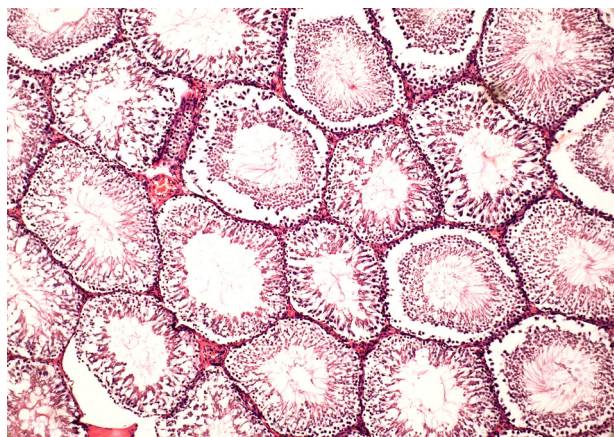


Рис. 6. Множественные отслоения сперматогенного эпителия на фоне отека органа. Хроническая интоксикация алкоголем (6 месяцев). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 100

Цитоплазма клеток Сертоли обладает низкой электронной плотностью, с множественными диффузно расположенными липидными включениями, что свидетельствует о нарушении трофики sustentоцитов и приводит к формированию жировой дистрофии как отдельных клеток, так и органа в целом (рис. 7).

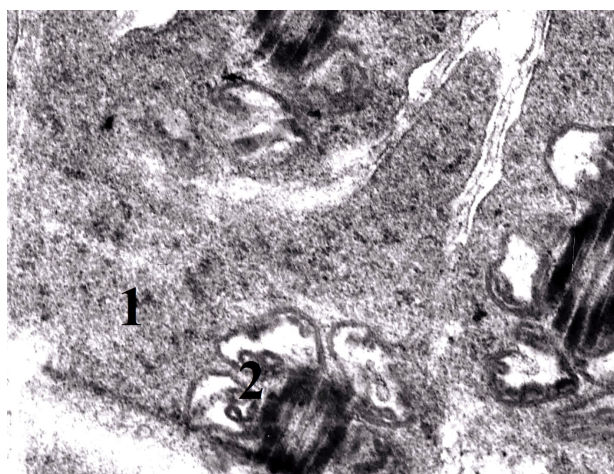


Рис. 7. Снижение электронной плотности цитоплазмы клетки Сертоли (1), множественные липидные включения (2). Хроническая интоксикация алкоголем (6 месяцев). Просвечивающая электронная микроскопия. Увеличение 4000

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышеизложенное можно утверждать, что при хронической алкоголизации в эксперименте к стромально-сосудистым нарушениям и отеку органа, характерным для острого отравления алкоголем, присоединяются дистрофические изменения сперматогенного эпителия,

наиболее выраженные к 2-3 месяцу алкоголизации.

Так, ко 2-й неделе эксперимента наблюдается слабовыраженный периваскулярный отек и полнокровие сосудов микроциркуляторного русла без выраженных изменений сперматогенного дифферона. После месяца хронической алкоголизации животных имеет место истончение сперматогенного эпителия, выраженный отек, стаз и сладж в сосудах; к 2-3 месяцам к вышеуказанным изменениям добавляется увеличение площади соединительной ткани и преобладание склероза над отеком органа, ввиду чего в клетках Сертоли и Лейдига отмечаются признаки трофического дефицита, что приводит к нарушению питания всего сперматогенного пула и невозможностью полноценного сперматогенеза. К 6 месяцам модельного эксперимента имеет место замедление динамики нарастания морфологических изменений, что, по нашему мнению, свидетельствует о частичной морфо-функциональной адаптации органа к воздействию этилового спирта.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маслюков И. А., Коновалова Я. М. Экзогенные факторы риска развития мужского бесплодия. Здоровье и образование в 21 веке: материалы 21 международного конгресса. 2017;19(12):192-193.
2. Радченко О. Р. Факторы риска мужского бесплодия и методы профилактики. Практическая медицина. 2012;2(57):218-220.
3. Сивик В. В. Затымина М. С., Мигунов В. С., Кинаш А. А. Судебно-медицинское значение токсического действия неустановленного вещества в структуре химической травмы. Судебно-медицинская экспертиза. 2019;62 (4):10-13. doi:10.17116/sudmed20196204110
4. Соловьев А. Г. Использование крыс при моделировании алкогольобусловленной органопатологии : (метод. рекомендации). Архангельск : АГМА; 1997.
5. Сапожников А. Г., Доросевич А. Е. Гистологическая и микроскопическая техника. Смоленск; 2000.
6. Mallory F. B. Cirrhosis of the liver: five different types of lesions from which it may arise. Bull. Johns Hopk. 1911;22:69-75.
7. Бабанин А. А., Уланов В. С. Ультраструктурные изменения в тестикулах при остром отравлении алкоголем в эксперименте. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2018;8(2):9-16.

8. Породенко В. А. Корхмазов В. Т. Алкоголь : яд или лекарство? Вестник судебной медицины. 2013;2(1):56-59.

9. Уланов В. С. Экспериментальная и секционно-морфологическая характеристика хронического воздействия алкоголя на яички. Судебно-медицинская экспертиза 2017;60(4):12-13. doi: 10.17116/sudmed201760412-13

10. World Health Organisation. World drug report 2018 [Internet] URL: <https://www.unodc.org/wdr2018/index.html>. Request date 15.11.2020.

11. Sansone A. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2018;16(1):3. doi: 10.1186/s12958-018-0320-7.

12. Mima M., Greenwald D., Ohlander S. Environmental Toxins and Male. *Current Urology Reports*. 2018;19(7):50. doi:10.1007/s11934-018-0804-1.

REFERENCES

1. Maslyukov I. A, Konovalova Y. M. Exogenous risk factors for the development of male infertility. *Health and education in the XXI century: mater. XIX int. Congr.* 2017;19(12):192-193. (In Russ).

2. Radchenko O. R. Risk factors for male infertility and methods of prevention. *Practical medicine*. 2012;2(57):218-220. (In Russ).

3. Sivik V. V., Zatyamina M. S., Migunov V. S., Kinash A. A. Forensic and medical significance of the toxic effect of an unidentified substance in the context of chemical trauma. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza (Forensic Medical Expertise)*. 2019;62(4):10-13. doi: 10.17116 / sudmed20196204110

4. Soloviev A. G. The use of rats in modeling alcohol-related organopathology: (Recommendations). Arkhangelsk: AGMA; 1997. (In Russ).

5. Sapozhnikov A. G., Dorosevich A. E. *Histological and microscopic technique*. Smolensk; 2000. (In Russ).

6. Mallory F. B. Cirrhosis of the liver: five different types of lesions from which it may arise. *Bull. Johns Hopk.* 1911;22:69-75. (In Russ).

7. Babanin A. A., Ulanov V. S. Ultrastructural changes in the testicles in acute alcohol poisoning in the experiment. *Crimean journal of experimental and clinical medicine*. 2018;8. (2):9-16. (In Russ).

8. Porodenko V. A., Korhmazov V. T. Alcohol: a poison or a medicine? *Bulletin of Forensic Medicine*. 2013;2(1):56-59. (In Russ).

9. Ulanov V. S. Experimental and sectional morphological characteristics of the chronic effects of alcohol on the testes. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza (Forensic Medical Expertise)*. 2017;60(4):12-13. doi:10.17116 / sudmed201760412-13. (In Russ).

10. World Health Organisation. World drug report 2018 [Internet] URL: <https://www.unodc.org/wdr2018/index.html>. Request date 15.11.2020.

11. Sansone A. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2018;16(1):3. doi:10.1186/s12958-018-0320-7

12. Mima M., Greenwald D., Ohlander S. Environmental Toxins and Male. *Current Urology Reports*. 2018;19(7):50. doi:10.1007/s11934-018-0804-1

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TNFAIP3 (T380G) И ЭКСПРЕССИЯ TNFAIP3 У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Белоглазов В. А., Лугачев Б. И., Малый К. Д., Яцков И. А.

Кафедра внутренней медицины №2, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Белоглазов Владимир Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой внутренней медицины №2 Медицинской академии имени С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», e-mail: biloglazov@mail.ru

For correspondence: Vladimir A. Beloglazov, MD, Department of Internal Medicine №2, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: biloglazov@mail.ru

Information about authors:

Beloglazov V. A., <http://orcid.org/0000-0001-9640-754X>

Lugachov B. I., <https://orcid.org/0000-0002-8485-4251>

Maliy K. D., <https://orcid.org/0000-0002-6591-2719>

Yatskov I. A., <http://orcid.org/0000-0002-5486-7262>

РЕЗЮМЕ

Исследовался однонуклеотидный полиморфизм (T380G) и степень экспрессии гена TNFAIP3, кодирующего убиквитин-модифицирующий фактор А 20, обеспечивающий ингибирующее влияние на интенсивность иммунного ответа TLR4-опосредуемых сигналов. Материалы и методы. Обследовано 84 пациента с бронхиальной астмой (БА) различной степени тяжести (14 больных – легкой, 49 – среднетяжелой и 21 тяжелой формой) и 52 практически здоровых лиц контрольной группы. Определение однонуклеотидного полиморфизма гена TNFAIP3 (T380G) проводилось методом аллельной дискриминации с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Экспрессия гена TNFAIP3 определялась по концентрации кДНК относительно уровня экспрессии референс-гена GAPDH также методом ПЦР в реальном времени. Результаты. При исследовании полиморфного маркера гена TNFAIP3 (T380G) уровень гомозиготности по доминантному признаку (ТТ) составил 88,1% у пациентов с БА и 88,1% у здоровых доноров, по рецессивному (GG) признаку, соответственно, 3,6% и 4,8% ($p < 0,05$), степень гетерозиготности (TG) составила 8,3% и 7,1% в контрольной группе ($p < 0,05$), что не позволяет на данном этапе считать участие данного однонуклеотидного полиморфизма в генезе астмы доказанным. Экспрессия гена TNFAIP3 в обеих группах колебалась от 0 до 5 единиц, в том числе у пациентов 1 группы с легким течением БА уровень экспрессии данного гена составлял 2,36 (1,89;2,94) ед. и достоверно не отличался от величины этого показателя в контрольной группе ($p > 0,05$). Во 2 группе пациентов с персистирующим течением БА средней тяжести экспрессия гена TNFAIP3 составила 1,08 (0,87;1,38) ед., что достоверно ниже, чем у пациентов контрольной группы ($p < 0,05$). Уровень экспрессии данного гена при тяжелом течении БА составил 0,23 (0,18;0,38) ед., что ниже соответствующего показателя в контрольной группе ($p < 0,001$) и у пациентов 1 группы ($p < 0,05$) и не отличается достоверно от показателя 2 клинической группы ($p > 0,05$). Заключение. Низкая экспрессия гена TNFAIP3, приводящая к неадекватной продукции фактора А 20, наблюдаемая при тяжелой БА, может приводить к снижению функции эпителиального барьера к классическим (ЭТ) и потенциальным лигандам, активирующим толл-подобные рецепторы 4 типа, с последующей активацией внутриклеточного NF-κB и синтезу провоспалительных цитокинов, играющих решающую роль в формировании хронического воспаления при БА. Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-315-90116.

Ключевые слова: TNFAIP3, A20, T380G, бронхиальная астма, полиморфизм, экспрессия.

POLYMORPHISM OF THE TNFAIP3 GENE (T380G) AND EXPRESSION OF TNFAIP3 IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

Beloglazov V. A., Lugachov B. I., Maliy K. D., Yatskov I. A.

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

The single nucleotide polymorphism (T380G) and the degree of expression of the TNFAIP3 gene encoding the ubiquitin-modifying factor A20, providing an inhibitory effect on the intensity of the immune response of TLR4-mediated signals, were studied. Materials and methods. 84 patients with bronchial asthma of varying severity (14 patients with mild, 49 with moderate and 21 with severe) and 52 practically healthy controls were examined. The determination of single nucleotide polymorphism of the TNFAIP3 (T380G) gene was carried out by the method of allelic discrimination using real-time polymerase chain reaction. Expression of the TNFAIP3 gene was determined by the concentration to DNA relative to the level of expression of the reference GAPDH gene also by real-time PCR. Results. In the study of the TNFAIP3 gene polymorphic marker (T380G), the level of homozygosity for the dominant trait (TT) was 88.1% in patients with asthma, and 88.1% in healthy donors, for the recessive (GG) trait, 3.6% and 4, respectively. 8% ($p < 0,05$), the degree of heterozygosity (TG) was 8.3% and 7.1% in the control group ($p < 0,05$), which does not allow at this stage to consider the participation of this single nucleotide polymorphism in the genesis of asthma proven. Expression

of the TNFAIP3 gene in both groups ranged from 0 to 5 units, including in patients of group 1 with mild asthma, the expression level of this gene was 2.36 (1.89; 2.94) units, and did not significantly differ from the value of this indicator in the control group ($p > 0,05$). In group 2 of patients with persistent asthma of moderate severity, the expression of the TNFAIP3 gene was 1.08 (0.87; 1.38) units, which is significantly lower than in patients of the control group ($p < 0,05$). The expression level of this gene in severe asthma was 0.23 [0.18; 0.38] units, which is lower than the corresponding indicator in the control group ($p < 0,001$) and in patients of group 1 ($p < 0,05$) and not differs significantly from indicator 2 of the clinical group ($p > 0,05$). Conclusion. Low expression of the TNFAIP3 gene, leading to inadequate production of factor A 20, observed in severe asthma, can lead to a decrease in the function of the epithelial barrier to classical (ET) and potential ligands that activate type 4 toll-like receptors, followed by activation of intracellular NF- κ B and the synthesis of proinflammatory cytokines that play a decisive role in the formation of chronic inflammation in asthma. This work was supported by the RFBR grant No. 19-315-90116.

Key words: TNFAIP3, A20, T380G, asthma, polymorphism, expression.

Патогенез развития бронхиальной астмы (БА) включает в себя элементы участия факторов как врожденного, так и адаптивного иммунитета, использующих общие эффекторские механизмы иммунного ответа [1]. Среди факторов врожденного иммунитета, вовлеченных в развитие симптомокомплекса БА, достаточно важная роль принадлежит бактериальному эндотоксину (ЭТ) – липополисахариду, широко распространенным фактором окружающей среды. Его роль в качестве этиопатогенного фактора БА двойственна. С одной стороны, контакт в раннем детском возрасте со значимыми концентрациями ЭТ представляется фактором профилактики аллергических заболеваний (т. н. гигиеническая гипотеза), но с другой стороны, многочисленные эпидемиологические исследования свидетельствуют о влиянии ЭТ в качестве фактора, утяжеляющего клиническое течение астмы [1]. Известно, что реализация провоспалительного ответа на ЭТ связана с активацией рецепторного комплекса CD14/TLR4-MYD2 на поверхности мембран моноцитарно-макрофагальных клеток, что ведет к экспрессии генов провоспалительных цитокинов посредством активации внутриклеточного фактора NF- κ B с последующим синтезом кодируемых ими продуктов. Данный процесс, однако, находится под тонким регулирующим действием, одним из факторов которого оказывается продукция эпителиальными клетками бронхов т. н. убиквитин-модифицирующего белка A20, что ведет к снижению активирующего влияния NK- κ B, и в результате ограничивает активность мембранных рецепторов 4 типа (т. н. toll-like, TLR4), по отношению к достаточно широкому спектру экзо- и эндогенных стимулов, включая и ЭТ. Этот убиквитин-модифицирующий фактор A20, известный также как TNF α -индуцированный белок 3 (TNFAIP3), в свою очередь, кодируется геном TNFAIP3, для которого показан полиморфизм, потенциально способный влиять на его экспрессию [2; 3].

Учитывая вышеизложенное, целью настоящего исследования было изучение однонукле-

отидного полиморфизма, ранее описанного для данного гена TNFAIP3 в области 3-го экзона (T380G) (rs2230926) у больных бронхиальной астмой и у здоровых доноров крымской популяции, и уровень экспрессии данного гена в зависимости от тяжести течения заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 84 больных (33 мужчин (39,3%) и 51 женщина (60,7%), средний возраст 55,5 (45,25;60) лет, страдающих бронхиальной астмой, находящихся на амбулаторном наблюдении у пульмонолога, которые составили основную группу и дали письменное информированное согласие пациента на участие в клиническом исследовании. На момент исследования у пациентов не наблюдалось обострения заболевания, но варьировал уровень контроля над симптомами и показатели функции внешнего дыхания. Пациенты получали базисную терапию БА согласно стандартам. Контрольную группу составили 52 относительно здоровых донора (19 мужчин, 33 женщины), которые по возрасту и полу соответствовали пациентам основной группы. Статистически значимых различий между группами по возрасту и полу не было ($p > 0,5$).

Пациенты основной группы ($n=105$) были распределены на 3 группы с учетом тяжести течения заболевания и объема получаемой базисной терапии. В 1 группу было включено 14 (16,7%) пациентов с легким персистирующим течением БА, во 2 группу – пациенты с персистирующим течением средней тяжести – 49 (58,3%) человек, и в 3 группу – с тяжелым персистирующим течением БА 21 (25%) человек, соответственно.

Всем больным проводилось исследование функции внешнего дыхания (спирография), исследование клеточного состава мокроты, пациентами самостоятельно заполнялись анкеты степени контроля над симптомами (опросник ACQ-5 (Asthma Control Questionnaire), состоящий из 5 вопросов и 6-бальной шкалой ответов), расчет показателя как среднее арифметическое

для 5 ответов, соответственно: $\leq 0,75$ – хороший контроль; $0,75-1,5$ – частично контролируемая; $>1,5$ – неконтролируемая астма.

Молекулярно-генетическое исследование проводилось на базе лаборатории клинической иммунологии Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) Медицинской академии имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского».

Материалом исследования служила периферическая кровь. Экстракция геномной ДНК проводилась фенол-хлороформным методом. Определение однонуклеотидного полиморфизма проводилось методом аллельной дискриминации с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Использовались прямой и обратный праймеры, фланкирующие исследуемый фрагмент гена, и два зонда с различными флуоресцентными метками на 5'-конце (FAM и Cy-5) с гасителем на 3'-конце, комплементарные внутренней исследуемой области ампликона, различающиеся по исследуемому мутантному нуклеотиду. Последовательности праймеров и зондов синтезировались в соответствии с данными, приводимыми в НПК Синтол, Москва [4].

Определение проводилось с использованием термоциклера CFX-96 (BioRad, USA).

Экспрессия гена TNFAIP3 определялась по концентрации кДНК, полученной с помощью реакции обратной транскрипции образцов РНК, выделенных с помощью набора «РНК-экстран» из крови исследуемых лиц (НПО Синтол). Реакция обратной транскрипции проводилась с помощью наборов «OT-1» НПО Синтол. Определение кДНК проводилось с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя Eva-Green с использованием наборов НПК «Синтол», Москва. Расчет уровня экспрессии проводился методом $\Delta\Delta Ct$ в виде отношения разниц пороговых циклов (Ct) проб с кДНК TNFAIP3 и референс-гена GAPDH (дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида). Последовательности праймеров для оценки количества экспрессируемой кДНК обоих генов взяты из исследования Majumdar I. с соавт. [5].

Полученные результаты исследования были обработаны с помощью стандартных статистических методов с использованием программы Statistica 10.0. Качественные характеристики исследуемых групп представлены в виде абсолютных значений (%) от общего числа случаев и в виде медианы с 25–75%м интерквартильным размахом (Me (Q1; Q3)). Достоверность различий между группами была рассчитана с помощью критерия χ^2 (кси-квадрат). При анализе

сравнение центральных тенденций двух независимых выборок с использованием U-критерия Манна-Уитни. За критический уровень статистической значимости принимали вероятность равную 95% ($p < 0,05$). Соответствие равновесию Харди-Вайнберга будет оцениваться с помощью точного теста Фишера и χ^2 . Отношение шансов (oddsratio, OR) – с помощью логистического регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В 1 клинической группе преобладали пациенты с контролируемым течением – 12 человек (85,7%), а у 2 человек зарегистрировано частично контролируемое течение (14,3%); во 2 группе контролируемое течение выявлено у 6 больных (12,2%), частично контролируемое у 40 больных (81,6%) и неконтролируемое у 3 больных (6,2%); в 3 группе – частично контролируемое течение у 13 пациентов (61,9%), неконтролируемое у 8 человек (38,15%). Практически все пациенты 1 группы получали контролируемую терапию ингаляционными кортикостероидами (ИГКС), пациенты 2 и 3 группы – комбинацию различных доз ИГКС и бета агонистами длительного действия (ДДБА). 4 (8,2%) пациента 2 группы и 6 (28,6%) пациентов 3 группы получали тройную терапию ИГКС+ДДБА+тиотропия бромид.

Исследование клеточного состава мокроты показало, что в 1 группе преобладает эозинофильный тип, который был выявлен у 8 больных (57,1%), в то время как у пациентов 2 и 3 клинических групп наиболее часто встречался нейтрофильный тип эндобронхиального воспаления, который выявлен у 24 больных среднетяжелым течением (48,9%) и у 18 больных тяжелым течением астмы (55,1%).

Результаты исследования полиморфного маркера гена TNFAIP3 (T380G) представлены в табл. 1. Как следует из данных, представленных в таблице, однонуклеотидный полиморфизм гена TNFAIP3 у пациентов основной группы ($n=84$) уровень гомозиготности по доминантному признаку (TT) составил 88,1% (74 пациента), число гомозиготности по рецессивному признаку (GG) составило 3,6% (3 человека), и уровень гетерозиготности (TG) составил 8,3% (7 человек), что достоверно не отличалось ($p > 0,05$) от результатов, полученных в контрольной группе (TT – 88,1%, TG – 7,1%, GG – 4,8%).

Достоверные различия по исследуемым параметрам в исследуемых группах выявлены не были.

Результаты исследования уровня экспрессии гена TNFAIP3 представлены в табл. 2. Уровень экспрессии гена TNFAIP3 в обеих группах,

Таблица 1

Частота распределение генотипов TNFAIP3 (T380G) у больных бронхиальной астмой и у здоровых доноров

Аллельное сочетание	Пациенты (n=84) %	Контрольная группа (n=52) %	Значимость различий ОШ, ДИ, χ^2 (p)
TT	74/88,1	37/88,1	p>0,05, ОШ = 1.0, ДИ = (0,319-3,139)
TG	7/8,3	3/7,1	p = 0.830, ОШ = 1.182, ДИ = (0,290-4,823)
GG	3/3,6	2/4,8	p = 0.757, ОШ = 0.741, ДИ = (0,119-4,613)

Примечание: ОШ – отношение шансов, ДИ – 95% доверительный интервал, p – достоверность различий.

определяемый методом $\Delta\Delta Ct$, в относительных единицах (отношения разниц пороговых циклов определяемого и референсного генов в присутствии ревертазы и без нее), варьировал в интервале от 0 до 5 единиц. У пациентов 1 группы с легким течением БА уровень экспрессии гена TNFAIP3 составлял 2,36 (1,89;2,94) ед. и достоверно не отличался от величины этого показателя в контрольной группе (p>0,05). Во 2 группе пациентов с персистирующим течением БА средней тяжести экспрессия гена TNFAIP3 составила 1,08 (0,87;1,38) ед., что

достоверно ниже, чем у пациентов контрольной группы (p<0,05). Уровень экспрессии гена TNFAIP3 при тяжелом течении БА составил 0,23 (0,18;0,38) ед., что ниже соответствующего показателя в контрольной группе (p<0,001) и у пациентов 1 группы (p<0,05) и не отличается достоверно от показателя 2 клинической группы (p>0,05). Пациенты с тяжелой персистирующей и с течением средней тяжести БА, показали значительно более низкие уровни экспрессии TNFAIP3 (p<0,001) по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2

Уровень экспрессии гена TNFAIP3 у больных БА

Исследуемые группы	n	Уровень экспрессии гена TNFAIP3 (ед.) Me [Q1;Q3]	Значимость различий
1 группа (легкое персистирующее течение БА)	14	2,36 (1,89;2,93)	рк-1 > 0,05 рк-2 < 0,05 рк-3 < 0,001 p1-2 = 0.139 p1-3 < 0,05 p2-3 > 0.05
2 группа (персистирующее течение средней тяжести)	49	1,08 (0,87;1,38)	
3 группа (тяжелое персистирующее течение БА)	21	0,23 (0,18;0,38)	
Контрольная группа	52	3,4 (2,8;4,025)	

Примечания: рк-1 – достоверность различий рассчитана между контрольной и 1 группами с помощью критерия U-критерий Манна-Уитни. рк-2 – достоверность различий рассчитана между контрольной и 2 группами группой с помощью критерия U-критерий Манна-Уитни. рк-3 – достоверность различий рассчитана между контрольной и 3 группами с помощью критерия U-критерий Манна-Уитни. p1-2 – достоверность различий рассчитана между 1 и 2 группами с помощью критерия U-критерий Манна-Уитни. p2-3 – достоверность различий рассчитана между 2 и 3 группами с помощью критерия U-критерий Манна-Уитни p1-3 – достоверность различий рассчитана между 1 и 3 группами с помощью критерия U-критерий Манна-Уитни

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе отмечается важность регулирующего влияния факторов, позволяющих влиять на чувствительность и интенсивность иммун-

ного ответа при различных видах патологии, в значительной мере обусловленных действием активатора экспрессии NF-kB, среди которых важная роль отводится т. н. убиквитин-модифицирующему белку A20, продукту гена TNFAIP3 [6; 7].

В последние годы отмечается интенсификация исследований по изучению регуляции продукции эпителиальными клетками убиквитин-модифицирующего фермента A20, что объясняется возможностью управлять воспалительными процессами, связанными с активацией TLR4, TNF α и внутриклеточного фактора NF- κ B.

Так, в исследовании Stein M. M. с соавт. показано, что у эмигрантов из Центральной Европы гуттеритов, хозяйственная деятельность которых относится к высокоиндустриальному типу сельскохозяйственного производства, распространённость БА в пять раз чаще, чем у генетически близких амишей, практикующих традиционный тип сельского хозяйства [8]. Среди генов, наиболее выраженных у детей амишей, был выделен ген TNFAIP3, кодирующий эпителиальный убиквитин-модифицирующий белок A20. У детей гуттеритов выявлена более высокая экспрессия гена TRIM8, который действует как положительный регулятор TNF α - и интрейкин-1 β -индуцированной активации NF- κ B.

По результатам большого исследования, проведенного в Китае, показано, что полиморфизм в гене TNFAIP3 (rs9494885 и rs7753873) ассоциировался с повышенным риском аллергического ринита [9].

В эксперименте интратрахеальная доставка A20 в виде кДНК в аденовирусном векторе перед сенсibilизацией овальбумином ингибировала индукцию Th2-обусловленного воспаления дыхательных путей, ядерную транслокацию NF- κ B и приводила к повышенной экспрессии A20 в эпителии легких в течение 5 дней [10].

Наши предыдущие исследования показали, что утяжеление течения БА связано с воздействием чрезмерного ЭТ стимула и повышенным клеточным и гуморальным ответом на ЭТ грамотрицательной флоры, что проявляется в значительном повышении экспрессии TLR4 на моноцитах, значительном повышении концентрации антиэндотоксинового IgM в периферической крови и секреторного антиэндотоксинового IgA в мокроте при тяжелом течении БА [11; 12]. Выявленное нами преобладание нейтрофильного характера эндобронхиального воспаления при среднетяжелом и тяжелом течении БА в данной работе косвенно свидетельствуют о значительной роли ЭТ в патогенезе данного воспаления, что создает трудности для успешной противовоспалительной базисной терапии ингаляционными стероидами, отражением чего является высокий процент частично и неконтролируемого течения астмы при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания.

В настоящем исследовании нами показано, что при среднетяжелом и тяжелом течении БА

наблюдаются более низкие уровни экспрессии TNFAIP3 ($p < 0,001$) по сравнению группой здоровых лиц. Выявленный феномен диаметрально противоположно отличается от физиологической реакции на повышенную концентрацию ЭТ во внешней среде, которая была зарегистрирована в уже упоминаемой работе Stein M. M. с соавт. (2016) [8]. Так, в ответ на высокую концентрацию ЭТ в домашней пыли у амишей, превышавшей в 6-8 раз содержание ЭТ, в домах группы сравнения (гуттеритов) зарегистрировано выраженное повышение экспрессии гена TNFAIP3, что предполагает усиление продукции убиквитина A 20 эпителиальными клетками и повышением резистентности слизистых оболочек к лигандам TLR4.

При исследовании однонуклеотидного полиморфного маркера гена TNFAIP3 (T380G) мы не выявили достоверных различий по уровню гомозиготности по доминантному и рецессивному признаку и степени гетерозиготности между больными БА и группой здоровых доноров. Ограничением окончательной трактовки участия данного полиморфизма в формировании БА является недостаточное число проведенных исследований.

ВЫВОДЫ

1. При исследовании полиморфного маркера гена TNFAIP3 (T380G) уровень гомозиготности по доминантному признаку (TT) составил 88,1% у пациентов с БА и 88,1% у здоровых доноров, по рецессивному (GG) признаку, соответственно, 3,6% и 4,8% ($p < 0,05$), степень гетерозиготности (TG) составила 8,3% и 7,1% в контрольной группе ($p < 0,05$), что не позволяет на данном этапе считать участие данного однонуклеотидного полиморфизма в генезе астмы доказанным.
2. Выявлено достоверное снижение экспрессии гена TNFAIP3 у пациентов среднетяжелой и тяжелой БА по сравнению уровнем контрольной группы ($p < 0,05$ и выше).
3. Низкая экспрессия TNFAIP3, приводящая к неадекватной продукции убиквитина A 20, наблюдаемая при тяжелой БА, может приводить к снижению функции эпителиального барьера к классическим (ЭТ) и потенциальным лигандам активирующим толл-подобные рецепторы 4 типа, с последующей активацией внутриклеточного фактора NF- κ B и синтезу провоспалительных цитокинов, играющих решающую роль в формировании хронического воспаления при БА.

Финансирование. Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-315-90116.

Funding. This work was supported by the RFBR grant No. 19-315-90116

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоглазов В. А., Попенко Ю. О., Гордиенко А. И., Туманова Е. Л. Эндотоксин и астма: друзья или враги? Патогенез. 2020;18(1):17-28. doi:10.25557/2310-0435.2020.01.17-28

2. Vereecke L., Beyaert R., van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. Trends Immunol. 2009;30(8):383–391. doi:10.1016/j.it.2009.05.007

3. Shembade N., Ma A., Harhaj E. W. Inhibition of NF-kappa B signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. Science. 2010;327(5969):1135-1139 doi:10.1126/science.1182364.

4. Zhang X., Li W., Zhang X., Zhao L., Zhang X., Jiang L., Guo Y., Zhang J., Liang Z., Wang X. Single nucleotide polymorphisms in TNFAIP3 were associated with the risks of rheumatoid arthritis in northern Chinese Han population. BMC Medical Genetics. 2014;15(1):56. doi:10.1186/1471-2350-15-56

5. Majumdar I., Ahuja V., Paul J. Altered expression of tumor necrosis factor alpha -induced protein 3 correlates with disease severity in ulcerative colitis. Scientific Reports. 2017;7(1):9420. doi:10.1038/s41598-017-09796-9

6. Altonsy M. O., Mostafa M. M., Gerber A. N., Newton R. Long-acting β 2-agonists promote glucocorticoid-mediated repression of NF-kB by enhancing expression of the feedback regulator TNFAIP3. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2017;312(3):L358-L370. doi:10.1152/ajplung.00426.2016

7. Giordano M., Roncagalli R., Bourdely P., Chasson L., Buferne M., Yamasaki S., Beyaert R., van Loo G., Auphan-Anezin N., Schmitt-Verhulst A. M., Verdeil G. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111(30):11115-11120. doi:10.1073/pnas.1406259111

8. Stein M. M., Hrusch C. L., Gozdz J., Igartua C., Pivniouk V., Murray S. E., Ledford J. G., Marques Dos Santos M., Anderson R. L., Metwali N., Neilson J. W., Maier R. M., Gilbert J. A., Holbreich M., Thorne P. S., Martinez F. D., von Mutius E., Vercelli D., Ober C., Sperling A. I. Innate

immunity and asthma risk in Amish and Hutterite farm children. N Engl J Med. 2016;(375):411–421. doi:10.1056/NEJMoa150874.

9. Ke X., Yang Y., Shen Y., Wang X., Hong S. Association between TNFAIP3 Gene Polymorphisms and Risk of Allergic Rhinitis in a Chinese Han Population. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2016;15(1):46-52.

10. Kang N. I., Yoon H. Y., Lee Y. R., Won M., Chung M. J., Park J. W., Hur G. M., Lee H. K., Park B. H. A20 attenuates allergic airway inflammation in mice. J Immunol. 2009;183(2):1488-1495. doi:10.4049/jimmunol.0900163.

11. Белоглазов В. А., Гордиенко А. И., Попенко Ю. О. Экспрессия Toll-like рецепторов 4 типа на моноцитах и гранулоцитах и их эндотоксинсвязывающий потенциал при среднетяжелой и тяжелой бронхиальной астме. Иммунология та алергология. Наука і практика. 2014;(3):51-53.

12. Белоглазов В. А. Попенко Ю. О., Шадчнева Н. А., Гордиенко А. И. Интегральные показатели антиэндотоксинового иммунитета и системного воспаления у больных бронхиальной астмой при различных биофенотипах воспаления. Патогенез. 2020;18(1):58-64. doi:10.25557/2310-0435.2020.01.58-64

REFERENCES

1. Beloglazov V. A., Popenko Yu. O., Gordienko A. I., Tumanova E. L. Endotoxin and Asthma: Friends or Foes? Patogenez. 2020;18(1):17-28. (In Russ). doi:10.25557/2310-0435.2020.01.17-28. (In Russ.)

2. Vereecke L., Beyaert R., van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. Trends Immunol. 2009;30(8):383–391. doi:10.1016/j.it.2009.05.007

3. Shembade N., Ma A., Harhaj E. W. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. Science. 2010;327(5969):1135-1139. doi:10.1126/science.1182364.

4. Zhang X., Li W., Zhang X., Zhao L., Zhang X., Jiang L., Guo Y., Zhang J., Liang Z., Wang X. Single nucleotide polymorphisms in TNFAIP3 were associated with the risks of rheumatoid arthritis in northern Chinese Han population. BMC Medical Genetics. 2014;15(1):56. doi:10.1186/1471-2350-15-56

5. Majumdar I., Ahuja V., Paul J. Altered expression of tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 correlates with disease severity in ulcerative colitis. Scientific Reports. 2017;7(1):9420. doi:10.1038/s41598-017-09796-9

6. Altonsy M. O., Mostafa M. M., Gerber A. N., Newton R. Long-acting β 2-agonists

promote glucocorticoid-mediated repression of NF- κ B by enhancing expression of the feedback regulator TNFAIP3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;312(3):L358-L370. doi:10.1152/ajplung.00426.2016

7. Giordano M., Roncagalli R., Bourdely P., Chasson L., Buferne M., Yamasaki S., Beyaert R., van Loo G., Auphan-Anezin N., Schmitt-Verhulst A. M., Verdeil G. The tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) imposes a brake on antitumor activity of CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(30):11115-11120. doi:10.1073/pnas.1406259111

8. Stein M. M., Hrusch C. L., Gozdz J., Igartua C., Pivniouk V., Murray S. E., Ledford J. G., Marques Dos Santos M., Anderson R. L., Metwali N., Neilson J. W., Maier R. M., Gilbert J. A., Holbreich M., Thorne P. S., Martinez F. D., von Mutius E., Vercelli D., Ober C., Sperling A. I. Innate immunity and asthma risk in Amish and Hutterite farm children. *N Engl J Med*. 2016;(375):411-421. doi:10.1056/NEJMoa150874.

9. Ke X., Yang Y., Shen Y., Wang X., Hong S. Association between TNFAIP3 Gene Polymorphisms and Risk of Allergic Rhinitis in a Chinese Han Population. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2016;15(1):46-52.

10. Kang N. I., Yoon H. Y., Lee Y. R., Won M., Chung M. J., Park J. W., Hur G. M., Lee H. K., Park B. H. A20 attenuates allergic airway inflammation in mice. *J Immunol*. 2009;183(2):1488-1495. doi:10.4049/jimmunol.0900163.

11. Beloglazov V. A., Gordienko A. I., Popenko Yu. O. Expression of type 4 Toll-like receptors on monocytes and granulocytes and their endotoxin-binding potential in moderate and severe bronchial asthma. *Imunologiya ta alergologiya. Nauka i praktika*. 2014;(3):51-53. (In Russ.)

12. Beloglazov V. A., Popenko Yu. O., Shadchneva N. A., Gordienko A. I. Integral indicators of antiendotoxin immunity and systemic inflammation in patients with bronchial asthma with different biophenotypes of inflammation. *Patogenez*. 2020;18(1):58-64. doi:10.25557/2310-0435.2020.01.58-64. (In Russ.)

УДК: 616.8-008.615-057.87 : 616-072.8+577(470-924.71) DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-4-17-23

ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ УРОВНЯ СТРЕССА У СТУДЕНТОВ-МЕДИКОВ

Залата О. А., Серeda Е. В., Кравченко А. Н., Гордиенко А. И., Химич Н. В.

Кафедра физиологии нормальной, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Залата Ольга Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры физиологии нормальной, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского», e-mail: olga_zalata@mail.ru

For correspondence: Olga A. Zalata, PhD, Associate Professor of the Department of normal Physiology of Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e.mail: olga_zalata@mail.ru

Information about authors:

Zalata O. A., <http://orcid.org/0000-0003-0440-2405>

Sereda E. V., <https://orcid.org/0000-0001-6554-4023>

Kravchenko A. N., <https://orcid.org/0000-0002-9992-8874>

Gordienko A. I., <http://orcid.org/0000-0002-1475-6138>

Khimich N. V., <http://orcid.org/0000-0002-5202-4413>

РЕЗЮМЕ

Целью настоящего исследования была разработка новых подходов к оценке уровня стресс-реакции у студентов-медиков в разные периоды учебной деятельности на основе комплексного анализа психофизиологических и биохимических маркеров стресса. Материалы и методы. С помощью психофизиологических и биохимических методов в динамике учебного процесса выполнена оценка уровня стресса у 29-ти студентов-медиков. У респондентов оценивали уровень ситуационной тревожности, тревоги, определяли особенности эндогенного счета времени. Уровень кортизола в слюне определяли с помощью иммуноферментного анализа. Результаты. Содержание кортизола в слюне в начале семестра было принято за базовый уровень. В конце семестра концентрация кортизола в слюне достоверно снижалась более чем на порядок ($T, p=0,003$). Уровень ситуационной тревожности в начале семестра в группе студентов соответствовал умеренному уровню. В конце семестра тревожность была достоверно выше ($T, p=0,0002$). Заключение. Обнаружили зеркальную картину между психоэмоциональными и биохимическими маркерами стресса: ситуационная тревожность респондентов увеличивалась в конце семестра, а уровень слюварного кортизола был более высоким в начале учебного года.

Ключевые слова: стресс, кортизол, слюна, психологические характеристики личности, студенты.

PSYCHOPHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL APPROACHES TO ASSESSING THE LEVEL OF STRESS IN MEDICAL STUDENTS

Zalata O. A., Sereda E. V., Kravchenko A. N., Gordienko A. I., Khimich N. V.

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

The aim of the study was development of new approaches to assessment of stress response level in medical students at different periods of educational activity based on complex analysis of psychophysiological and biochemical stress markers. Material and methods. With the help of psychophysiological and biochemical methods in the dynamics of the of the study year, an assessment of the level of stress in 29 medical students was made. At respondents estimated the level of anxiety, alarm, defined features of the endogenous account of time. The level of cortisol in saliva was determined by enzyme immunoassay. Results. The content of cortisol in saliva at the beginning of the semester was taken as a base line. At the end of the semester, the concentration of cortisol in saliva significantly decreased by more than an order of magnitude ($p = 0.003$). The level of situational anxiety at the beginning of the semester in the group of students corresponded to a moderate level. At the end of the semester, anxiety was significantly higher ($p = 0.0002$). Conclusion. They found a mirror picture between psychoemotional and biochemical markers of stress: the anxiety of respondents increased at the end of the semester, and the level of salivary cortisol was higher at the beginning of the study year.

Key words: stress, cortisol, saliva, psychological personality characteristics, students.

В начале XX века канадский физиолог Ганс Селье ввел понятие «стресса», обозначив его как неспецифическое состояние, которое вызвано воздействием различных стрессоров, нарушающих гомеостаз организма. Позднее он выде-

лил два вида биологического стресса: эустресс, способный положительно воздействовать на организм, и дисстресс, ведущий к резкому ухудшению гомеостаза и негативным последствиям, вплоть до смерти [1]. Согласно Лазарусу и Фол-

кману (Lazarus and Folkman, 1984), стресс возникает в том случае, если давление стрессора извне превышает адаптивные возможности организма, что в целом определяется результатом взаимодействия между индивидом и окружающей средой, включая его субъективное восприятие, ожидание, интерпретацию и психологическую адаптацию [2]. Чаще всего стрессорами являются внешние факторы, а стресс-реакция организма включает биологическую и биохимическую реакцию различных органов и систем, а также эмоциональный компонент [1].

Современные исследования в области педагогики и психологии показывают, что образовательный процесс может иметь непреднамеренное негативное влияние на психическое здоровье студентов медицинских ВУЗов, поскольку среди студентов-медиков часто возникают депрессии, тревога и стресс [3]. Разнообразные и многочисленные формы контроля знаний являются неотъемлемой частью медицинского образования и служат множеству целей, в том числе дают представления о состоянии знаний учащихся. Вместе с тем стресс и тревога, непосредственно связанные с экзаменами, способны играть двойственную роль. В идеале они стимулируют обучение и тем самым смещают академическую успеваемость студентов вдоль кривой Йеркса-Додсона в сторону более оптимальной точки [4]. Одновременно экзамены подготавливают студентов-медиков к стрессу, с которым они неизбежно столкнутся в своей практической деятельности. Хотя большинство студентов мотивируется тревогой и стрессом, связанными с экзаменами, для некоторых из них это может стать серьезным дистрессом, который, в свою очередь, способен негативно повлиять на профессиональное развитие и впоследствии оказать разрушительное влияние на личность [5]. Помимо сильного чувства страха или паники, субъекты, страдающие тревогой, могут испытывать другие физиологические симптомы, включая усталость, головокружение, головные боли, тошноту, боль в животе, учащенное сердцебиение, одышку и недержание мочи [6]. Тревога также может нарушать целенаправленное внимание и концентрацию внимания [7], рабочую память [8] и перцептивно-моторную функцию [9] все то, что является важными функциями высшей нервной деятельности, позволяющими студентам-медикам и врачам оказывать безопасную и эффективную медицинскую помощь пациентам.

Известно, что к объективным критериям уровня стресс-реакции относятся висцеральные реакции, которые можно регистрировать как визуально (покраснение/побледнение кожных по-

кровов, выделение пота, расширение зрачков), так и инструментально. К последним относятся гемодинамические показатели (пульс, артериальное давление), показатели системы дыхания (частота и глубина дыхания, ритмичность дыхательных актов); показатели кожно-гальванической реакции, а также данные плетизмографии (реакция сужения сосудов). Однако для более точной и расширенной оценки воздействия стрессора на организм целесообразно применять комплексный подход с оценкой физиологических и биохимических маркеров в сочетании с результатами психологических тестов. В настоящее время биохимические маркеры стресса определяют в различных биоматериалах, но наиболее часто для этого используют кровь, слюну и мочу. В слюне человека присутствует ряд маркеров, уровень которых тесно коррелирует с фазами стресса и/или его видами. Одним из таких высокоинформативных биомаркеров хронического стресса считается кортизол [10].

Традиционные методы оценки стресса в психологии часто опираются на ретроспективные модели и носят перекрёстный характер. К субъективным методам оценки уровня стресса относят большое количество психодиагностических методик, которые отличаются своим содержанием и способами интерпретации полученной информации. Для выявления степени эмоционального напряжения применяют методы наблюдения, опроса, анкетирования и тестирования, при этом выбор психодиагностической методики во многом зависит от цели и задач исследования. Существуют методики, направленные как на интегральную оценку стресса, так и выявление отдельных проявлений психоэмоционального перенапряжения.

Целью данного исследования являлась разработка новых подходов к оценке уровня стресс-реакции у студентов-медиков в разные периоды учебной деятельности на основе комплексного анализа психофизиологических и биохимических маркеров стресса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В начале и в конце осеннего семестра 2019-2020 учебного года было обследовано 29 студентов-медиков (6 юношей и 23 девушки), средний возраст которых составил $20,0 \pm 2,3$ лет. Все респонденты были ознакомлены с целью проводимого исследования и подписали лист информированного согласия о своем участии. Перед биомониторинговым и психофизиологическим этапом данной работы студенты заполнили анкету, на основании которой проводился анализ различий социально-бытовой жизни субъектов обследования (наличие вредных привычек, ре-

жим дня и особенности ночного сна, характер питания, уровень физической активности и др.).

Дизайн исследования

Пробы слюны студентов для определения концентрации кортизола собирали в 8.00 часов утра, натощак. За сутки до взятия пробы слюны участников информировали о том, что им следует отказаться от употребления спиртных напитков; за 1 час до сбора слюны нельзя принимать пищу, курить, чистить зубы (для исключения кровотечения из десен); за 10 минут до сбора слюны каждый участник должен был ополаскивать ротовую полость водой. После отбора нужного количества слюны, выполненного с соблюдением гигиенических норм, пробирки с биоматериалом помещали в специальные боксы и хранили в низкотемпературной холодильной камере (70°C). Определение концентрации кортизола в образцах слюны проводили с помощью коммерческой иммуноферментной тест-системы «Кортизол-ИФА-БЕСТ» (АО «ВЕКТОР-БЕСТ», г. Новосибирск) на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории и Центра коллективного пользования научным оборудованием «Молекулярная Биология» Медицинской академии имени С. И. Георгиевского.

Для оценки психоэмоционального состояния респондентов применяли опросник Чарльза Спилберга в русскоязычной модификации Ю. Л. Ханина. Определяли уровень личностной тревожности (ЛТ), как устойчивой характеристики субъекта и ситуационной (реактивной) тревожности (СТ), как тревожности субъекта в данный момент времени. Выделяли разные уровни тревожности, ранжируя их в соответствии с рекомендованными баллами: до 30 баллов – низкая, от 31 до 44 баллов – умеренная; 45 и более баллов – высокая тревожность [11]. Уровень СТ, как динамического показателя оценивали дважды – в начале и в конце учебного семестра. С помощью «Шкалы тревоги» по Тейлору однократно определяли уровень тревоги, считая его очень высоким при 25-40 баллах; средним с тенденцией к высокому уровню при 15-25 баллах; средним с тенденцией к низкому уровню при наборе 5-15 баллов; низким – от 0 до 5 баллов. Для выявления демонстративности и неискренности в ответах респондентов использовали шкалу лживости, введенную В. Г. Норакидзе в тест Тейлора в 1975 г.

Считается, что показатель эндогенного отсчета времени пропорционален степени эмоционального напряжения [12]. В связи с этим для достижения поставленной цели исследования применялся метод оценки длительности индивидуальной минуты (ИМ) Франца Халберга. По

команде экспериментатора студенты начинали мысленный отсчет 60 секунд, по окончании которого участник тестирования вслух произносил цифру «60». При этом истинное время фиксировалось при помощи секундомера. Для большей объективности ИМ определяли дважды, а в протокол исследования заносили средний показатель. Полученные данные сравнивали со среднестатистическими показателями для лиц данной возрастной группы. Как и уровень СТ, длительность ИМ оценивали дважды – в начале и в конце учебного семестра.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с применением программного пакета STATISTICA 10.0 (StatSoft, Inc., USA). Тип распределения полученных данных оценивали с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорс. При проведении статистического анализа использовали непараметрические методы описательной статистики; все численные показатели представлены в виде медиан и значений интерквартильного размаха (Me [p25; p75]). При оценке достоверности изменений уровня СТ, длительности ИМ и концентрации слюнного кортизола у студентов-медиков в начале и в конце семестра использовали Т-критерий Вилкоксона; различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для поиска взаимосвязей между биохимическими и психофизиологическими показателями стресса применяли корреляционный анализ по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ анкетных данных показал, что 100% респондентов отрицают применение препаратов группы глюкокортикоидных гормонов в течение последних двух недель перед началом исследования. Относительно наличия вредных привычек, было обнаружено, что 17,24 % (5) студентов курят, а 34,5 % (10) – иногда употребляют алкоголь.

При сравнительном анализе характеристик психоэмоционального состояния респондентов, длительности ИМ и концентрации кортизола в слюне удалось выявить несколько особенностей (рис. 1). Содержание кортизола в слюне в начале семестра было принято за базовый уровень. В конце семестра концентрация кортизола в слюне достоверно снижалась более чем на порядок ($p=0,003$). Уровень СТ в начале семестра в группе респондентов соответствовал умеренному уровню, в то время как в конце семестра СТ у них была достоверно выше (Т-критерий, $p=0,0002$). Медианы длительности ИМ респондентов с в начале и в конце семестра достоверно не отличались.

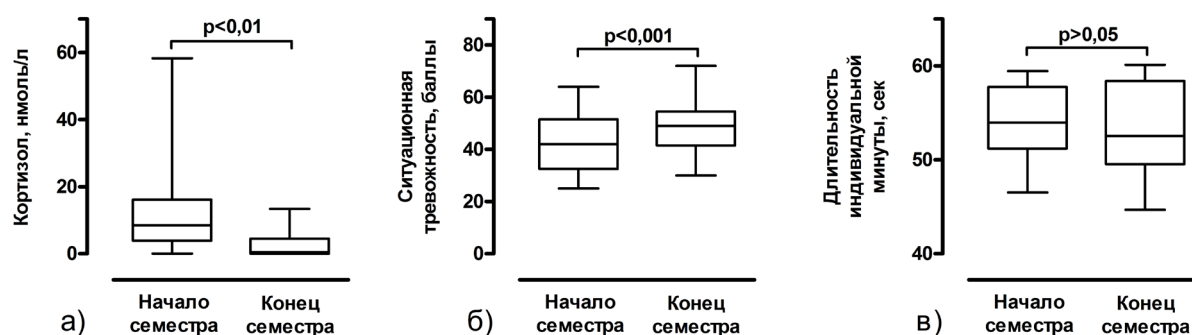


Рис. 1. Уровень слювенного кортизола (а), ситуационная тревожность (б) и длительность индивидуальной минуты (в) у студентов-медиков в разные периоды учебной деятельности. На диаграмме размаха (box-and-whiskers diagram) представлены медиана, верхний и нижний квартили, минимальное и максимальное значение показателя.

Уровень ЛТ у тестируемых студентов-медиков был высоким (45,0 [40,0; 52,0]), а степень тревоги по Тейлору соответствовала среднему уровню с тенденцией к высокому (24,0 [21,0; 34,0]).

При помощи корреляционного анализа характеристик психоэмоционального состояния студентов-медиков, длительности ИМ с концентрацией слювенного кортизола обнаружили, что имела место взаимосвязь между концентрацией кортизола в начале семестра с уровнем ситуационной ($r=0,48$; $p=0,008$) и личностной тревожности ($r=0,48$; $p=0,008$), корреляции были однонаправленными, сильными и достоверными.

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, около 45 % всех заболеваний разных категорий населения, включая студентов высших учебных заведений, прямо или косвенно связано с чрезмерным психологическим напряжением или стрессом [13]. Для студентов-медиков характерен так называемый учебный стресс, который опосредован большими объемами информации, которую должны усваивать будущие врачи, и высокими требованиями к уровню знаний со стороны профессорско-преподавательского состава. С другой стороны, учебный стресс зачастую связан с неумением студентов-медиков равномерно и рационально распределять нагрузку по подготовке как к текущим занятиям в течение семестра, так и к сессии. При этом, как показывают результаты некоторых исследований, уровень психологического стресса, тревоги и депрессии может нарастать не только в ходе отдельного семестра на одном курсе обучения, но и по мере перехода к старшим курсам обучения в медицинских вузах и колледжах [14].

Отмечено, что такие важные изменения в психоэмоциональном состоянии студентов-ме-

диков, как тревога и тревожность, заслуживают гораздо большего внимания из-за их существенного влияния на психическое и соматическое здоровье будущих специалистов в области здравоохранения. Данные перекрестных исследований, направленных на изучение распространенности тревожности среди более чем 40 тысяч студентов-медиков из разных стран, демонстрируют, что у 33,8% респондентов она достигает высокого уровня [3]. Полученные нами данные по динамике уровня СТ у обследованных студентов-медиков младших курсов в начале и в конце семестра (рис. 1) подтверждают гипотезу о том, что по мере приближения сессии у респондентов наблюдается статистически значимое возрастание степени эмоционального дискомфорта, что отражается в росте тревожности.

Восприятие времени занимает центральное место почти во всех аспектах повседневной жизни человека, начиная с принятия решения о конкретном времени удовлетворения своих основных потребностей (сон и еда) и заканчивая координацией сложных социальных взаимодействий с другими людьми. При этом в зависимости от психоэмоционального фона индивидуальное восприятие временного интервала может быть длиннее или короче инструментально фиксируемого значения [15; 16]. Исследования показывают, что воспринимаемое искажение времени индивидум испытывает, как правило, в ответ на негативные или аверсивные стимулы через ряд сенсорных модальностей [17; 18]. Все происходящие изменения (среда обитания, развитие, взаимосвязь психоэмоциональных факторов) могут оказывать существенное влияние на показатели внутренней среды организма. Такие стрессогенные факторы, как быстрый темп жизни, повышенные эмоциональные и информационные нагрузки влекут за собой катастрофическую нехватку времени, особенно у студентов-

медиков [19]. Известно, что ИМ, как коррелят внутреннего ощущения времени, представляет собой индикатор психофизиологического состояния организма, а величина ИМ пропорциональна степени эмоционального напряжения. Установлено, что низкая реактивность на стресс ассоциирована с укорочением ИМ ($37 \div 57$ с), тогда как высокая, напротив, сопровождается мобилизацией и удлинением ИМ до $70 \div 85$ с [20]. В нашем исследовании мы не получили достоверных изменений в динамике эндогенного отсчета времени студентами-медиками. Однако отметим, что медианы длительности ИМ как в начале, так и в конце семестра (соответственно 53,98 с и 52,56 с) находились в диапазоне, соответствующем низкой реактивности на стресс субъектов тестирования.

Развитие современных лабораторных методов позволяет быстро, точно и специфично определять концентрацию стресс-ассоциированных гормонов в различных биологических жидкостях, включая слюну. При этом уровень слюварного кортизола считается более информативным показателем адреналового резерва, чем содержание этого гормона в крови [21]. Показаны возрастные различия в концентрации слюварного кортизола у учащихся колледжа в постстрессовой ситуации смоделированного стресса: у студентов младших курсов зафиксированы более выраженные амплитуды постстрессового содержания кортизола в слюне [22]. В другой работе показано, что слюварный кортизол и ряд иммунорелевантных молекул (секреторный иммуноглобулин А, С-реактивный белок), выявляемые в слюне студентов, играют важную роль в протективных механизмах, и как биохимические маркеры могут использоваться для неинвазивного скрининга многих системных заболеваний [23]. Основная цель таких исследований заключается в дальнейшем раскрытии сложных взаимосвязей между психологическим стрессом, эндокринной и иммунной системами.

В нашей работе мы получили весьма интересные результаты относительно динамики слюварного кортизола как биохимического маркера стресса (рис. 1): в начале учебного года его концентрация в слюне обследованных студентов-медиков была достоверно выше, чем в конце учебного года (медианные значения отличаются в 17 раз, $p=0,003$). Психологический стресс, как особое психическое состояние, как правило характеризуется неспецифическими системными изменениями активности психики человека, выражающими ее организацию и мобилизацию в связи с повышенными требованиями в новой ситуации [1]. Если при приближении к концу семестра уровень СТ у наших респондентов до-

стоверно повышался, то уровень слюварного кортизола статистически значимо снижался, демонстрируя тем самым зеркальную картину в динамике психологических и биохимических маркеров стресса (рис. 1). В аналогичном исследовании, выполненном на небольшой группе ирландских студентов-медиков ($n=16$), были получены похожие результаты относительно изменений уровня тревожности, которая к началу сессии также возрастала ($p=0,004$), в то время как уровень слюварного кортизола достоверно не менялся ($p=0,29$) [24]. Известно, что экзаменационный стресс или ожидание экзаменов не всегда приобретают свойства дистресса. Возможно, что у студентов-медиков приближение к такого рода испытаниям в ряде случаев выступает своеобразным мобилизирующим фактором, стимулируя психические и висцеральные резервы организма.

ВЫВОДЫ

Анализ полученных результатов и их сопоставление с данными литературы даёт основание говорить о повышенном напряжении адаптационных резервов субъектов тестирования как в начале учебного семестра, так и при его завершении. При этом имела место зеркальная картина между психоэмоциональными и биохимическими маркерами стресса: ситуационная тревожность респондентов увеличивалась в конце семестра, тогда как уровень слюварного кортизола был более высоким в начале учебного года. Характер корреляционных связей между содержанием кортизола в слюне и типами тревожности позволяет говорить о тесной взаимосвязи между психической деятельностью и гуморальным контуром регуляции стресс-реакции у тестируемых студентов-медиков.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юнусова С. Г., Розенталь А. Н., Балтина Т. В. Стресс. Биологические и психологические аспекты. Ученые записки Казанского университета. Серия Гуманитарные науки. 2008;150(3):139-150.
2. Lazarus R., Folkman S. Coping and adaptation. The handbook of behavioral medicine / W.D. Gentry (ed.). New York: Guilford, 1984:282-325. doi:10.1007/978-1-4684-5257-0_23
3. Quik T. T., Team W. W., Tran B. X. The Global Prevalence of Anxiety Among Medical Students: A Meta-Analysis. Int J Environ Res Public Health. 2019;16(15):2735. doi:10.3390/ijerph16152735.
4. Cooper K. M., Downing V. R., Brownell S. E. The influence of active learning practices

- on student anxiety in large-enrollment college science classrooms. *IJ STEM Ed.* 2018;5(1):23. doi:10.1186/s40594-018-0123-6
5. Dyrbye L., Shanafelt T. A. Narrative review on burnout experienced by medical students and residents. *Med Educ.* 2016;50(1):132-149. doi:10.1111 / medu.12927
 6. Cocks A. J., Jackson R. C., Bishop D. T., Williams A. M. Anxiety, anticipation and contextual information: A test of attentional control theory. *Cogn Emot.* 2016;30(6):1037-1048. doi:10.1080/02699931.2015.1044424.
 7. Pike A. C., Printzlauf F., von Lautz A. H., Harmer C. J., Stokes M. G., Noonan M. P. Attentional Control in Subclinical Anxiety and Depression: Depression Symptoms Are Associated With Deficits in Target Facilitation, Not Distractor Inhibition. *Front Psychol.* 2020;11:1660. doi:10.31219 / osf. io/n96s3
 8. Moran T. P. Anxiety and working memory capacity: A meta-analysis and narrative review. *Psychol. Bull.* 2016;142:831-864. doi:10.1037 / bul0000051.
 9. Runswick O. R., Roca A., Williams A. M., Bezodis N. E., North J. S. The effects of anxiety and situation-specific context on perceptual-motor skill: A multi-level investigation. *Psychol. Res.* 2018;82:708-719. doi:10.1007/s00426-017-0856-8.
 10. Blair J., Adaway J., Keevil B., Ross R. Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017;24(3):161-168. doi:10.1097 / MED.0000000000000328.
 11. Райгородский Д. Я. Практическая психодиагностика. Методики, тесты. Самара: Издательский дом "БАХРАХ-М"; 2003.
 12. Thrönes S., Arnau S., Wascher E. Cognitions about time affect perception, behavior, and physiology – A review on effects of external clock-speed manipulations. *Conscious Cogn.* 2018;63:99-109. doi:10.1016 / j. concog.2018.06.014.
 13. Новгородцева И. В., Мусихина С. Е., Пьянковская В. О. Учебный стресс у студентов-медиков: причины и проявления. *Медицинские новости.* 2015;(8):75-77.
 14. Atkinson S. R. Elevated psychological distress in undergraduate and graduate entry students entering first year medical school. *PLoS One.* 2020;10;15(8). doi: org/10.1371/journal.pone.0237008
 15. Bar-Haim Y., Kerama A., Lamy D., Zakaz D. When time slows down: The influence of threat on time perception in anxiety. *Cognition & Emotion.* 2010;24(2):255-263. doi:10.1080/02699930903387603
 16. Di Lernia D., Serena S., Pezzulo G., Pedroli E., Cipresso P., Riva G. Fuel the Time. *Time Perception as a Function of Interoceptive Processing.* *Front Hum Neurosci.* 2018;12:74. doi:10.3389/fnhum.2018.00074
 17. van Wassenhove V., Buonomano D. V., Shimojo S., Shams L. Distortions of subjective time perception within and across senses. *PLOS ONE.* 2008;3(1):1437. doi: 10.1371/journal.pone.0001437
 18. Venezia J. H., Thurman S. M., Matching W., George S. E., Hickok G. Timing in audiovisual speech perception: A mini review and new psychophysical data. *Atten Percept Psychophys.* 2016;78(2):583-601. doi:10.3758/s13414-015-1026-У.
 19. Чилигина Ю. А. Влияние экзаменационного стресса на субъективную оценку времени у студентов-первокурсников. 2015;(4):122-125.
 20. Кувшинова Д. Ю. Артериальное давление, параметры нейродинамики, кардиоритма и уровень NO у юношей с максимально различающимся уровнем стресс реактивности. 2012;(8):29-31.
 21. Blair J., Adaway J., Keevil B., Ross R. Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 2017;24(3):161-168. doi:10.1097/ MED.0000000000000328
 22. Manigault A. W., Woody A., Zoccola P. M., Dickerson S. S. Education Is Associated with the Magnitude of Cortisol Responses to Psychosocial Stress in College Students. *Int J Behav Med.* 2018;25(5):532-539. doi:10.1007/s12529-018-9727-у.
 23. Campisi J., Bravo Y., Cole J., Gobeil K. Acute psychosocial stress differentially influences salivary endocrine and immune measures in undergraduate students. *Physiol Behav.* 2012;107(3):317-321. doi:10.1016/j.physbeh.2012.09.003.
 24. O'Flynn J., Dinan T. G., Kelly J. R. Examining stress: an investigation of stress, mood and exercise in medical students. *Irish journal of psychological medicine.* 2017;35(1):1-6. doi: 10.1017/ipm.2017.54

REFERENCES

1. Yunusova S. G., Rosenthal A. N., Baltina T. V. Stress. Biological and psychological aspects. *Scientific notes of Kazan University. Humanities series.* 2008;150(3):139-150. (In Russ).
2. Lazarus R., Folkman S. Coping and adaptation. *The handbook of behavioral medicine / W.D. Gentry (ed.).* New York: Guilford, 1984:282-325. doi: 10.1007/978-1-4684-5257-0_23
3. Quik T. T., Team W. W., Tran B. X., et al. The Global Prevalence of Anxiety Among Medical Students: A Meta-Analysis. *Int J Environ Res*

- Public Health. 2019;16(15):2735. doi:10.3390/ijerph16152735.
4. Cooper K. M., Downing V. R., Brownell S. E. The influence of active learning practices on student anxiety in large-enrollment college science classrooms. *IJ STEM Ed.* 2018;5(1):23. doi:10.1186/s40594-018-0123-6
 5. Dyrbye L., Shanafelt T. A. Narrative review on burnout experienced by medical students and residents. *Med Educ.* 2016;50(1):132-149. doi:10.1111/medu.12927
 6. Cocks A. J., Jackson R. C., Bishop D. T., Williams A. M. Anxiety, anticipation and contextual information: A test of attentional control theory. *Cogn Emot.* 2016;30(6):1037-1048. doi:10.1080/02699931.2015.1044424.
 7. Pike A. C., Printzlau F., von Lautz A. H., Harmer C. J., Stokes M. G., Noonan M. P. Attentional Control in Subclinical Anxiety and Depression: Depression Symptoms Are Associated With Deficits in Target Facilitation, Not Distractor Inhibition. *Front Psychol.* 2020;11:1660. doi:10.31219/osf.io/n96s3
 8. Moran T. P. Anxiety and working memory capacity: A meta-analysis and narrative review. *Psychol. Bull.* 2016;142:831-864. doi:10.1037/bul0000051.
 9. Runswick O. R., Roca A., Williams A. M., Bezodis N. E., North J. S. The effects of anxiety and situation-specific context on perceptual-motor skill: A multi-level investigation. *Psychol. Res.* 2018;82:708-719. doi:10.1007/s00426-017-0856-8.
 10. Blair J., Adaway J., Keevil B., Ross R. Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017;24(3):161-168. doi:10.1097/MED.0000000000000328.
 11. Raygorodsky D. Ya. Practical psychodiagnostics. Techniques, tests. Samara: Publishing House «BAHRAH-M»; 2003. (In Russ).
 12. Thrönes S., Arnau S., Wascher E. Cognitions about time affect perception, behavior, and physiology – A review on effects of external clock-speed manipulations. *Conscious Cogn.* 2018;63:99-109. doi:10.1016/j.concog.2018.06.014.
 13. Novgorodtseva I.V., Musikhina S.E., Pyankovskaya V.O. Educational stress in medical students: causes and manifestations. *Medical news.* 2015;(8):75-77. (In Russ).
 14. Atkinson S. R. Elevated psychological distress in undergraduate and graduate entry students entering first year medical school. *PLoS One.* 2020;10;15(8). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237008>
 15. Bar-Haim Y., Kerama A., Lamy D., Zakaz D. When time slows down: The influence of threat on time perception in anxiety. *Cognition & Emotion.* 2010;24(2):255-263. doi:10.1080/02699930903387603
 16. Di Lernia D., Serena S., Pezzulo G., Pedroli E., Cipresso P., Riva G. Fuel the Time. Time Perception as a Function of Interoceptive Processing. *Front Hum Neurosci.* 2018;12:74. doi:10.3389/fnhum.2018.00074
 17. van Wassenhove V., Buonomano D. V., Shimojo S., Shams L. Distortions of subjective time perception within and across senses. *PLOS ONE.* 2008;3(1):1437. doi: 10.1371/journal.pone.0001437
 18. Venezia J. H., Thurman S. M., Matching W., George S. E., Hickok G. Timing in audiovisual speech perception: A mini review and new psychophysical data. *Atten Percept Psychophys.* 2016;78(2):583-601. doi:10.3758/s13414-015-1026-Y.
 19. Chiligina Yu. A. Effect of exam stress on subjective time assessment in freshman students. 2015;(4):122-125. (In Russ).
 20. Kuvshinova D. Yu. Arterial pressure, neurodynamics parameters, cardiorythm and NO level in young men with maximally different levels of stress reactivity. 2012;(8):29-31. (in Russ).
 21. Blair J., Adaway J., Keevil B., Ross R. Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 2017;24(3):161-168. doi:10.1097/MED.0000000000000328
 22. Manigault A. W., Woody A., Zoccola P. M., Dickerson S. S. Education Is Associated with the Magnitude of Cortisol Responses to Psychosocial Stress in College Students. *Int J Behav Med.* 2018;25(5):532-539. doi:10.1007/s12529-018-9727-y.
 23. Campisi J., Bravo Y., Cole J., Gobeil K. Acute psychosocial stress differentially influences salivary endocrine and immune measures in undergraduate students. *Physiol Behav.* 2012;107(3):317-321. doi:10.1016/j.physbeh.2012.09.003.
 24. O'Flynn J., Dinan T. G., Kelly J. R. Examining stress: an investigation of stress, mood and exercise in medical students. *Irish journal of psychological medicine.* 2017;35(1):1-6. doi:10.1017/ipm.2017.54

НИВЕЛИРОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ IL-1В У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ПРИМЕНЕНИИ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА И УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ОБЛУЧЕНИЕМ

Иванцова Н. Л., Белякова А. Г., Дмитриевская М. И.

Кафедра фармакологии, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 294051, Бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Дмитриевская Мария Игоревна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии Медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», e-mail: m.dmitrievskaya@mail.ru

For correspondence: Dmitrievskaya Mariya Igorevna, PhD, associate professor of the Department of Pharmacology of Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: m.dmitrievskaya@mail.ru

Information about authors:

Ivantsova N. L., <http://orcid.org/0000-0003-3325-7948>

Beliakova A. G., <http://orcid.org/0000-0003-4928-5134>

Dmitrievskaya M. I., <http://orcid.org/0000-0001-5722-1726>

РЕЗЮМЕ

Для изучения влияния холекальциферола (витамина D) и ультрафиолетового облучения (УФО) на уровень IL-1 β были выделены 3 подгруппы больных с хроническим обструктивным заболеванием легких (ХОЗЛ) в фазе ремиссии, с содержанием метаболита витамина D -25(OH)D в сыворотке крови < 20 нг/мл. 1-я подгруппа получала холекальциферол в дозе 1000 МЕ (2 капли) в сутки. Больным из 2-й подгруппы назначили курсовое воздействие УФО (2 биодозы). У 3-й подгруппы лечебный комплекс включал витамин D и курсовое воздействие УФО-радиации. Контролем к больным указанных групп являлись группа больных ХОЗЛ в фазе ремиссии с содержанием метаболита витамина D -25(OH)D в сыворотке крови < 20 нг/мл, которым в лечебный комплекс витамин D и курс УФО-радиации не включались.

В результате исследования было показано, что у больных ХОЗЛ с дефицитом метаболита витамина D -25(OH)D, при комбинированном применении заместительной терапии холекальциферолом и УФО, значительно увеличивается показатель IL-1 β в сыворотке крови. Полученные данные исследования расширяют понимание патогенеза ХОЗЛ на фоне дефицита витамина D, что следует учитывать при формировании лечебных комплексов.

Ключевые слова: холекальциферол, IL-1 β , ХОЗЛ, УФО.

LEVELING INDICATORS IL-1B COMBINATION USAGE OF CHOLECALCIFEROL AND UV RADIATION IN COPD

Ivantsova N. L., Beliakova A. G., Dmitrievskaya M. I.

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

3 subgroups of patients with COPD in remission with a serum cholecalciferol content of <20 ng / ml were identified to study the effect of cholecalciferol and UV radiation on the level of IL-1 β . The 1st subgroup received vitamin D3 in dose 1000 IU (2 drops) per day. Course exposure of UV radiation 2 minimum erythematous doses (2 MED) were prescribed to the patients of the 2nd subgroup. The 3rd subgroup included complex treatment of vitamin D and UV radiation. The control for the patients of these groups was a group of patients with COPD in remission with a serum 25 (OH) D3 content <20 ng / ml, which were not included in the vitamin D complex and the course of UV radiation.

As a result of the study, it was shown that the IL-1 β index in the blood serum is significantly increased in patients with COPD with a deficiency of vitamin D, who received combination of replacement therapy with vitamin D and UV radiation. The obtained research data expands the understanding of the pathogenesis of COPD against the background of vitamin D deficiency, which should be taken into account when forming therapeutic complexes.

Key words: cholecalciferol, IL-1 β , COPD, UV radiation.

Около 50 % населения планеты страдает дефицитом витамина D в разной степени выраженности [1; 3]. Существует предположение, что ХОЗЛ к 2025 году может выйти на третье место среди самых частых причин смерти [2; 5]. В связи с чем, актуальность проблемы протекания болезни у больного ХОЗЛ на фоне дефицита витамина D обусловлена

достаточно высоким уровнем распространения этих заболеваний. Относить ХОЗЛ к заболеваниям, которые могут быть связаны с дефицитом витамина D, стали сравнительно недавно [3; 7]. В настоящее время все больше исследований рассматривают ХОЗЛ как заболевание, при котором перспективно применение витамина D [5; 6].

Предметом нашего исследования стало изучение уровня ИЛ-1 β у больных ХОЗЛ с разной степенью дефицита витамина D [9]. Исследуемый интерлейкин обладает выраженным провоспалительным эффектом [4; 8; 10]. Для него характерно: повышение уровня простагландинов и коллагенов в очаге воспаления, усиление продукции других цитокинов, стимуляция фагоцитоза и дегрануляция тучных клеток. В результате происходит активация экссудативной и пролиферативной фаз воспаления. Можно предположить, что перечисленные свойства ИЛ-1 β могут оказывать влияние на тяжесть течения заболевания у больных ХОЗЛ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Определение метаболита витамина D -25(OH)D₃ в сыворотке крови проводилось с использованием набора для определения витамина D 25-OH в плазме и сыворотке ELISA (Immunodiagnostik, Bensheim, Германия) согласно инструкции изготовителя.

Определение интерлейкина ИЛ-1 β в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора (ООО «Цитокины» ИЛ-1).

Исследование состояло из двух этапов. На первом этапе нами были отобраны больные ХОЗЛ в фазе ремиссии, которые были разделены на 3 группы в зависимости от уровня метаболита витамина D -25(OH)D в сыворотке. В 1-й группе (41 чел.) уровень метаболита витамина D -25(OH)D был более 40 нг/мл. Во 2-й группе (38 чел.) уровень метаболита витамина D -25(OH)D находился в диапазоне от 40 до 20 нг/мл. У больных 3-й группы (42 чел.) его уровень отмечался ниже 20 нг/мл, что соответствовало выраженному дефициту витамина D. Контрольная группа состояла из здоровых людей (28 чел). В каждой группе определялся уровень ИЛ-1 β в сыворотке крови. Целью первого этапа исследования являлось определение зависимости уровня ИЛ-1 β от выраженности дефицита витамина D у исследуемых пациентов.

На втором этапе для оценки клинической эффективности реабилитации больных ХОЗЛ нами была выделена группа больных с дефицитом витамина D, которая была поделена на три подгруппы в зависимости от методик лечения. Так, 1-ю подгруппу составили 18 больных ХОЗЛ в фазе ремиссии с содержанием метаболита витамина D -25(OH)D в сыворотке крови < 20 нг/мл, которым в лечебный комплекс включался витамин D. Во 2-ю подгруппу вошли 20 больных ХОЗЛ в фазе ремиссии с содержанием метаболита витамина D -25(OH)D₃ в сыворотке крови < 20 нг/мл, которым проводилось курсовое воз-

действие УФ-радиации. В 3-ю подгруппу были включены 28 больных ХОЗЛ в фазе ремиссии с содержанием метаболита витамина D -25(OH)D₃ в сыворотке крови < 20 нг/мл, которым в лечебный комплекс включался витамин D и одновременно проводилось курсовое воздействие УФ-радиации.

Контролем к больным указанным групп являлись 42 больных ХОЗЛ в фазе ремиссии с содержанием метаболита витамина D -25(OH)D в сыворотке крови < 20 нг/мл, которым в лечебный комплекс витамин D и курс УФ-радиации не включались.

Применялся водный раствор холекальциферола для перорального применения в дозе 1000 МЕ в сутки в течение 30 дней.

Курсовое воздействие УФО проводилось на проекцию легких, по 4-м полям от лампы интегрального спектра с расстояния 50 см, площадь облучения 400 см². Первое и второе поле представлены задней правой и левой поверхностями грудной клетки, третье и четвертое поле охватывали боковые поверхности грудной клетки. В один день облучалось только одно поле. Каждое поле облучалось по 3 раза (курс 12 процедур). Курсовая доза облучения составила 2 биодозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты первого этапа исследования уровня ИЛ-1 β в сыворотке крови у больных ХОЗЛ с разной степенью дефицита витамина D, представлены в табл. 1 и на рис. 1.

На втором этапе наших исследований изучались разные схемы лечения больных ХОЗЛ в стадии ремиссии. В табл. 2 представлены данные уровни ИЛ-1 β в сыворотке крови в каждой исследуемой группе с дефицитом метаболита витамина D -25(OH)D₃ ≤ 20 нг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя результаты собранного материала, можно наблюдать, что повышение уровней ИЛ-1 β в сыворотке крови выявлено во всех груп-

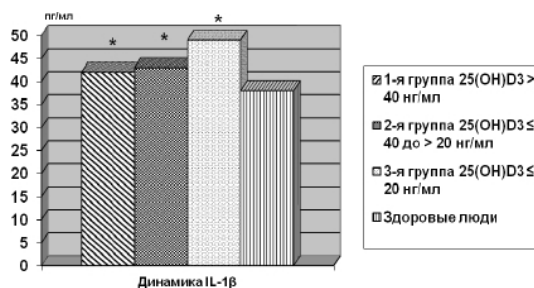


Рис. 1. Уровни ИЛ-1 β в системном кровотоке у больных ХОЗЛ, находящихся в фазе ремиссии в зависимости от содержания метаболита витамина D -25(OH)D в сыворотке крови, нг/мл

Таблица 1

Уровень IL-1 β в сыворотке крови у больных ХОЗЛ в стадии в фазе ремиссии в зависимости от содержания метаболита витамина D -25(OH)D в сыворотке крови, нг/мл

Группы	Статистические характеристики	IL-1 β
1-я группа, ХОЗЛ в фазе ремиссии, уровень метаболита витамина D -25(OH)D3 > 40 нг/мл	M \pm m n p	42,0 \pm 1,4 41 < 0,05
2-я группа, ХОЗЛ в фазе ремиссии, уровень метаболита витамина D -25(OH)D3 в диапазоне от \leq 40 до > 20 нг/мл	M \pm m n p p1	43,3 \pm 1,1 38 < 0,01 < 0,5
3-я группа, ХОЗЛ в фазе ремиссии, уровень метаболита витамина D -25(OH)D3 \leq 20 нг/мл	M \pm m n p p1 p2	49,3 \pm 2,0 42 < 0,001 < 0,01 < 0,01
Здоровые люди	M \pm m n	37,5 \pm 1,4 28

Примечания: p – достоверность различий, высчитанная в сравнении с группой здоровых лиц, p₁ – достоверность различий, высчитанная в сравнении с 1-й группой, p₂ – достоверность различий, высчитанная в сравнении со 2-й группой.

Таблица 2

Динамика уровня цитокина IL-1 β у больных ХОЗЛ в фазе ремиссии с дефицитом витамина D под влиянием различных схем лечения, нг/мл

Группы	Статистические характеристики	IL-1 β	
		При поступлении	При выписке
1-я группа ХОЗЛ + дефицит витамина D	M \pm m n p	49,3 \pm 2,0 42 –	48,7 \pm 2,0 38 > 0,5
2-я группа ХОЗЛ + дефицит витамина D - (+ витамин D)	M \pm m n p	47,7 \pm 1,8 18 –	44,8 \pm 1,6 16 > 0,05
3-я группа ХОЗЛ + дефицит витамина D (+ УФ-радиация)	M \pm m n p	48,8 \pm 2,2 20 –	45,4 \pm 1,6 19 > 0,05
4-я группа ХОЗЛ + дефицит витамина D (+ витамин D + УФ-радиация)	M \pm m n p	50,3 \pm 2,0 28 –	44,4 \pm 1,7 27 < 0,05

пах больных ХОЗЛ. При этом, если у больных 1-й группы исследованный показатель повышен на 12,0% (p < 0,05), то у больных 3-й группы – на 31,5% (p < 0,001, p₁ и p₂ < 0,01), что также статистически значимо выше, чем у больных как 1-й, так и 2-й групп. Проведенные нами исследования, результаты которых показывают, с одной стороны, что распространенность дефицита витамина D (содержания метаболита витамина D -25(OH)D < 20 нг/мл) у больных ХОЗЛ составляет 35,8% у больных в фазе ремиссии, с другой, что наличие дефицита витамина D у больных ХОЗЛ является фактором, усугубляющим тяжесть течения заболевания. Эти научные факты

можно рассматривать как патофизиологическое обоснование целесообразности коррекции дефицита витамина D в комплексной реабилитации больных ХОЗЛ с дефицитом витамина D.

Нами установлено, что уровень цитокина IL-1 β у больных 1-й, 2-й и 3-й групп на фоне монотерапии витамином D или УФО, существенно не меняется. У больных же 4-й группы при комплексном применении холекальциферола и УФО, исследованный показатель достоверно снижается на 11,7 % (p < 0,05).

Таким образом, нами установлено, что сочетанное использование заместительной терапии витамином D и УФ-радиации у больных ХОЗЛ

с дефицитом витамина D способствует не только снижению системного потенциала провоспалительного цитокина IL-1 β , но существенно снижает риск прогрессирования ХОЗЛ за счет прогрессирования фиброобразования в бронхолегочной системе.

Результаты исследования расширяют понимание патогенеза ХОЗЛ на фоне дефицита витамина D, что следует учитывать при формировании лечебных комплексов.

С учетом полученных результатов, имеет смысл рассмотреть вопрос о применении комбинации витамина D и УФО в осенне-зимний период у больных ХОЗЛ, что приводит к снижению уровня цитокина IL-1 β и, как следствие, к снижению воспалительной реактивности бронхолегочной системы.

ВЫВОДЫ

Дефицит витамина D у больных ХОЗЛ в фазе ремиссии является фактором риска возникновения дисбаланса системного цитокинового потенциала IL-1 β – важной составляющей системной и локальной воспалительной реакции.

Комплексное применение витамина D и УФ-радиации у больных ХОЗЛ в фазе ремиссии на фоне дефицита витамина D приводит к коррекции провоспалительного цитокина IL-1 β , что способствует уменьшению риска хронической воспалительной реакции и в целом способствует улучшению прогноза течения заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьева Н. Ю., Шарабрин Е. Г., Кузнецов А. Н. Хроническая обструктивная болезнь легких: определение, механизмы развития и естественное течение. Медицинский альманах. 2008;4(5):35-38.
2. Данилко К. В. Ассоциация полиморфных маркеров генов цитокинов (IL1B, IL1RN, TNFA, LTA, IL6, IL8, IL10) с развитием хронической обструктивной болезни легких. Молекулярная биология. 2007;41(1):26-36.
3. Кароли Н. А. Факторы риска смерти пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. Клиническая медицина. 2006;9:24-27.
4. Мальцев С. В., Мансурова Г. Ш. Метаболизм витамина D и пути реализации его основных функций. Практическая медицина. 2014;9:12-18.
5. Осипов Д. А., Купаев В. И. Витамин D и хроническая обструктивная болезнь легких. Современный взгляд на проблему. Практическая пульмонология. 2019;3:25-27.
6. Угай Л. Г., Кочеткова Е. А., Невзорова В. А. Витамин D и болезни органов дыхания: мо-

лекулярные и клинические аспекты. Дальневосточный медицинский журнал. 2012;3:115-119.

7. Aleksandrova N. P., Danilova G. A., Aleksandrov V. G. Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1b in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2015;209(4):85-90. doi: 10.1016/j.resp.2014.12.006.

8. Barnes P. J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2016;138(1):16-27. doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011

9. Moustaki M., Loukou J., Priftis K. Role of vitamin D in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *World J Clin Pediatr.* 2017;6(3):132-142. doi: 10.5409/wjcp.v6.i3.132

10. Honglei C., Rong L., Yong-guo Z. Vitamin D Receptor Deletion Leads to the Destruction of Tight and Adherens Junctions in Lungs. *Tissue Barriers.* 2018;6(4):5-18. doi: 10.1080/21688370.2018.1540904

REFERENCES

1. Grigorieva N. Yu., Sharabrin E. G., Kuznetsov A. N. Chronic obstructive pulmonary disease: definition, mechanisms of development and natural history. *Medical almanac.* 2008;4(5):35-38. (In Russ).
2. Danilko K. V. Association of polymorphic markers of cytokine genes (IL1B, IL1RN, TNFA, LTA, IL6, IL8, IL10) with the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Molecular biology.* 2007;41(1):26-36. (In Russ).
3. Karoli N. A. Risk factors for death in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical medicine.* 2006;9:24-27. (In Russ).
4. Maltsev S. V., Mansurova G. Sh. Vitamin D metabolism and ways of implementing its main functions. *Practical medicine.* 2014;9:12-18. (In Russ).
5. Osipov D.A., Kupaev V.I. Vitamin D and chronic obstructive pulmonary disease. A modern view of the problem. *Practical pulmonology.* 2019;3:25-27. (In Russ).
6. Ugai L.G., Kochetkova E.A., Nevzorova V.A. Vitamin D and respiratory diseases: molecular and clinical aspects. *Far Eastern medical journal.* 2012;3:115-119. (In Russ).
7. Aleksandrova N. P., Danilova G. A., Aleksandrov V. G. Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1b in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2015;209(4):85-90. doi: 10.1016/j.resp.2014.12.006.
8. Barnes P. J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary

disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;138(1):16-27. doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011

9. Moustaki M., Loukou J., Priftis K. Role of vitamin D in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis

bronchiectasis. *World J Clin Pediatr*. 2017;6(3):132-142. doi: 10.5409 / wjcp.v6.i3.132

10. Honglei C., Rong L., Yong-guo Z. Vitamin D Receptor Deletion Leads to the Destruction of Tight and Adherens Junctions in Lungs. *Tissue Barriers*. 2018;6(4):5-18. doi: 10.1080 / 21688370.2018.1540904

УДК: 612.063

DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-4-29-35

ВЛИЯНИЕ МИОКИНОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ГОРМОН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ В МСК И КЛЕТКАХ АДИПОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Мишра А.^{1,2}, Цыпандина Е. В.³, Гапонов А. М.¹, Румянцев С. А.⁴, Ханферьян Р. А.⁵,

Шестопапов А. В.¹

¹НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева), 117997 ул. Саморы Машела, д. 1, г. Москва, Россия

²Московский физико-технический институт (МФТИ), 141701, Институтский пер., 9, Московская область, г. Долгопрудный, Россия

³ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии, НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, 107031, ул. Петровка, д. 25, стр. 2, г. Москва, Россия

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, 117997, ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, Россия

⁵Российский университет дружбы народов, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6, г. Москва, Россия

Для корреспонденции: Мишра Апуурва, аспирант МФТИ, лаборатории инфекционной иммунологии НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: mishra@phystech.edu

For correspondence: Apoorva Mishra, PhD candidate in Biological Sciences, researcher in the laboratory of infectious immunology “Dmitry Rogachev National Medical Research Center for Pediatric Hematology Oncology and Immunology”, e-mail: mishra@phystech.edu

Information about authors:

Mishra A., <https://orcid.org/0000-0001-5594-3805>

Tsybandina E. V., <https://orcid.org/0000-0002-9037-9266>

Gaponov A. M., <https://orcid.org/0000-0002-3429-1294>

Rumyantsev S. A., <https://orcid.org/0000-0002-7418-0222>

Khanferyan R. A., <https://orcid.org/0000-0003-1178-7534>

Shestopalov A. V., <https://orcid.org/0000-0002-1428-7706>

РЕЗЮМЕ

Базовым метаболическим процессом, обеспечивающим функцию как белой, так и бурой/бежевой жировой ткани, является липолиз – ступенчатый ферментативный процесс гидролиза триацилглицеридов жировой ткани. Многократно показано, что физическая активность активирует липолиз. В последнее время установлено, что скелетные мышцы обладают эндокринной активностью, продуцируя ряд мышечных гормонов – миокинов. В литературе имеются неполные сведения о взаимоотношении скелетных мышц и жировой ткани.

Исследовано влияние секретируемых миоцитами цитокинов (миокинов) – метеорин-подобного белка (METRNL) и β-аминоизомасляная кислота (BAIBA), а также адренергического агониста изопротеренола на содержание общей и фосфорилированной (Ser552) гормон-чувствительной липазы (ГЧЛ) в мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани (МСК) и клеточных продуктах их адипогенной дифференцировки. В ходе исследования МСК были получены из жировой ткани 5 здоровых доноров. Адипогенная дифференцировка МСК продолжалась в течение 21 дня. После того, как были получены адипогенные культуры, вносили стимуляторы в следующих концентрациях: 5мкМ METRNL, 5мкМ BAIBA и 5 мкМ изопротеренола. С помощью вестерн-блоттинга оценили изменение содержания общей и активной (Ser552) ГЧЛ в клетках трех различных видов адипогенной дифференцировки в МСК. Мы наблюдали, что ГЧЛ и ее активная форма продуцируются в клеточных культурах, индуцированных факторами белой, бежевой и бурой адипогенной дифференцировки.

Ключевые слова: адипоциты; мезенхимальные стволовые клетки; метеорин-подобный белок; BAIBA.

EFFECT OF MYOKINES ON THE QUANTITY OF HORMONE SENSITIVE LIPASE IN MSCS AND THE PRODUCTS OF THEIR ADIPOGENIC DIFFERENTIATION

Mishra A.^{1,2}, Tsybandina E. V.³, Gaponov A. M.¹, Rumyantsev S. A.⁴, Khanferyan R. A.⁵, Shestopalov A. V.¹

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, 117997 Samory Mashela 1, Moscow, Russia

²Moscow Institute of Physics and Technology, 141701, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Russia

³V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology of Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, 107031, Petrovka 25, bldg. 2, Moscow, Russia

⁴N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Ostrovetyanovo 1, Moscow, Russia

⁵Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Ulitsa Miklukho-Maklaya, 6, Moscow, Russia

SUMMARY

The basic metabolic process associated with white and beige/brown adipose tissues is lipolysis – the sequential enzymatic process of the hydrolysis of triglycerides in the adipose tissue. It has been repeatedly shown that physical activity activates lipolysis. It has recently been shown that skeletal muscles have an endocrine role; producing a host of myogenic hormones – myokines. Current literature has an incomplete understanding of the interdependent relationship between skeletal muscles and adipose tissue.

We researched the influence of myocyte secreted cytokines (myokines) – meteorin-like protein (METRNL) and β -aminoisobutyric acid (BAIBA), and the adrenergic agonist isoproterenol on the levels of total and phosphorylated (Ser552) hormone sensitive lipase (HSL) in adipose tissue derived mesenchymal stromal cells (MSCs) and the cellular products of their adipogenic differentiation. The MSCs were obtained from 5 healthy donors. The adipogenic differentiation protocol was carried out for a span of 21 days. After procuring the adipocyte cultures, the following stimulators were added – 5 μ M METRNL, 5 μ M BAIBA, and 5 μ M isoproterenol. With the help of western blot, the change in the amount of total and activated levels of HSL were monitored in cells of three different adipogenic differentiation protocols in MSCs. We observed that HSL and its activated form are produced in cell cultures induced with factors for white, beige, and brown adipogenic differentiation.

Key words: adipocytes; mesenchymal stem cells; meteorin-like protein; BAIBA.

В организме человека сосуществуют три вида жировой ткани: белая, бурая и бежевая. Несмотря на то, что все вместе они рассматриваются как «жировая ткань», они имеют различное клеточное происхождение, морфологию и функции в организме. В то время как белая жировая ткань депонирует энергию в виде триацилглицеридов в одиночной липидной вакуоли, бурая и бежевая жировая ткань содержат несколько липидных включений и больше цитоплазмы, что позволяет им функционировать на более высоком метаболическом уровне. Третий тип жировой ткани – бежевая – является продуктом дифференцировки/трансдифференцировки белых адипоцитов под действием специальной стимуляции и обозначается как «браунинг».

Бурая жировая ткань играет важную роль в поддержании температуры тела путем выработки тепла. Бурая жировая ткань, характерной, как казалось раньше, только для мелких млекопитающих и новорожденных, с недавних времен привлекла большое внимание после выявления ее функциональной активности у взрослых и потенциальной роли в лечении ожирения и сахарного диабета. Многочисленные исследования показали, что трансплантация или активация бурых или бежевых адипоцитов снижает степень ожирения и улучшает чувствительность к инсулину [1; 2].

Влияние физических упражнений на термогенез бурой жировой ткани получил противоречивые результаты. При исследовании на людях отмечалось снижение активности бурой жировой ткани (измеряемой по снижению поглощения глюкозы) в ответ на физическую нагрузку [3].

В белой жировой ткани физические упражнения уменьшают размер адипоцитов, изменяют экспрессию генов и увеличивают активность митохондрий. Трансплантация тренированных подкожных белых адипоцитов улучшает метаболическое здоровье всего тела [4]. Таким образом, изменения в жировой ткани, вызван-

ные физическими упражнениями, могут быть частью механизма, с помощью которого физические упражнения улучшают метаболическое здоровье [5].

Базовым метаболическим процессом, обеспечивающим функцию как белой, так и бурой/бежевой жировой ткани, является липолиз – ступенчатый ферментативный процесс гидролиза триацилглицеридов жировой ткани.

Многokrратно показано, что физическая активность активирует липолиз, что подтверждается увеличением концентрации свободных жирных кислот и глицерола в сыворотке крови. Эта активация вызвана секрецией катехоламинов, натрийуретических пептидов, гормона роста и кортизола [6; 7].

В последнее время установлено, что скелетные мышцы обладают эндокринной активностью, продуцируя ряд мышечных гормонов – миокинов. К ним относятся ирисин, метеорин-подобный белок (METRNL), β -аминоизобутират (BAIBA), миостатин, фактор роста фибробластов 21 (FGF21), интерлейкин-6 и ряд других факторов [8; 9]. В литературе имеются неполные сведения о влиянии данных факторов на липолиз [10; 11]. Однако, влияние этих факторов на активность ГЧЛ в различных типах жировой ткани отсутствуют.

Поэтому целью нашей работы явилось изучение влияния миокинов (метеорин-подобного белка и BAIBA) на содержание гормон-чувствительной липазы в клетках жировой ткани различных линий дифференцировки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали 5 образцов МСК выделенных из жировой ткани здоровых доноров, полученной в процессе косметической липосакции. Все доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании.

МСК из жировой ткани выделяли с использованием 0,2% коллагеназы типа I (Панэко) в

течение 45 минут при 37°C в шейкере. Последующую стромально-сосудистую фракцию высеивали во флаконы T-75 (Corning) и доводили до конфлуенции 80-85% с помощью базальной среды – DMEM/F12 (Панэко) с 2мМ L-глутамина, 10% FBS и 40 мкг/мл гентамицина. После того, как ADSCs были пересеяны как минимум 6 раз, был начат протокол адипогенной дифференцировки.

Культуру белых адипоцитов получали из МСК путем их культивирования в среде MesenCult Adipogenic Differentiation Medium (StemCellTechnologies) после 21 дней.

Адипогенная дифференцировка для бурых и бежевых адипоцитов проводилась в чередующихся фазах индукции (4 дня) с последующим поддержанием (3 дня) в течение 21 дня.

Культуру бурых адипоцитов получали из МСК путем их инкубации с 125 нг/мл BMP7 (PeproTech) в течение 3 дней до начала индукции. Во время индукционной фазы адипоциты выращивались в MesenCult Adipogenic Differentiation Medium (StemCellTechnologies), с добавлением 1нМ T3 (Сигма) и 1 мкМ розиглитазон (Сигма). Во время фазы поддержки они росли на базальной среде для МСК.

Культуру бежевых адипоцитов получали из адипоцитов путем их культивирования в MesenCult Adipogenic Differentiation Medium (StemCellTechnologies), с добавлением 1нМ T3 (Сигма) во время фазы индукции и на базальной среде для МСК во время фазы поддержки.

В конце 21-дневного цикла дифференцировки клетки были обработаны одним из следующих стимуляторов: 5 мкМ метеорин-подобным белком (METRNL) (Aviscera Bioscience, США), 5 мкМ бета-аминоизомасляной кислотой (BAIBA) (Сигма, США) и 5 мкМ изопротеренолом (Сигма, США) в течение 16 часов.

Уровень общей ГЧЛ и ее фосфорилированной формы (Ser552) определяли методом иммуноблота с использованием специфичных моноклональных антител. Клеточные лизаты были получены при обработке клеток лизисным буфером NP40. Концентрацию белка измеряли методом Брэдфорда с использованием красителя Кумасси G-450, затем образцы разбавляли до концентрации 1 мг/мл. Белки в образцах денатурировали путем инкубации с загрузочным буфером при температуре 95°C в течение 10 минут. Затем белки разделяли в 12% СДС-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм). Мембрану блокировали в 5% NFDМ в течение 12 часов при температуре +4°C, после добавляли первичные антитела HSL (orb40070) и HSL (p-Ser552) (orb99159) в концентрации [1:1000].

Статистическую обработку проводили параметрическими и непараметрическими методами с использованием критерия Стьюдента и Уилкоксона с помощью программы OriginLab.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наши результаты показали, что в интактном состоянии в МСК отсутствует экспрессия ГЧЛ. При стимуляции МСК адrenomиметиком изопротеренолом, и миокинами ГЧЛ также не появляется (табл. 1, табл. 2). Вероятно, это свидетельствует о том, что в мультипотентных стволовых клетках липолиз не является обязательным метаболическим процессом.

В результате адипогенной дифференцировки активируется синтез ГЧЛ, о чем свидетельствует обнаружение этого фермента в белых, в бурых и бежевых адипоцитах (рис. 1). При этом максимальное содержание общей и фосфорилированной формы ГЧЛ обнаружено в белых адипоцитах. Содержание ГЧЛ в бурых адипоцитах было ниже, чем в белых в 2,21 раз, при этом содержание активной фосфорилированной ГЧЛ формы было значительно ниже (в 2,73 раза). В бежевых адипоцитах содержание ГЧЛ было минимальным – в 5,3 и 2,4 раз меньше, чем в белых и бурых адипоцитах, соответственно. При этом содержание фосфорилированной формы ГЧЛ было 1,76 раз больше, чем в бурых адипоцитах.

Таким образом, при различной адипогенной дифференцировке наблюдается разное содержание ГЧЛ: максимальное в белых адипоцитах, при этом 42,58% в активной фосфорилированной форме, а промежуточное в бурых адипоцитах, но только 34,4% в активной форме.

Стимуляция культур различной адипогенной дифференцировки метеорин-подобных белков и BAIBA, не показала статистически значимых изменений в содержании ГЧЛ (табл.1, рис. 1). Также, при стимуляции миокинами, не изменилось уровень активной фосфорилированной формы этого фермента (табл. 2, рис. 2).

Классический активатор липолиза изопреналин показал статистически значимое уменьшение содержания общей гормон-чувствительной липазы (табл. 1, рис. 1). Данный факт, вероятно, свидетельствует об активации изопреналином протеосомной дегградации ГЧЛ по принципу отрицательной обратной связи регуляции липолиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследования нами установлена индукция экспрессии ГЧЛ во всех трех типах адипогенной дифференцировки и отсутствие статистически значимого влияния

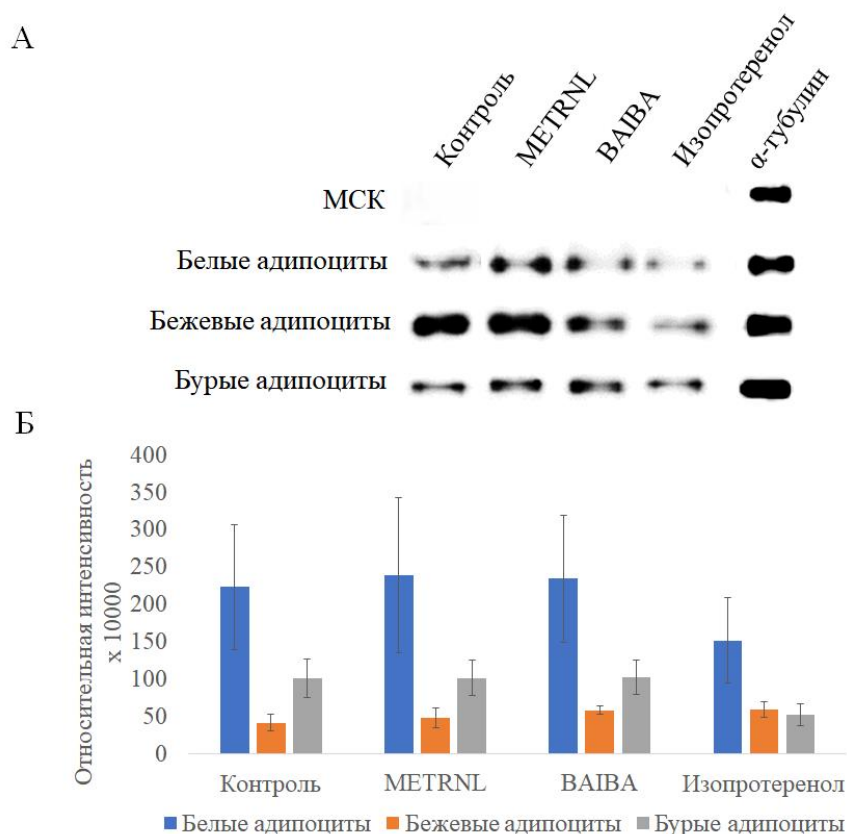


Рис. 1. Экспрессия ГЧЛ в адипоцитах: Лизаты белых, бежевых и бурых адипоцитов были количественно проанализированы с помощью иммуноблоттинга. (а) полоски на нитроцеллюлозных мембранах (б) относительная интенсивность полосовых сигналов (x10000), рассчитанная по отношению к интактным культурам внутри каждого вида адипоцитов (т. е. белый, бежевый и бурый отдельно).

Таблица 1

Содержание ГЧЛ в клетках адипогенной дифференцировки

		Контроль	METRNL	BAIBA	Изопротеренол
МСК	Медиана	0	0	0	0
	Q1	0	0	0	0
	Q3	0	0	0	0
Белые адипоциты	Медиана	900218.3	629695.9	487021.5	482725.9
	Q1	650145.5	376818	199262.5	342438.1
	Q3	1200646	1103005	1059750	915789.6
Бежевый адипоциты	Медиана	614878.5			
	$p_1 < 0.05$	427606.1	509554.6	604476.8	
	Q1	562364.6	338059	428310	547907.5
	Q3	664605.1	576990.6	664000.1	710775.2
Бурый адипоциты	Медиана	289110.6			
	$p_1 < 0.05$	238794.6	720006.7	296391.5	
	Q1	223856.3	178056.3	519250.2	248364.7
	Q3	412911.8	320707.8	1606596	394454.9

Примечания: p_1 – при сравнении с белыми адипоцитами. p_2 – при сравнении с соответствующей интактной клеточной культурой

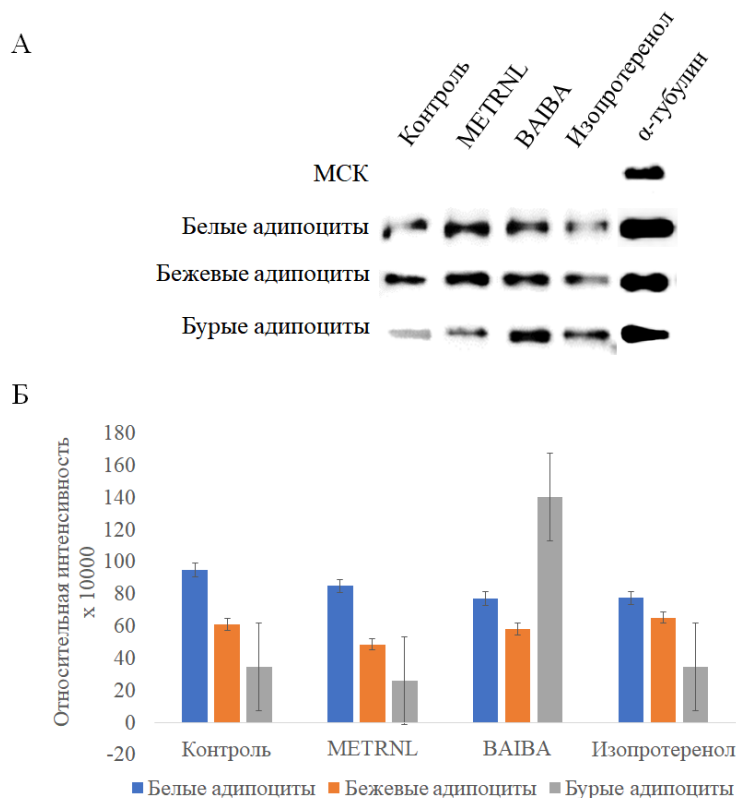


Рис. 2. Экспрессия ГЧЛ Ser552 в адипоцитах: Лизаты белых, бежевых и бурых адипоцитов были количественно проанализированы с помощью иммуноблоттинга. (а) полоски на нитроцеллюлозных мембранах (б) относительная интенсивность полосовых сигналов (x10000), рассчитанная по отношению к интактным культурам внутри каждого вида адипоцитов (т. е. белый, бежевый и бурый отдельно).

Таблица 2

Содержание ГЧЛ в клетках адипогенной дифференцировки

		Контроль	METRNL	BAIBA	Изопротеренол
МСК	Медиана	0	0	0	0
	Q1	0	0	0	0
	Q3	0	0	0	0
Белые адипоциты	Медиана	2090847	2173099	2180587	1084410 $p_2 < 0,05$
	Q1	1633541	1517560	1703371	925311.3
	Q3	2689641	3048104	2823120	1678473
Бежевые адипоциты	Медиана	330676.6 $p_1 < 0,05$	448182.8	594420.5	629105.4
	Q1	280379.4	361621.5	550354.7	523306.3
	Q3	468244.3	570334.1	629864.2	699261.3
Бурые адипоциты	Медиана	883709.6 $p_1 < 0,05$	1060735	1067019	416041.9
	Q1	690804.6	704887.4	708561.1	364172.2
	Q3	1202827	1373072	1390204	572584.4

Примечания: p_1 – при сравнении с белыми адипоцитами. p_2 – при сравнении с соответствующей интактной клеточной культурой

на эти процессы гормонов мышечной ткани метеорин-подобного белка и ВАИВА.

Финансирование. Работа выполнена в рамках договора № 03731001221200000006, по проекту «Изучение эффектов молекул-кандидатов видонеспецифических медиаторов систем QS на толерогенную и провоспалительную активности клеток иммунной системы, на клеточные культуры адипогенной дифференцировки МСК и на клеточные культуры трансформированных линий кишечного эпителия. Разработка лабораторного регламента получения ГЛФ кандидатного препарата».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. This research was conducted under the contract number 03731001221200000006 belonging to the project “Study on the effect of molecular candidates on species-specific mediators of QS systems on the immunological tolerance and proinflammatory activity of immune cells on cell cultures of adipogenic differentiation from MSCs and on transformed intestinal epithelial cell cultures. The development of laboratory regulated production of viable drug dosage form.

Conflict of Interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА

1. Soler-Vázquez M. C., Mera P., Zagmutt S., Serra D., Herrero L. New Approaches Targeting Brown Adipose Tissue Transplantation as a Therapy in Obesity. *Biochemical Pharmacology*. 2018;155:346–355. doi:10.1016/j.bcp.2018.07.022.
2. White J. D., Dewal R. S., Stanford K. I. The Beneficial Effects of Brown Adipose Tissue Transplantation. *Molecular Aspects of Medicine*. 2019;68:74–81. doi:10.1016/j.mam.2019.06.004.
3. Lehnig A. C., Stanford K. I. Exercise-Induced Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. *The Journal of Experimental Biology*. 2018;221(1). doi:10.1242/jeb.161570.
4. Dewal R. S., Stanford K. I. Effects of Exercise on Brown and Beige Adipocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2019;1864(1):71–78. doi:10.1016/j.bbalip.2018.04.013.
5. Tran T. T., Kahn C. R. Transplantation of Adipose Tissue and Stem Cells: Role in Metabolism and Disease. *Nature Reviews Endocrinology*. 2010;6(4):195–213. doi:10.1038/nrendo.2010.20.
6. Frayn K. N. Fat as a Fuel: Emerging Understanding of the Adipose Tissue-Skeletal Muscle Axis. *Acta Physiologica*. 2010;199(4):509–518. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02128.x.
7. Moro C., Polak J., Hejnova J., Klimcakova E., Crampes F., Stich V., Lafontan M., Berlan

M. Atrial Natriuretic Peptide Stimulates Lipid Mobilization during Repeated Bouts of Endurance Exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2006;290(5):E864–869. doi:10.1152/ajpendo.00348.2005.

8. Schnyder S., Handschin C. Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: PGC-1 α , Myokines and Exercise. *Bone*. 2015;80:115–125. doi:10.1016/j.bone.2015.02.008.

9. Gomasasca M., Banfi G., Lombardi G. Myokines: The Endocrine Coupling of Skeletal Muscle and Bone. *Advances in Clinical Chemistry*. 2020;94:155–218. doi:10.1016/bs.acc.2019.07.010.

10. Aldiss P., Lewis J. E., Lupini I., Boocock D. J., Miles A. K., Ebling F. J. P., Budge H., Symonds M. E. Exercise Does Not Induce Browning of WAT at Thermoneutrality and Induces an Oxidative, Myogenic Signature in BAT. 2019. doi:10.1101/649061.

11. Laurens C., Bergouignan A., Moro C. Exercise-Released Myokines in the Control of Energy Metabolism. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:91. doi:10.3389/fphys.2020.00091.

REFERENCES

1. Soler-Vázquez M. C., Mera P., Zagmutt S., Serra D., Herrero L. New Approaches Targeting Brown Adipose Tissue Transplantation as a Therapy in Obesity. *Biochemical Pharmacology*. 2018;155:346–355. doi:10.1016/j.bcp.2018.07.022.
2. White J. D., Dewal R. S., Stanford K. I. The Beneficial Effects of Brown Adipose Tissue Transplantation. *Molecular Aspects of Medicine*. 2019;68:74–81. doi:10.1016/j.mam.2019.06.004.
3. Lehnig A. C., Stanford K. I. Exercise-Induced Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. *The Journal of Experimental Biology*. 2018;221(1). doi:10.1242/jeb.161570.
4. Dewal R. S., Stanford K. I. Effects of Exercise on Brown and Beige Adipocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2019;1864(1):71–78. doi:10.1016/j.bbalip.2018.04.013.
5. Tran T. T., Kahn C. R. Transplantation of Adipose Tissue and Stem Cells: Role in Metabolism and Disease. *Nature Reviews Endocrinology*. 2010;6(4):195–213. doi:10.1038/nrendo.2010.20.
6. Frayn K. N. Fat as a Fuel: Emerging Understanding of the Adipose Tissue-Skeletal Muscle Axis. *Acta Physiologica*. 2010;199(4):509–518. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02128.x.
7. Moro C., Polak J., Hejnova J., Klimcakova E., Crampes F., Stich V., Lafontan M., Berlan

Endocrinology and Metabolism. 2006;290(5):E864-869. doi:10.1152/ajpendo.00348.2005.

8. Schnyder S., Handschin C. Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: PGC-1 α , Myokines and Exercise. *Bone*. 2015;80:115–125. doi:10.1016/j.bone.2015.02.008.

9. Gomasasca M., Banfi G., Lombardi G. Myokines: The Endocrine Coupling of Skeletal Muscle and Bone. *Advances in Clinical Chemistry*. 2020;94:155–218. doi:10.1016/bs.acc.2019.07.010.

10. Aldiss P., Lewis J. E., Lupini I., Boocock D. J., Miles A. K., Ebling F. J. P., Budge H., Symonds M. E. Exercise Does Not Induce Browning of WAT at Thermoneutrality and Induces an Oxidative, Myogenic Signature in BAT. 2019. doi:10.1101/649061.

11. Laurens C., Bergouignan A., Moro C. Exercise-Released Myokines in the Control of Energy Metabolism. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:91. doi:10.3389/fphys.2020.00091.

РОЛЬ ВИТАМИНА D В РАЗВИТИИ СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ**Сафи А. Т.¹, Демьяшкин Г. А.², Оразов М. Р.¹, Калиниченко С. Ю.¹, Шаймарданова Г. М.³,****Карибеков Т. С.³**¹ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Медицинский Институт, г. Москва, Россия.²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, Россия.³АО «Национальный научный медицинский центр», г. Астана, Казахстан.**Для корреспонденции:** Демьяшкин Григорий Александрович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии им. академика А. И. Струкова Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: dr.dga@mail.ru**For correspondence:** Grigory A. Demyashkin, PhD, ass. professor of the Department of Pathology of the I.M. Sechenov First MSU (Sechenov University), e-mail: dr.dga@mail.ru**Information about authors:****Aigul S. T.**, <https://orcid.org/0000-0002-4947-1546>**Demyashkin G. A.**, <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>**Orazov M. R.**, <https://orcid.org/0000-0002-1767-5536>**Kalinchenko S. Yu.**, <https://orcid.org/0000-0002-4873-667X>**Shaimardanova G. M.**, <https://orcid.org/0000-0002-1414-8618>**Karibekov T. S.**, <https://orcid.org/0000-0002-4947-1546>**РЕЗЮМЕ**

Бесплодие – одно из наиболее распространенных заболеваний репродуктивной системы, которое несет значительную медицинскую и социальную нагрузку, затрагивая от 10 до 15% супружеских пар, одной из причин которого является синдром поликистозных яичников (СПКЯ), связаны с менструальными и эндокринными нарушениями. Изменение концентрации ключевых ферментов метаболического пути витамина D при СПКЯ может влиять на регуляцию местного тканевого гомеостаза. Механизмы ингибирования клеточного деления под действием витамина D до конца не изучены. Целью исследования является изучение экспрессии VDR и рецепторов гормонов в яичнике у женщин с СПКЯ. Материал и методы. Пациентки были разделены на основную (I) и контрольную группы (II), в которые были включены женщины (n=60) в возрасте от 18 до 44 лет (средний возраст – 29,1±3,3 года), направленных на диагностическую лапароскопию по поводу бесплодия неясного генеза. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование кист яичника проводили по стандартному протоколу с использованием антител к VDR, AR, ERβ, PR. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) определяли экспрессию VDR, 1α-OH, 24-OH в образцах кист яичников. Результаты. В образцах фрагментов кист I-й группы женщин с СПКЯ наблюдали следующую ИГХ-экспрессию изучаемых маркеров: VDR – 67,7±2,1%; AR – 51,7±1,3%; ERβ – 23,1±1,2%; PR – 89,3±2,1%. По данным ПЦР-РВ в группе I относительная экспрессия VDR составила 4,31±0,18 у.е., против 2,17±0,11 у.е. в группе контроля. Заключение. В патогенезе СПКЯ ключевую роль играет комплексное нарушение метаболизма витамина D и андроген-эстрогенового баланса, а также снижение уровня экспрессии ERβ и повышение уровня PR.

Ключевые слова: синдром поликистозных яичников, витамин D, андрогены, эстрогены, прогестерон.

**ASSOCIATION OF OVARIAN VITAMIN D AND HORMONE RECEPTORS
EXPRESSION IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME****Safi A. T.¹, Demyashkin G. A.², Orazov M. R.¹, Kalinchenko S. Yu.¹, Shaimardanova G. M.³,
Karibekov T. S.³**¹The People's Friendship University of Russia, Moscow, Russia²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia³JSC «National Scientific Medical Center», Nur-Sultan (Astana), Kazakhstan**SUMMARY**

Infertility is one of the most common diseases of the reproductive system, which carries a significant medical and social burden, affecting from 10 to 15% of married couples, and one of the causes of which is polycystic ovarian syndrome (PCOS), associated with menstrual and endocrine disorders. Changes in the concentration of key enzymes of the metabolic pathway of vitamin D in PCOS may affect the regulation of local tissue homeostasis. Mechanisms of inhibition of cell proliferation under the action of vitamin D have not been fully explored. The aim of the study is to investigate the expression of VDR and hormone receptors in the ovaries of women with PCOS. Material and methods. Patients were divided into main (I) and control groups (II), that included women (n=60) aged 18 to 44 years (mean age - 29.1±3.3 years), who at diagnostic laparoscopy due to infertility of unknown cause. Immunohistochemical (IHC)

study of ovarian cysts was performed according to a standard protocol using antibodies to VDR, AR, ER β , PR. The expression of VDR, 1 α -OH, 24-OH in samples of ovarian cysts was determined by polymerase chain reaction in real time (PCR-RT). Results. The following IHC expression of the studied markers was observed in the samples of the 1st group cysts of women with PCOS: VDR - 67.7 \pm 2.1%; AR - 51.7 \pm 1.3%; ER β - 23.1 \pm 1.2%; PR - 89.3 \pm 2.1%. According to PCR-RT data, the relative VDR expression in group I was 4,31 \pm 0,18 arb. u., vs 2,17 \pm 0,11 arb. u. in the control group. Conclusions. The key role in PCOS pathogenesis is played by complex metabolism disorder of vitamin D and androgen-estrogen balance as well as decrease of ER β and increase of PR expression level.

Key words: polycystic ovary syndrome, vitamin D, androgens, estrogens, progesterone.

Бесплодие – одно из наиболее распространенных заболеваний репродуктивной системы, которое несет значительную медицинскую и социальную нагрузку, затрагивая от 10 до 15% супружеских пар [1]. Среди причин бесплодия в том числе выделяют синдром поликистозных яичников (СПКЯ), который связан как с менструальными, так и с эндокринными нарушениями.

Биологическое действие витамина D опосредовано активацией специфического рецептора витамина D (VDR), который экспрессируется в различных органах и тканях, включая клетки костной ткани, щитовидной и паращитовидных желез, органов репродуктивной системы, в частности в яичниках. 1,25(OH) $_2$ D $_3$, связываясь с VDR, образует гетеродимерный комплекс с ретиноидным-X рецептором (RXR) и образует комплекс с VD-зависимыми участками молекулы ДНК (VDRE – Vitamin D Response Elements). Последние, в свою очередь, напрямую или опосредованно регулируют транскрипцию зависимых генов, поддерживающих клеточный гомеостаз и принимающих участие в пролиферации клеток, их дифференцировке, а также иммунном ответе [2].

Выявлено, что изменение экспрессии VDR в гормон-зависимых тканях подвержено циклическим изменениям как в норме, так и при СПКЯ. В клеточном метаболизме 25(OH)D также происходят зависимые сдвиги, которые характеризуются изменением экспрессии ключевых ферментов метаболического пути витамина D: 1- α -гидроксилаза (1 α -OH), обеспечивающая синтез активной формы витамина D (1,25(OH) $_2$ D $_3$), и 24-гидроксилаза (24-OH), обуславливающая её инактивацию [3].

Высокий уровень экспрессии ключевых ферментов метаболического пути витамина D у женщин с СПКЯ указывает на возможный паракринный и аутокринный эффект витамина D на регуляцию местного тканевого гомеостаза. Повышение уровня экспрессии 1 α -OH предполагает усиление образования активной формы витамина D – 1,25(OH) $_2$ D $_3$, который способен оказывать антипролиферативный эффект на клетки фолликулов яичника.

В связи с этим повышение уровня экспрессии 24-гидроксилазы представляется компенсаторным явлением, связанным с необходимостью

местной утилизации 1,25(OH) $_2$ D $_3$ при его повышенном синтезе [3].

Наименьший уровень экспрессии VDR, 1 α -OH и 24-OH соответствует фазе пролиферации эндометрия и коррелирует с активным ростом и созреванием фолликулов яичника, что подтверждает данные об антипролиферативном действии витамина D на гормонзависимые ткани, в частности, на фолликулы яичника [4].

Механизмы ингибирования клеточного деления под действием витамина D до конца не изучены. Среди них наибольшее значение придают активации апоптоза, торможению клеточного цикла в фазе G1 и угнетению местного ангиогенеза [5]. В связи с этим огромный интерес представляет изучение ключевых маркеров, напрямую или опосредованно участвующих в вышеописанных процессах.

Член семейства ядерных рецепторов, андрогеновый рецептор (AR, AR) является ключевым транскрипционным фактором, опосредующим андроген-индуцированные сигналы в клетке. Экспрессия AR в яичниках всех млекопитающих опосредуют эффект андрогенов в развитии фолликулов яичников. Установлено, что AR регулирует сигнальные пути гранулезных клеток, что, по-видимому, способствует росту преантральных фолликулов и предотвращает их атрезию. В недавних исследованиях подтверждено, что AR является важным регулятором клеточной активности гранулезных клеток, а высокую экспрессию AR в них связывают с развитием СПКЯ [6]. В то время как избыток андрогенов активирует развитие фолликула, этот же механизм участвует в последующем образовании дисфункциональных антральных фолликулов, что вносит вклад в развитие СПКЯ [7].

Цель исследования: изучение экспрессии VDR и рецепторов гормонов в яичнике у женщин с синдромом поликистозных яичников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 60 женщин, давших добровольное информированное согласие на включение их в изучаемую группу, забор у них биологического материала, изучение клинических, лабораторных и инструментальных показателей, статистическую обработку и публикацию полученных результатов. Исследова-

ние получило одобрение комитетом по биоэтике № 15 Медицинского института Российского университета дружбы народов, г. Москва.

Дизайн исследования включал разделение исследуемой когорты пациенток на основную группу (I) и группу контроля (II), в которые были включены женщины (n=60) в возрасте от 18 до 44 лет (средний возраст – 29,1±3,3 года), направленных на диагностическую лапароскопию по поводу бесплодия неясного генеза (МКБ-10: N97.9 – Женское бесплодие неуточненное). I-ю, основную группу (n=30) составили пациентки (средний возраст – 29,1±3,3 года) с подтвержденным диагнозом СПКЯ; II-я, контрольная группа (n=30) – пациентки без СПКЯ (средний возраст – 29,1±3,3 года) с диагностированной фолликулярной кистой яичника (ФКЯ).

Диагнозы СПКЯ и ФКЯ в группах I и II были верифицированы инструментальным (УЗИ органов малого таза), лапароскопическим и морфологическим исследованиями с клиническим подтверждением СПКЯ согласно Роттердамским критериям на основании наличия: гиперандрогении (ГА), поликистозных яичников по результатам УЗИ, олиго-ановуляции.

Объектом морфологического исследования служил операционный материал – стенки резецированных кист яичников при СПКЯ (основная группа) и ФКЯ (группа контроля).

Визуализацию материала производили на светооптическом микроскопе Leica DM 4000 B («Leica», Германия), совмещенном с видеокamerой и программным обеспечением.

Гистологическое исследование выполняли на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Германия). Первичные антитела: VDR (Anti-Vitamin D Receptor, Clone ab3508, 1:300), AR (Anti-Androgen Receptor antibody, Clone ab108341, 1:250), ERβ (Anti-Estrogen Receptor beta antibody, Clone ab288, 1:200), PR (Anti-Progesterone Receptor antibody, Clone ab16661, 1:300). В качестве вторичных применяли универсальные антитела (HiDef Detection™ HRP Polymer system, «Cell Marque», США), позволяющие выявлять мышинные и кроличьи первичные антитела, конъюгированные с ферментным комплексом на основе пероксидазы хрена. Для каждого маркера выполнялись контрольные исследования с целью исключения псевдопозитивных и псевдонегативных результатов. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера; срезы промывали под проточной водой; дегидратировали и заключали в бальзам.

Характер иммуногистохимических реакций оценивали, используя полуколичественную шкалу по 3-балльной системе с подсчетом количества иммунопозитивных клеток в 10 случайно отобранных полях зрения при увеличении ×400 (в %): «–» отсутствие, «+» слабая (5–25% клеток), «++» умеренная (25–50% клеток), «+++» выраженная (≥51% клеток).

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Материал фрагментов капсул кист яичников обеих групп помещали в стабилизирующий раствор RNeasy Lysis Buffer (QIAGEN, Нидерланды) и хранили при t=-70°C. Впоследствии образцы подвергали гомогенизации согласно стандартному протоколу. Экстракцию тотальной РНК производили с использованием набора готовых реактивов RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды). Синтез комплементарной ДНК (кДНК) с матрицы полученной РНК осуществляли с помощью набора SuperScript™ VILO™ Master Mix (Invitrogen). Выделенные кДНК подвергались ПЦР-РВ с использованием готовой смеси реагентов Absolute Blue QPCR Mix (Thermo Scientific, США) с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green I. ПЦР-РВ проводилась с использованием StepOne System (Applied Biosystems, США) и штатного программного обеспечения. Анализ экспрессии генов был проведен с использованием метода определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии генов согласно протоколу. Нормирование и внутренний контроль выполнены относительно референсного гена «домашнего хозяйства» глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH), уровень экспрессии которого по умолчанию считается постоянным. Статистический контроль проводили относительно группы контроля с ФКЯ. Подбор праймеров был осуществлен на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием программы Primer-BLAST: VDR и 1α-OH, 24-OH — 1-альфа-гидроксилаза и 24-гидроксилаза.

Статистический анализ. Полученные в результате подсчета данные статистически обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). При этом определяли вариационные ряды, выборочное среднее, стандартное отклонение выборочного среднего (SD) и вероятность различия. Затем оценивали соответствие/несоответствие полученных результатов нормальному распределению с применением критерия Колмагорова–Смирнова. При статистической обработке для оценки достоверности различий средних значений между

группами использовались следующие непараметрические критерии: U-критерий Манна–Уитни, H-критерий Краскала–Уоллеса. При отсутствии нормального распределения данных использовали непараметрический критерий F. Wilcoxon (Statistical Methods for Research Workers) с уровнем значимости $p < 0,05$. Количественные данные, полученные в ходе ПЦР-РВ, были проанализированы с использованием рангового дисперсионного анализа ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Микроскопическое описание яичников с СПКЯ: множество кистозно измененных фолликулов, покрытых плотной фиброзной капсулой; лютеинизация внутренней теки (гипертекоз), небольшое количество желтых и белых тел и имитирующие их ановуляторные атретические фолликулы.

В образцах фрагментов кист I-й группы женщин с СПКЯ наблюдали выраженную (3 балла) иммунопозитивную реакцию на антитела к рецептору витамина D (VDR) в нуклеоплазме текацитов стенки кисты и частично в строме яичника. Согласно результатам морфометрического анализа с количественной оценкой уровня экспрессии VDR в образцах кист яичника в основной группе женщин плотность ИГХ маркирования VDR составила $67,7 \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$), что в 2,1 раза превышает значения иммунологического маркирования VDR в контрольной группе – $35,3 \pm 1,9\%$ ($p < 0,05$), что, предположительно, указывает на компенсаторное повышение экспрессии рецептора 25(OH)D в текацитах яичников у пациенток группы I с СПКЯ (табл. 1; рис. 1).

Выраженную (3 балла) и умеренную (2 балла) ИГХ-экспрессию AR обнаружили в текацитах препаратов I-й группы и в меньшей степени в клетках стромы яичника. В контрольной группе наблюдали умеренное (2 балла) окрашивание на AR в текацитах, гранулезных клетках и также в клетках стромального компартмента (рис. 1). Плотность относительного ИГХ марки-

рования AR в группе I составила $51,7 \pm 1,3\%$ vs. $32,3 \pm 1,1\%$, что превосходит плотность экспрессии AR в основной группе в 1,6 раза по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$) (табл. 1; рис. 1).

ИГХ экспрессия в полученных препаратах фрагментов капсул яичников женщин I-й группы на антитела к рецепторам эстрогенов (ER β) во обеих изучаемых группах была умеренной (2 балла). В тоже время экспрессия PR была выраженной (3 балла) во всех компартментах полученных препаратов обеих изучаемых групп (рис. 1). При количественном анализе показатели плотности ИГХ маркирования ER β были незначительные $23,1 \pm 1,2\%$ vs. $37,4 \pm 1,8\%$ в препаратах кист группы I у женщин с СПКЯ и в образцах фрагментов капсул фолликулярных кист яичников группы контроля, соответственно, что ниже значений группы с ФКЯ в 1,7 раза ($p < 0,05$). Напротив, обнаружили выраженную плотность экспрессии PR в строме и текацитах микропрепаратов основной группы пациенток с СПКЯ – $89,3 \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$), и сравнимую ИГХ экспрессию в образцах контрольной группы – $67,3 \pm 1,6\%$ с незначительным различием в 1,3 раза по степени плотности ИГХ маркирования PR ($p < 0,05$) (табл. 1; рис. 1).

По результатам ПЦР-РВ выявлена статистически достоверная зависимость между метаболизмом 25(OH)D в клетках кист яичника при СПКЯ. В группе I у женщин с СПКЯ экспрессия генов, кодирующих основные ферменты метаболизма витамина D (1 α -ОН, 24-ОН), в значительной степени, практически в 2,3-3,0 раза, превышают данный показатель в группы контроля. В группе I и II значения 1 α -ОН составили $2,84 \pm 0,12$ у.е. vs. $1,25 \pm 0,14$ у.е., соответственно, что выше значений контрольной группы в 2,3 раза ($p < 0,05$). Для 24-ОН: $3,13 \pm 0,15$ у.е. для основной группы пациенток с СПКЯ, что в 2,9 раза выше значений контрольной группы с ФКЯ – $1,05 \pm 0,09$ у.е. ($p < 0,05$) (табл. 2).

Оценка экспрессии VDR подтверждает данные, полученные при ИГХ исследовании. В

Таблица 1

Результаты иммуногистохимических реакций в яичнике при СПКЯ и фолликулярной кисте, M \pm SD, % ($p < 0,05$)

Маркеры	Синдром поликистозных яичников (I группа)	Контрольная группа (II группа)	p
VDR	67.7 \pm 2.1	35.3 \pm 1.9	0.01568
AR	51.7 \pm 1.3	32.3 \pm 1.1	0.02316
Er β	23.1 \pm 1.2	37.4 \pm 1.8	0.01125
PR	89.3 \pm 2.1	67.3 \pm 1.6	0.03741

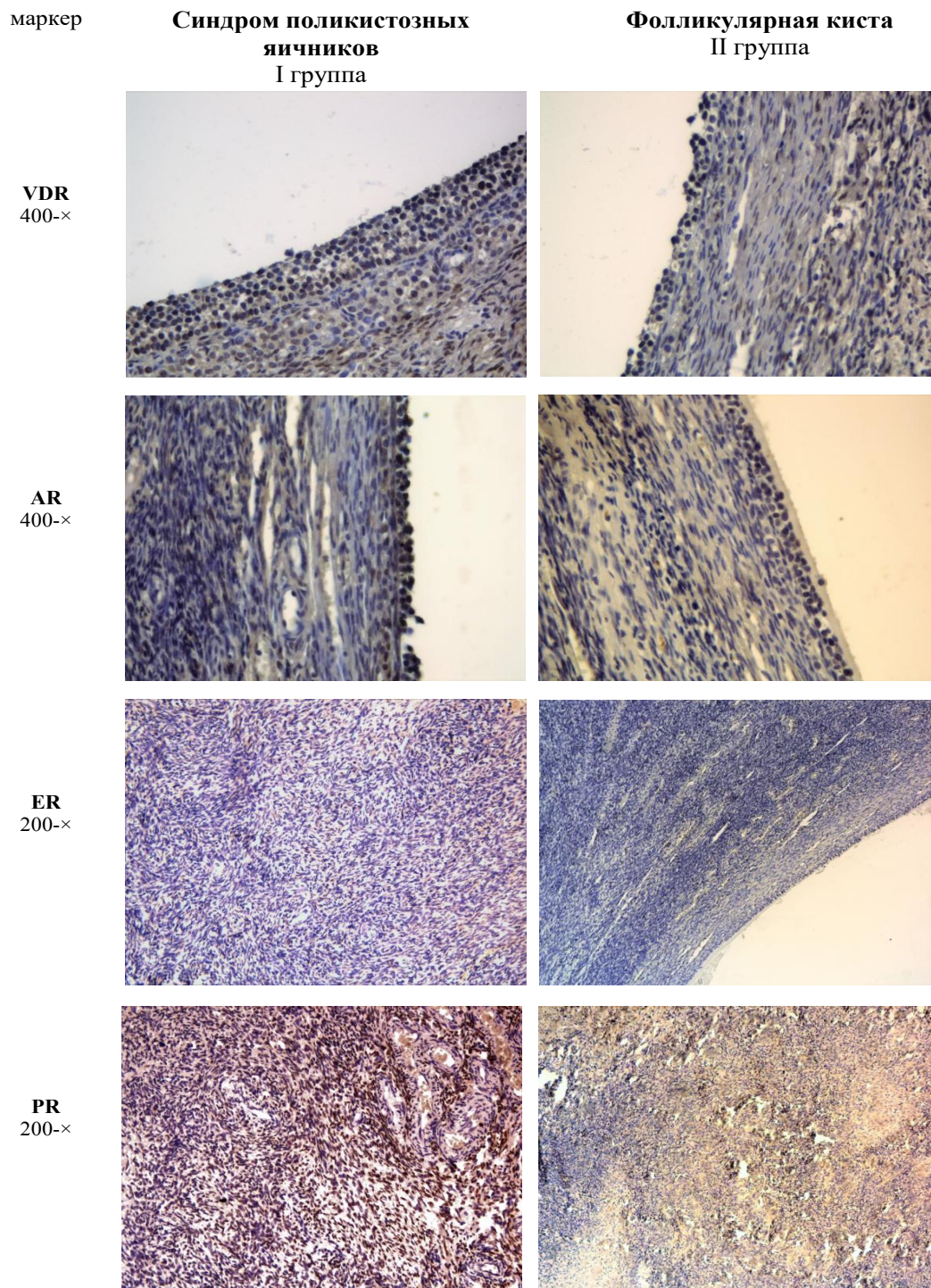


Рис. 1. Фрагменты кист яичника (иммуногистохимический метод, докрасивание гематоксилином, N-× увелич.): слева – I группа (СПКЯ), справа – II группа (ФКЯ)

Экспрессия генов в ткани яичника при СПКЯ и фолликулярной кисте, M±SD, у.е. (p<0,05) Таблица 2

Гены	Синдром поликистозных яичников (I группа)	Контрольная группа (II группа)
VDR	4.31±0.18*	2.17±0.11
1α-OH	2.84±0.12*	1.24±0.14
24-OH	3.13±0.15*	1.05±0.09

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с группой II (p<0,05), у.е. – условные единицы

группе I относительная экспрессия VDR составила $4,31 \pm 0,18$ у.е., в группе контроля – $2,17 \pm 0,11$ у.е., что в 2 раза ниже значений экспрессии VDR основной группой женщин с СПКЯ (табл. 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об увеличении метаболизма 25(OH) D и косвенно подтверждают его дефицит путем изменения субстрат-ферментного соотношения. Аналогичная зависимость наблюдается в экспрессии VDR, что подтверждает результаты проведенного ИГХ исследования на маркирование VDR в капсулах кист яичника у пациенток изучаемой группы, что лежит в основе одного из возможных механизмов нарушения созревания фолликулов при СПКЯ на фоне повышения экспрессии андрогеновых рецепторов в гранулезных и текальных клетках яичника.

ОБСУЖДЕНИЕ

СПКЯ является одним из распространенных эндокринных заболеваний, включающее репродуктивные и метаболические нарушения. Несмотря на определенный прогресс в диагностике и клиническом исследовании СПКЯ, существуют лишь несколько конкретных данных об этиопатогенетических механизмах его развития [8]. Несмотря на то, что отсутствуют сообщения об определенном влиянии генетических вариаций и восприимчивости к СПКЯ, но были получены данные о VDR- и D-ассоциированных вариантах СПКЯ [9]. Напротив, Багери и др. считают, что статистически значимой связи между экспрессией VDR и СПКЯ не существует [10].

Настоящее исследование было проведено для изучения относительной экспрессии рецепторов VDR и гормонов у женщин, страдающих СПКЯ. Высокая экспрессия пути ключевых ферментов витамина D у женщин с СПКЯ указывает на возможное паракринное и аутокринное влияние витамина D на регуляцию местного гомеостаза яичника. Учитывая гормонозависимый характер созревания фолликула яичника, изменения в экспрессии VDR могут напрямую влиять на этот процесс, воздействуя на клетку и препятствуя ее нормальной пролиферации [11; 12]. Увеличение экспрессии 1α -ОН подразумевает интенсивное образование активного витамина D, который может оказывать антипролиферативное действие на клетки фолликулов яичников. Следовательно, повышение экспрессии 24-OH считается компенсаторным феноменом, связанным с необходимостью локальной утилизации $1,25$ (OH) $_2$ D $_3$ при его повышенном синтезе.

В настоящее время механизм ингибирования витамином D неясен. Однако наибольшее значение среди них имеют такие факторы, как усиление апоптоза, ингибирование клеточного

цикла на стадии G1 и подавление местного ангиогенеза [6; 13; 14].

ИГХ-экспрессия AR в группе I была выше по сравнению с контролем, что означает, что повышенная экспрессия рецепторов андрогенов может быть причиной нарушения созревания фолликулов при СПКЯ [15; 16].

В то время как избыток андрогенов активирует развитие фолликулов, тот же механизм запускает в последующем формирование дисфункциональных антральных фолликулов, что способствует развитию СПКЯ.

Результаты исследования ясно показывают, как изменения в гормональной рецепции ткани яичников могут повлиять на патоморфологические изменения и появлению клинических симптомов СПКЯ, по сравнению с фолликулярными кистами. Вариации в экспрессии VDR могут привести к нарушению восприимчивости, в то время как сывороточные уровни витамина D и гормонов могут оставаться в пределах нормы. Влияние витамина D на клинические исходы СПКЯ и активность рецепторов гормонов ткани яичников у женщин с дефицитом витамина D или без него может пролить свет на взаимосвязь между витамин-D-зависимыми метаболическими и морфологическими изменениями у женщин с СПКЯ.

Основным ограничением этого исследования был небольшой размер выборки и ее ретроспективный характер. Хотя в качестве пилотного исследования он выявляет несколько интересных фактов, которые необходимо подтвердить дальнейшими более детальными исследованиями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного морфологического, ИГХ исследований и ПЦР-РВ можно сделать вывод, что в патогенезе СПКЯ и развитии ассоциированного бесплодия играет роль:

- комплексное нарушение метаболизма витамина D с развитием компенсаторной гиперэкспрессии VDR в гормон-зависимых клетках фолликулов яичника;
- нарушение андроген-эстрогенового баланса с нарушением метаболических путей андрогенов в клетках в гормон-зависимых клетках фолликулов яичника;
- снижение уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов и повышение уровня рецепторов к прогестерону коррелирует с лютеинизацией клеток теки и гранулезных клеток в фолликулах яичников, что в совокупности обуславливает усиленный рост фолликула с нарушением его созревания и отсутствием физиологической атрезии, лежащей в основе формирования ановуляторного варианта СПКЯ.

ЛИТЕРАТУРА /REFERENCE

1. Milewicz A., Kudla M., Spaczynski R. Z. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the Polish Society of Endocrinology, the Polish Society of Gynaecologists and Obstetricians, and the Polish Society of Gynaecological Endocrinology. *Endokrynologia Polska*. 2018;69(4):328-344. doi: 10.5603/EP.2018.0046
2. Lin M. W., Wu M. H. The role of vitamin D in polycystic ovary syndrome. *Indian J Med Res*. 2015;142(3):238–240.
3. Naderpoor N., Shorakae S., Abell S. K., Mousa A. Bioavailable and free 25-hydroxyvitamin D and vitamin D binding protein in polycystic ovary syndrome. Relationships with obesity and insulin resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;177:209-215. doi: 10.1016/j.jsmb.2017.07.012
4. Chen X., Lu T., Wang X. Metabolic alterations associated with polycystic ovary syndrome: A UPLC Q-Exactive based metabolomic study. *Clin Chim Acta*. 2020;502:280-286. doi: 10.1016/j.cca.2019.11.016.
5. Krul-Poel Y. H.M., Koenders P. P., Steegers-Theunissen RP. Vitamin D and metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome (PCOS): A cross-sectional study. *PLoS One*. 2018;13(12):e0204748. doi:10.1371/journal.pone.0204748.
6. Walters K. A. Role of androgens in normal and pathological ovarian function. *Reproduction*. 2015;149(4):R193–R218.
7. Yang M., Du J., Lu D. Increased expression of kindlin 2 in luteinized granulosa cells correlates with androgen receptor level in patients with polycystic ovary syndrome having hyperandrogenemia. *Reprod Sci*. 2014;21(6):696–703. doi:10.1177/1933719113512536.
8. Calogero AE, Calabrò V, Catanuso M, Condorelli RA, La Vignera S. Understanding polycystic ovarian syndrome pathogenesis: an updated of its genetic aspects. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(8):630-644. doi:10.3275/7746
9. Al Thomali A, Daghestani MH, Daghestani MH, Kaya N, Warsy A. Polymorphic Variations in VDR Gene in Saudi Women with and Without Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Significant Influence of Seven Polymorphic Sites on Anthropometric and Hormonal Parameters. *J Med Biochem*. 2018;37(4):415-425. Published 2018 Dec 1. doi:10.2478/jomb-2018-0007
10. Bagheri M, Rad IA, Jazani NH, Nanbakhsh F. Lack of Association of Vitamin D Receptor FokI (rs10735810) (C/T) and BsmI (rs1544410) (A/G) Genetic Variations with Polycystic Ovary Syndrome Risk: a Case-control Study from Iranian Azeri Turkish Women. *Maedica (Buchar)* 2012;7(4):303–8.
11. Sam Samuel, Michael D Sitrin. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation, *Nutrition Reviews*. 2008;66(10Suppl.2):116–124. doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00094.x.
12. Walters K. A., Gilchrist R. B., Ledger W. L. New Perspectives on the Pathogenesis of PCOS: Neuroendocrine Origins. 2018;29(12):841-852. doi:10.1016/j.tem.2018.08.005.
13. Wikiera B., Zubkiewicz-Kucharska A., Nocoń-Bohusz J. Metabolic disorders in polycystic ovary syndrome. *Pediatric Endocrinology, Diabetes, and Metabolism* 2017;23(4):204-208. doi:10.18544/PEDM-23.04.0094.
14. Song D. K., Lee H. Vitamin D receptor and binding protein polymorphisms in women with polycystic ovary syndrome: a case control study. *BMC Endocr Disord*. 2019;19(1):145. doi: 10.1186/s12902-019-0477-x
15. Robert L. Rosenfield, David A. Ehrmann. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocrine Reviews*. 2016;37(5):467–520. doi: 10.1210/er.2015-1104
16. Aimee S. L. Caldwell , Edwards M. C., Desai R. Neuroendocrine androgen action is a key extraovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(16): E3334-E3343. doi: 10.1073/pnas.1616467114.

УДК: 615.847:612.111].015.4

DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-4-43-49

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН

Селин А. Д.¹, Терехина Н. А.¹, Терехин Г. А.²

¹Кафедра биохимии ФГБОУ ВО ПГМУ имени академика Е. А. Вагнера Минздрава России, 614070, ул. Крупской, 44, Пермь, Россия,

²Кафедра экстремальной медицины и товароведения ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава РФ, 614077, ул. бульвар Гагарина 81, Пермь, Россия

Для корреспонденции: Терехина Наталья Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биохимии ФГБОУ ВО ПГМУ имени академика Е. А. Вагнера Минздрава России, e-mail: terekhina@list.ru

For correspondence: N. A. Terekhina, MD, Professor, Head of the Biochemistry department Perm State Medical University named after academician E. A. Wagner, e-mail: terekhina@list.ru

Information about authors:

Selin A. D., <https://orcid.org/0000-0001-7514-3785>

Terekhina N. A., <https://orcid.org/0000-0002-0168-3785>

Terekhin G. A., <https://orcid.org/0000-0001-5633-0242>

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – в экспериментальных условиях изучить влияние электромагнитного излучения дециметрового диапазона на проницаемость эритроцитарных мембран. Объектом исследования служила кровь 80 белых крыс, 60 из них в течение трёх месяцев находились под действием электромагнитного излучения дециметрового диапазона. 20 животных контрольной группы не подвергались воздействию электромагнитного поля. Интенсивность процессов свободнорадикального окисления оценивали с помощью хемилюминесцентного анализа эритроцитов и плазмы крови. Проницаемость эритроцитарных мембран и содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах крови определяли спектрофотометрически. Длительное нахождение животных в условиях действия электромагнитного поля приводит к выраженным изменениям показателей хемилюминесценции в эритроцитах: снижение максимальной интенсивности хемилюминесценции (I_{max}), светосуммы (S) и светосуммы после максимального значения хемилюминесценции ($Simax$). Несмотря на увеличение содержания глутатиона и показателя хемилюминесцентного анализа $tg2$, отражающего антиоксидантный потенциал, происходит повышение проницаемости эритроцитарных мембран под действием электромагнитного излучения.

Ключевые слова: проницаемость эритроцитарной мембраны, хемилюминесцентный анализ, глутатион, электромагнитное излучение.

INFLUENCE OF ELECTROMAGNETIC RADIATION ON THE PERMEABILITY OF ERYTHROCYTE MEMBRANES

Selin A. D.¹, Terekhina N. A.¹, Terekhin G. A.²

¹Perm State Medical University named after academician E. A. Wagner, Perm, Russia

²Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia

SUMMARY

The purpose of the survey is to experimentally study the influence of electromagnetic radiation from the decimeter range on the permeability of erythrocyte membranes. The object of the study was the blood of 80 white rats, 60 of them for three months were under the influence of electromagnetic radiation of the decimeter range. 20 animals of the control group were not exposed to electromagnetic fields. The intensity of free radical oxidation was evaluated using chemiluminescent analysis of red blood cells and blood plasma. The permeability of erythrocyte membranes and the content of reduced glutathione in blood erythrocytes were determined spectrophotometrically. A prolonged stay of animals under the influence of an electromagnetic field leads to pronounced changes in chemiluminescence indices in erythrocytes: a decrease in the maximum intensity of chemiluminescence (I_{max}), light sum (S), and light sum after the maximum value of chemiluminescence ($Simax$). Despite the increase in the content of glutathione and the chemiluminescent analysis index $tg2$ reflecting the antioxidant potential, there is an increase in the permeability of erythrocyte membranes under the influence of electromagnetic radiation.

Key words: erythrocyte membrane permeability, chemiluminescent analysis, glutathione, electromagnetic radiation.

Развитие научно-технического прогресса привело к появлению устройств, являющихся источниками электромагнитного излучения,

которые оказывают негативное влияние на деятельность всех органов и систем живого организма [1; 2]. Наиболее весомый вклад в электро-

магнитную нагрузку, оказываемую на человека, вносят мобильные устройства – подвижные станции сотовой связи (мобильные телефоны). Сотовый телефон представляет собой малогабаритный приёмопередатчик, который является источником электромагнитного излучения (ЭМИ) дециметрового диапазона. Особенностью мобильных устройств является максимальная приближенность к человеку, бесконтрольное использование. Особую опасность ЭМИ представляет для беременных женщин и детей [2]. Есть данные, что ЭМИ способствует развитию окислительного стресса [3; 4]. Свободные радикалы могут быть чрезвычайно токсичными для клеточного гомеостаза [5]. Антиоксидантная система является основным регулирующим звеном в нейтрализации токсичных компонентов, которые образуются в свободнорадикальных реакциях [6]. Дисбаланс или недостаточная активность компонентов антиоксидантной системы может являться предиктором развития ряда патологических процессов. Оценить интенсивность свободнорадикального окисления (СРО) позволяет метод хемилюминесцентного анализа. Интенсивность хемилюминесценции коррелирует с выраженностью патологического процесса [7; 8; 9].

Цель исследования – в экспериментальных условиях изучить влияние электромагнитного излучения дециметрового диапазона на проницаемость эритроцитарных мембран.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Лабораторные исследования биохимических показателей проводились на базе кафедры биохимии Пермского государственного медицинского университета имени академика Е. А. Вагнера, экспериментальная часть работы была выполнена на базе токсикологической лаборатории кафедры экстремальной медицины Пермской государственной фармацевтической академии. Мембрану эритроцита удобно использовать для изучения проницаемости биологических мембран, так как её состояние отражает процессы в мембранах клеток различных тканей [9; 10]. Исследование было выполнено на 80 белых нелинейных крысах обоих полов, массой 150-220 г. На момент начала эксперимента возраст всех животных составлял 1 месяц. Световой режим для опытной и контрольной групп животных сохранялся стандартным: 9 часов освещения и 15 часов затемнения. Крысы содержались на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде и пище. 20 животных контрольной группы находились в помещении вивария при фоновых показаниях плотности потока энергии электромагнитного излучения $0,1 \text{ мкВт/см}^2$. 60 крыс опытной группы в течение трёх месяцев находились в другом помещении

под воздействием электромагнитного поля, которое было создано с помощью шести мобильных телефонов распространенной марки «Nokia», работающих в диапазоне частот передачи от 900 до 1800 МГц. Оценка фонового уровня плотности потока электромагнитной энергии проводилась прибором (ПЗ-33М) согласно СанПиН 2.2.4.3359-16 «Санитарно-эпидемиологические требования к физическим факторам на рабочих местах» и составляла не более $0,1 \text{ мкВт/см}^2$. Для достижения равномерного распределения электромагнитной нагрузки в течение длительного периода была использована программа «Auto Redial». С помощью данной программы одновременно производились звонки на шесть мобильных устройств, которые создавали следующие условия облучения животных: несущая частота 1745 МГц, 170 мин/день, фракциями по 30 секунд в режиме дозвона с интервалом в 4 минуты. Все животные опытной и контрольной групп были размещены по 10 особей в клетках размерами 598x380x200 (мм), изготовленных из радиопрозрачного материала – плексигласа. Мобильные устройства располагались на специальных подставках по ширине клетки, с каждой стороны по три штуки на расстоянии 5 см от клетки. В зависимости от удаленности антенны мобильных устройств плотность потока электромагнитной энергии в клетке составляла в среднем $67,0 \pm 5,0 \text{ мкВт/см}^2$ с экспозицией 170 минут, что соответствует предельно допустимому уровню энергетических экспозиций $200 (\text{мкВт/см}^2) \cdot \text{ч}$ для данного диапазона частот. Хемилюминесцентный анализ крови проводили с помощью биохемилюминометра БХЛ-07 по методу [11]. Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах определяли по методу [12]. Проницаемость эритроцитарных мембран оценивали по методу [13]. Анализ полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики при помощи пакета программ Statistica 10.0. После проверки нормальности распределения вариационных рядов в изучаемых группах определяли средние величины (M), ошибку средних величин (m). Использовали t -критерий Стьюдента для оценки достоверности изменений. При уровне значимости $p < 0,05$ различия считали достоверными. Степень тесноты корреляционной связи между параметрами хемилюминесцентного анализа определяли при расчете линейного коэффициента корреляции. Определение прочности связи между исследуемыми параметрами оценивали по шкале Чеддока.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выявлены существенные изменения показателей хемилюминесцентного анализа в эритроцитах периферической крови крыс, нахо-

дившихся в течение трех месяцев в условиях действия электромагнитного поля. Наряду с достоверным снижением максимальной интенсивности хемилюминесценции (I_{max}), светосуммы (S) и светосуммы после максимального значе-

ния хемилюминесценции ($Simax$), установлено статистически значимое повышение показателя $tg2$, отражающего антиоксидантный потенциал крови (рис. 1). Не обнаружено существенных изменений в плазме крови крыс опытной группы.

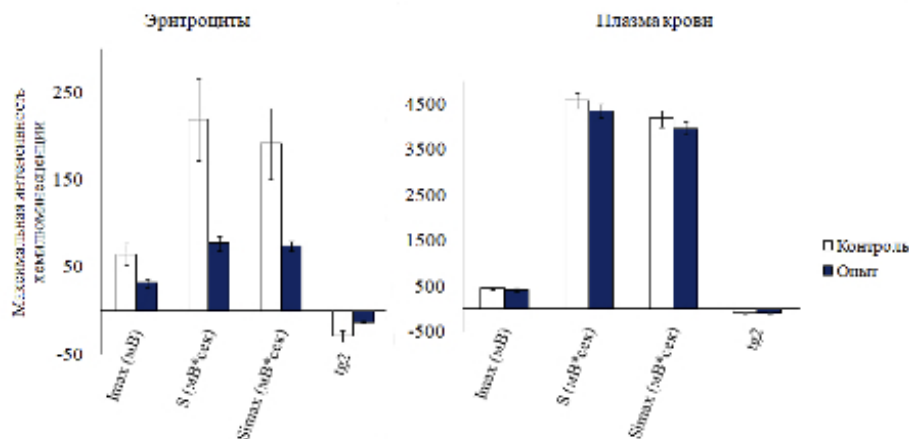


Рис. 1. Хемилюминесцентный анализ эритроцитов и плазмы крови крыс ($M \pm m$) после длительного нахождения в условиях действия электромагнитного поля.

Анализ изменения равновесия в системе прооксиданты-антиоксиданты в эритроцитарных мембранах при ЭМИ проводился по величине коэффициентов K_1 , K_2 , K_3 , K_4 , представляющих соотношения параметров I_{max} , S , $Simax$, $tg2$ опытной группы крыс к значениям контрольной группы животных. В ходе экс-

перимента было установлено, что длительное влияние электромагнитного излучения дециметрового диапазона $67,0 \pm 5,0$ мкВт/см² с экспозицией 170 минут приводит к изменению равновесия в системе прооксиданты-антиоксиданты, о чём свидетельствуют изменения значений коэффициентов (табл. 1).

Таблица 1

Показатели изменения равновесия в системе прооксиданты-антиоксиданты в эритроцитарных мембранах крови крыс при электромагнитном излучении

Эритроциты				
Группы	$K_1 = \frac{[I_{max}]_o}{[I_{max}]_к}$	$K_2 = \frac{[S]_o}{[S]_к}$	$K_3 = \frac{[Simax]_o}{[Simax]_к}$	$K_4 = \frac{[tg2]_o}{[tg2]_к}$
Контроль	1	1	1	1
Опыт	↓0,49*	↓0,35*	↓0,39*	↑0,45*

Примечания: - при $p < 0,05$ достоверность различий по сравнению с контролем; - K_1 , K_2 , K_3 ↓ - изменение равновесия в системе прооксиданты по сравнению с контролем; - K_4 ↑ - изменение равновесия антиоксидантного потенциала по сравнению с контролем

Наблюдается снижение интенсивности процессов СРО на фоне роста показателя $tg2$. При изучении интенсивности процессов СРО и антиоксидантного потенциала в мембранах эритроцитов в норме и при действии ЭМИ наиболее выраженные изменения были зафиксированы в изменении тесноты связи между показателями I_{max} и $tg2$. При помощи корреляционного анализа данных параметров была определена степень тесноты связи и коэффициент детерминации (табл. 2).

При определении прочности связи между показателями СРО и антиоксидантного потенциала в группе контроля была установлена очень тесная связь, в опытной группе – высокая. При оценке значимости уравнения регрессии производили расчет коэффициента детерминации R^2 . В группе контроля точность подбора уравнения регрессии – высокая ($R^2 = 0,87$), которая обуславливает, что в 87% случаев изменения x приводят к изменению y . В опытной группе коэффициент детерминации $R^2 = 0,54$, что говорит о прием-

Таблица 2

Корреляционный анализ показателей хемилюминесценции $I_{\text{max}}(y)$ и $\text{tg}2(x)$ в эритроцитарных мембранах крови крыс при электромагнитном излучении

Группы	a_0	a_1	r_{xy}	Теснота связи	R^2
Контроль	-1,80	14,35	-0,93	Очень тесная	0,87
Опыт	-1,91	1,80	-0,73	Высокая	0,54

лемости исследуемой модели и достоверности корреляционных связей между исследуемыми показателями.

При длительном влиянии электромагнитного излучения повышается проницаемость мембран эритроцитов, уже при концентрации мочевины 0,150 ммоль/л (рис. 2).

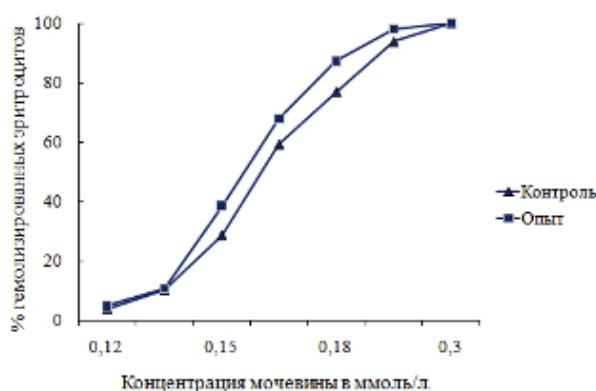


Рис. 2. Проницаемость мембран эритроцитов периферической крови крыс ($M \pm m$) после длительного нахождения в условиях действия электромагнитного поля.

В ходе эксперимента при действии ЭМИ было зафиксировано статистически значимое увеличение основного неферментативного антиоксиданта эритроцитов – восстановленного глутатиона почти на 20% ($2,83 \pm 0,07$, $p < 0,05$), по сравнению с группой контроля ($2,28 \pm 0,10$, $p < 0,05$), что обусловлено компенсаторной активацией антиоксидантной защиты.

ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте на крысах установлено, что длительное в течение трёх месяцев действие электромагнитного поля дециметрового диапазона приводит к изменениям показателей хемилюминесцентного анализа эритроцитов периферической крови. Увеличение показателя $\text{tg}2$ в эритроцитах крови может быть обусловлено увеличением восстановленного глутатиона, что связано с компенсаторной активацией антиоксидантной защиты. Система глутатиона принимает непосредственное участие в защите клетки от повреждающего действия свободных

радикалов. Показатели системы глутатиона в эритроцитах используются для установления степени тяжести интоксикации, оценки эффективности лечения и прогноза [14;15;16]. Чувствительными к действию ксенобиотиков являются показатели антиоксидантной защиты, СРО, энергетического обмена, микросомального окисления [16;17;18;19]. Интенсификация СРО, окислительная модификация белковых молекул, снижение активности антиоксидантной защиты клетки приводит к изменениям структуры и функции клеточных мембран. В условиях длительного влияния электромагнитного поля дециметрового диапазона установлено повышение проницаемости эритроцитарных мембран, что сопровождается снижением осмотической стойкости эритроцитов. Известно, что проницаемость эритроцитарных мембран в зависимости от действия повреждающего фактора может изменяться по-разному [18]. Повышение проницаемости мембран эритроцитов наблюдается при остром отравлении карбофосом [9], хроническом панкреатите [18], анемии [20], инфекционных заболеваниях [21]. Напротив, снижение проницаемости мембран эритроцитов выявлено при деструктивном холецистите [7], при острой алкогольной интоксикации, механической желтухе [18].

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют считать, что в условиях длительного влияния ЭМИ дециметрового диапазона происходит компенсаторная активация антиоксидантной защиты, которая сопровождается увеличением показателя $\text{tg}2$ и восстановленного глутатиона. Активация антиоксидантной системы не может в полном объеме компенсировать неблагоприятное влияние ЭМИ на мембраны эритроцитов, об этом свидетельствует увеличение проницаемости эритроцитарных мембран.

ВЫВОДЫ

1. Длительное нахождение животных в течение трех месяцев в условиях действия электромагнитного поля дециметрового диапазона приводит к изменению равновесия в системе прооксиданты - антиоксиданты в эритроцитах.

2. Глутатион является мишенью для действия электромагнитного излучения дециметрового диапазона.
3. Несмотря на увеличение содержания глутатиона и показателя хемилюминесцентного анализа tg2, отражающего антиоксидантный потенциал, происходит повышение проницаемости эритроцитарных мембран.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев О. А., Степанов В. С. Антропогенное электромагнитное загрязнение окружающей среды как новый глобальный экологический фактор эволюционного значения. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2008;23(3):22-23.
2. Григорьев Ю. Г., Самойлова А. С., Бушманов А. Ю., Хорсева Н. И. Мобильная связь и здоровье детей: проблема третьего тысячелетия. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2017;62(2):39-46. doi: 10.12737/article_58f0b9573b6b59.54629416.
3. Calcabrini C., Mancini U., De Bellis R., Diaz A.Q., Martinelli M., Cucchiari L. Effect of extremely low-frequency electromagnetic fields on antioxidant activity in the human keratinocyte cell line NCTC 2544. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2017; 64(3):415-422. doi:10.1002/bab.1495.
4. Kivrak E., Yurt K., Kaplan A., Alkan I., Altun G. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2017; 5(4):167-176. doi:10.1016/j.jmau.2017.07.003.
5. Gherardini L., Gastone C., Tognarelli S., Cinti C. Searching for the Perfect Wave: The Effect of Radiofrequency Electromagnetic Fields on Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(4):5366 - 5387. doi:10.3390/ijms15045366.
6. Goraca A., Ciejka E., Piechota A. Effects of extremely low frequency magnetic field on the parameters of oxidative stress in heart. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010; 61(3):333-338.
7. Терехина Н. А., Заривчацкий М. Ф., Владимирова А. А., Хлебников В. В. Показатели антиоксидантной защиты при остром и хроническом холецистите. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008;(4):41-43.
8. Реук С. Э., Терехина Н. А. Хемилюминесцентный анализ биологических жидкостей при герпетической инфекции у детей. *Уральский медицинский журнал*. 2017;(8):127-131.
9. Терехина Н. А., Зорин М. Г., Терехин Г. А. Влияние сапропелевых грязей на показатели окислительного стресса и антиоксидантной защиты при остром отравлении карбофосом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2007;(1):6-8.
10. Савлуков А. И., Самсонов В. М., Камиллов Р. Ф. Состояние устойчивости эритроцитов как звено адаптации организма. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2011;6(4):13-17.
11. Кузьмина Е. И., Нелюбин А. С., Щенникова М. К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах. *Биохимия и биофизика микроорганизмов: межвузовский сборник*. Горький; 1983:179-183.
12. Beutler E. *Red cell metabolism a manual of biochemical methods*. Grune & Stratton, Orlando; 1990:131-134.
13. Колмаков В. Н., Радченко В. Г. Значение определения проницаемости эритроцитарных мембран (ПЭМ) в диагностике хронических заболеваний печени. *Терапевтический архив*. 1982;54(2):59-62.
14. Терехина Н. А., Жидко Е. В., Терехин Г. А., Орбиданс А. Г. Влияние сорбентов на показатели антиоксидантной защиты и свободнорадикального окисления при острой алкогольной интоксикации. *Сибирское медицинское обозрение*. 2017;(6):53-59.
15. Меринова Н. И., Козлова Н. М., Колесниченко Л. С. Малоновый диальдегид и система глутатиона в крови у больных с хроническим панкреатитом в зависимости от длительности заболевания. *Сибирский медицинский журнал*. 2013;(4):67-69.
16. Глушков С. И., Куценко С. А., Ливанов Г. А. Состояние глутатионзависимой антирадикальной системы и процессов перекисного окисления липидов в различных тканях лабораторных животных при острых отравлениях тиопенталом натрия. *Токсикологический вестник*. 2002;(1):11-17.
17. Зитта Д. В., Терехина Н. А., Субботин В. М. Клинико-биохимическая оценка эффективности программы оптимизации периоперационного ведения больных в плановой колоректальной хирургии. *Колопроктология*. 2015; 52(2):18-24.
18. Терехина Н.А., Терехин Г.А., Жидко Е.В., Горячева О.Г. Окислительная модификация белков, проницаемость эритроцитарных мембран и активность гамма-глутамилтранспептидазы при различных интоксикациях. *Медицинская наука и образование Урала*. 2019; (4):78-82.
19. Терехина Н. А., Терехин Г. А., Орбиданс А. Г., Жидко Е. В. Белки антиоксиданты – ми-

шени для действия ксенобиотиков. *Acta Naturae*. 2016; (2):77-78.

20. Ташенова Г. К., Оксикбаев Б. К., Кабдульдин Т. А. Структурно-функциональное состояние клеточных мембран у беременных и лактирующих крыс при экспериментальной анемии. Сборник материалов 2-й Всероссийской научно-практической конференции «Физиология адаптации». 2010. Волгоград: Волгоградское научное изд-во; 2010:23-25.

21. Кулапина О. И., Киричук В. Ф., Утц И. А. Проницаемость мембран эритроцитов у больных с инфекционной патологией. Серия. Критические технологии. Мембраны. 2005;25(1):3-11.

REFERENCES

1. Grigoriev O. A., Stepanov V. S. Anthropogenic electromagnetic pollution as a new global environmental factor of evolutionary importance. *Vestnik Rossijskoj voenno-medicinskoj akademii*. 2008;23(3):22-23. (In Russ)

2. Grigoriev Y. G., Samoilov A. S., Bushmanov A. Y., Khorseva N. I. Cellular Connection and the Health of Children – Problem of the Third Millennium. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2017;62(2):39-46. doi: 10.12737/article_58f0b9573b6b59.54629416. (In Russ)

3. Calcabrini C., Mancini U., De Bellis R., Diaz A.Q., Martinelli M., Cucchiari L. Effect of extremely low-frequency electromagnetic fields on antioxidant activity in the human keratinocyte cell line NCTC 2544. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2017; 64(3):415-422. doi: 10.1002/bab.1495.

4. Kivrak E., Yurt K., Kaplan A., Alkan I., Altun G. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2017; 5(4):167-176. doi: 10.1016/j.jmau.2017.07.003.

5. Gherardini L., Gastone C., Tognarelli S., Cinti C. Searching for the perfect wave: The effect of radiofrequency electromagnetic fields on cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(4):5366 - 5387. doi:10.3390/ijms15045366.

6. Goraca A., Ciejka E., Piechota A. Effects of extremely low frequency magnetic field on the parameters of oxidative stress in heart. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2010; 61(3):333-338.

7. Terekhina N. A., Zarivchatsky M. F., Vladimirov A. A., Khlebnikov V. V. Antioxidant protection in acute and chronic cholecystitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008;(4):41-43. (In Russ).

8. Reuk S. E., Terekhina N. A. Chemiluminescent analysis of biological fluids for herpes infection in children. *Ural'skij medicinskij zhurnal*. 2017; (8):127-131. (In Russ).

9. Terekhina N. A., Zorin M. G., Terekhin G. A. Effect of sapropeline mud on indicators of oxidative stress and antioxidant protection in acute carbophos poisoning. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2007; (1):6-8. (In Russ).

10. Savlukov A. I., Samsonov V. M., Kamilov R. F. The state of red blood cell resistance as a link of adaptation of the body. *Medicinskij vestnik Bashkortostana*. 2011; 6(4):13-17. (In Russ).

11. Kuzmina E. I., Nelyubin A. S., Shchennikova M. K. Application of induced chemiluminescence to assess free-radical reactions in biological substrates. *Bioximiya i biofizika mikroorganizmov: mezhvuzovskij sbornik. Gor'kij*. 1983:179-183.

12. Beutler E. Red cell metabolism a manual of biochemical methods. Grune & Stratton, Orlando;1990:131-134.

13. Kolmakov V. N., Radchenko V. G. The importance of determining the permeability of red blood cells membranes (PEM) in the diagnosis of chronic liver disease. *Terapevticheskij arhiv*. 1982;54(2):59-62. (In Russ).

14. Terekhina N. A., Zhidko E. V., Terekhin G. A., Orbidans A. G. Influence of sorbents on indicators of antioxidant protection and free radical oxidation in acute alcohol intoxication. *Siberian medical review*. 2017; (6):53-59. (In Russ)

15. Merinova N. I., Kozlova N. M., Kolesnichenko L. S. Malonic dialdehyde n system of glutathione in the blood in patients with chronic pancreatitis depending on the duration of the disease. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2013; (4):67-69. (In Russ).

16. Glushkov S. I., Kucenko S. A., Livanov G. A. The state of glutathione-dependent anti-radical system and processes of peroxide oxidation of lipids in various tissues of laboratory animals in acute sodium thiopental poisoning. *Toxicological Review*. 2002;(1):11-17. (In Russ).

17. Zitta D. V., Terekhina N. A., Subbotin V. M. Clinical and biochemical evaluation of the effectiveness of the program to optimize the perioperative management of patients in elective colorectal surgery. *Koloproktologia*. 2015; 52(2):18-24. (In Russ).

18. Terekhina N. A., Terekhin G. A., Zhidko E. V., Goryacheva O. G. Oxidative protein modification, permeability of erythrocyte membranes and the activity of gamma-glutamyl transpeptidase in various intoxications. *Medicinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2019; (4):78-82. (In Russ).

19. Terekhina N. A., Terekhin G. A., Orbidans A. G., Zhidko E. V. Proteins are antioxidants - targets for the action of xenobiotics. *Acta Naturae*. 2016; (2):77-78. (In Russ)

20. Tashenova G. K., Oksikbaev B. K., Kabduldin T. A. Structural-functional state of cell membranes in pregnant and lactating rats in experimental anemia. Sbornik materialov 2-j Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii «Fiziologiya adaptacii». 2010. Volgograd: Volgograd Scientific Research; 2010:23-25. (In Russ).

21. Kulapina O. I., Kirichuk V. F., Utz I. A. Permeability of red blood cell membranes in patients with infectious pathology. Seriya. Kriticheskie tekhnologii. Membrany. 2005; 25(1):3-11. (In Russ).

МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РЕПЕРFUЗИОННОМ СИНДРОМЕ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ

Харченко В. З., Мневец Р. А., Бекетов А. А.

Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Мневец Руслан Александрович, студент кафедры общей и клинической патофизиологии Медицинской академии имени С. И. Георгиевского, e-mail: mnevets.r@gmail.com

For correspondence: Ruslan A. Mnevets, student of the Department of General and Clinical Pathophysiology of Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: mnevets.r@gmail.com

Information about authors:

Kharchenko V. Z., <http://orcid.org/0000-0001-5092-4672>

Mnevets R. A., <http://orcid.org/0000-0001-9614-5762>

Beketov A. A., <http://orcid.org/0000-0002-0369-5165>

РЕЗЮМЕ

В настоящей статье описана протекторная роль сочетанного введения препарата «Гордокс» (Венгрия) из расчета 10000 АТЕ/кг массы тела и препарата «Церебролизин» (Австрия) из расчета 0,7 мл/кг массы тела в патогенетической терапии повреждения нервной системы при реперфузионном синдроме. Установлено, что профилактическое использование указанной комбинации препаратов перед реваскуляризацией предварительно ишемизированных тканей предотвращает активацию протеолиза в головном мозге, предупреждает структурные нарушения и способствует сохранению основных функций нервной системы.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, головной мозг, протеолиз, ингибиторы протеиназы, церебропротекторы.

MECHANISMS OF DAMAGE TO THE NERVOUS SYSTEM IN A REPERFUSION SYNDROME AND ITS CORRECTION

Kharchenko V. Z., Mnevets R. A., Beketov A. A.

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

This article describes protective role of the combined injection of the «Gordox» (Hungary) 10000 ATU/kg and «Cerebrolysin» (Austria) 0,7 ml/kg in a pathogenetic therapy of nervous system damage during reperfusion syndrome. It is determined that preventive usage of that kind combination before revascularization of the ischemic tissues leads to proteolysis activation prevention in a brain, prevents structural violations and leads to main functions of the nervous system saving.

Keywords: ischemia, reperfusion, brain, proteolysis, proteinases inhibitors

Одним из актуальных направлений фундаментальной и клинической медицины представляется разработка новых способов коррекции реперфузионного синдрома, представляющего собой процесс, обусловленный образованием продуктов гипоксического повреждения клеток и их поступлением в общий кровоток при реваскуляризации ранее ишемизированных тканей с развитием генерализованной интоксикации организма [1; 2; 3; 4]. Этот синдром характеризуется высокой частотой возникновения в клинической практике ангиохирургии, трансплантологии, травматологии, терапии, медицине катастроф и чрезвычайных ситуаций, что делает эту проблему особенно актуальной для сейсмоопасного Крымского полуострова [4].

Причиной высокой летальности при постишемических состояниях является реперфузионная интоксикация, которая приводит к развитию

циркуляторной гипоксии и полиорганной недостаточности – патологии сердца, легких, почек, печени, кишечника, поджелудочной железы, а также, как было установлено нами ранее, головного мозга [2;4;5;6]. Известна связь перечисленных изменений с активацией протеолиза после восстановления кровотока в ранее ишемизированных тканях [1; 4; 7; 8].

Нами было прежде установлено [6], что реперфузионный синдром сопровождается протеолитическим повреждением тканей головного мозга, степень выраженности которого связана с продолжительностью ишемии и реперфузии тканей. При этом молекулярные и патоморфологические нарушения в тканях мозга могут усугублять течение реперфузионного синдрома за счет увеличенного образования и поступления неспецифических протеолитических ферментов в общий кровоток через систему яремных вен

(Харченко В. З., Мневек Р. А., Бекетов А. А., Литвинова С. В., 2018 г.).

Цель проведенной нами работы – предложить новые подходы к коррекции повреждения нервной системы при реперфузионном синдроме.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом экспериментальных исследований стали крысы-самцы линии «Wistar» массой 180-200 г (n=90), разделенные на 5 серий (табл. 1). Условия содержания крыс были идентичными [9].

Реперфузионный синдром моделировался по методике профессора Харченко В. З. на-

ложением турникетов на обе задние конечности с последующим их одномоментным снятием. Жгуты располагались на уровне паховой складки [1], продолжительность ишемического периода зависела от серии исследований (табл. 1). О правильности наложения жгутов свидетельствовало отсутствие отека конечностей, а также бледность их кожных покровов. Декапитацию наркотизированных крыс проводили спустя 6 и 12 часов (в зависимости от принадлежности к серии эксперимента) после реперфузии ранее ишемизированных тканей.

Таблица 1

Серии проведенных экспериментов

Серии	Модель эксперимента
Контрольная (n=10)	Интактные животные
Серия 1 (n=20)	Ишемический период – 2 часа, реперфузионный период – 6 часов
Серия 2 (n=20)	Ишемический период – 2 часа, реперфузионный период – 12 часов
Серия 3 (n=20)	Ишемический период – 6 часов, реперфузионный период – 6 часов
Серия 4 (n=20)	Ишемический период – 6 часов, реперфузионный период – 12 часов

Животные экспериментальных серий были разделены на 3 группы: нелеченные крысы (n=10), коррекция реперфузионного синдрома препаратом «Гордокс» (Венгрия) из расчета 10000 АТЕ/кг массы тела (n=5), коррекция сочетанным применением препарата «Гордокс» и «Церебролизин» (Австрия) из расчета 0,7 мл/кг массы тела (n=5). Препараты вводились внутривенно перед снятием жгутов.

С целью изучения состояния неспецифических протеиназ исследовали эластазо- (ЭПА) и трипсиноподобную активность (ТПА). Принцип данного метода основан на увеличении оптической плотности при расщеплении субстратов с использованием поверенного спектрофотометра «Biomate 5» (Великобритания). Ингибиторный потенциал оценивали по антитриптической активности (АТА) и активности кислотостабильных ингибиторов протеиназ (КСИ) на основе замедления прироста оптической плотности во время торможения расщепления протеолитическими ферментами низкомолекулярных веществ и белков [10]. Материалами для изучения послужили супернатанты гомогенатов головного мозга и сыворотки крови, полученной из сонных артерий и яремных вен.

Изучение морфологии головного мозга проводили методом световой микроскопии гистологических срезов тканей больших полушарий, которые изготавливали по стандартной патоморфологической методике толщиной 4-5 мкм. Вы-

деляли участки мозга размером 10x10x5 мм с последующей десятидневной фиксацией в 10% нейтральном забуференном формалине. Затем участки тканей дегидратировали в батарее спиртов восходящей концентрации и просветляли в ксилоле. Далее изготавливали парафиновые блоки, готовили серийные срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином. Просмотр и фотографирование осуществляли на микроскопе «Olympus CX-41» с установленной цифровой камерой «Olympus C 5050Z».

Для исследования неврологического статуса животных изучали основные функции нервной деятельности.

Для изучения расстройств двигательной активности и координации движений использовали тест установки позы (Bracing test). Для его проверки плавно перемещали крысу по гладкой поверхности, располагая руку сбоку от животного. Крысу считали здоровой, если она производила движения лапами, регулируя позу [11].

Чувствительность исследовали с использованием адгезивного теста. Для этого липкую ленту длиной 3x1 см оборачивали вокруг передней лапы и проводили наблюдение за крысой в течение 30 секунд. Тест считали положительным, если крыса предпринимала успешные попытки удаления ленты, что отражает как сохранность моторной функции, так и чувствительности [12].

Реакцию на боль описывали тестом отдергивания хвоста при прикосновении к нему тонкой

иглой. Сохранность рефлекторной деятельности оценивали путем проверки корнеального рефлекса (моргание при аккуратном прикосновении тканью к роговице) и Pinna-рефлекса (встряхивание головой после прикосновения тканью к наружному слуховому проходу) [13].

Сенсомоторную интеграцию конечностей в ответ на тактильную, проприоцептивную и зрительную стимуляцию позволил изучить тест постановки конечности на опору, основанный на исследовании реакции животных в ответ на изменения положения тела с со-

храненным зрительным контролем и без него. При выполнении животным одного испытания начислялось 2 балла, при недостаточно полном выполнении или промедлении более 2 секунд – 1 балл, при невыполнении – 0 баллов; оценивание производилось путем сложения баллов [14; 15].

Как интегрирующий показатель оценки состояния нервной системы животных нами использовалась шкала Гарсия (табл. 2). Каждый критерий оценивали в баллах в зависимости от степени соответствия (0–3) [16; 17].

Таблица 2

Интерпретация параметров шкалы Гарсия

Показатель	Баллы			
	0	1	2	3
Спонтанная активность в клетке (в течение 5 минут)	Движений нет	Едва двигается	Двигается, но не приближается к трем сторонам клетки	Двигается и достигает по меньшей мере трех сторон клетки
Симметричность движений лап	Нет движений на одной из сторон	Небольшое движение на одной из сторон	Одна сторона двигается медленнее другой	Симметричное движение
Симметричность предплечий крысы при ее нахождении на весу	Нет вытягивания конечностей на одной стороне	На одной стороне небольшое движение	На одной стороне вытягивание лапы менее выражено	Симметричные вытягивания предплечий
Забирается ли крыса по проволочной стенке клетки?	Не предпринимает попыток	Не удается	Да, одна сторона слабая	Да, обе стороны сильные
Ответ на касание к каждой половине туловища	Нет ответа	Нет ответа на одной стороне	Слабый ответ на одной стороне	Симметричный
Реакция на касание к вибриссам	Нет реакции	Нет реакции на одной стороне	Слабая реакция на одной стороне	Симметричная

Кроме того, в эксперименте изучали поведенческие реакции исследуемых животных, а также употребление пищи и воды. Наблюдения проводили в течение 12 часов после снятия жгутов. За контроль принимали результаты, которые демонстрировали здоровые крысы до моделирования реперфузионного синдрома.

Общую летальность находили путем отношения числа погибших до конца эксперимента крыс к общему количеству животных по группам.

Исследования были нами проведены в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (1986 г.), этического комитета Медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского», Постановления

Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Результаты обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel 2016. Вычисляли средние величины (M) и их стандартные отклонения (m), оценивали t-критерий Стьюдента. Показатели считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование реперфузионного синдрома позволило провести учет летальности и выживаемости экспериментальных крыс. Так, относительная выживаемость животных в группах с коррекцией, а также у нелеченных животных

после двухчасовой ишемии в течение периода наблюдений составляла 100%. В тоже время моделирование шестичасового ишемического периода без коррекции впоследствии приводило к гибели животных – относительная летальность у нелеченных крыс с шестичасовой ишемией к 6 часам после реперфузии составляла 10%, к 12 часам после реперфузии – 30%.

Установлено, что при ишемии и реперфузии тканей в сыворотках крови из сонных артерий активность протеиназ достоверно увеличива-

лась по сравнению со здоровыми крысами. При этом в сыворотках крови из яремных вен прирост активности ферментов протеолиза был значительнее – так, ЭПА максимально увеличивалась до 59,31%, а ТПА – до 223,64% ($p < 0,001$). При введении поливалентного ингибитора протеиназ ЭПА и ТПА в среднем снижались до значений, превышающих контрольные на 14% и 47%, соответственно ($p < 0,01$), а при использовании его сочетания с церебропротектором – до нормальных показателей (рис. 1, 2).

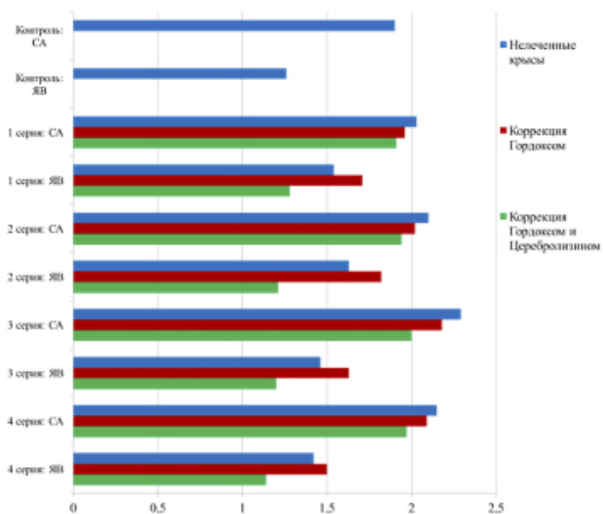


Рис. 1. Эластазаподобная активность сыворотки крови у крыс, мкМоль/мг*мин

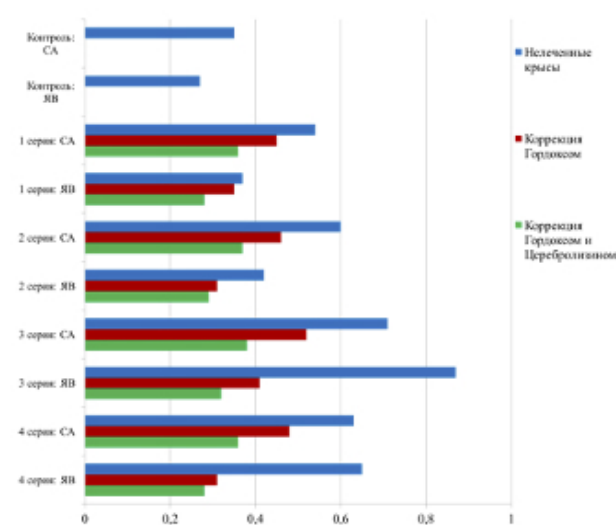


Рис. 2. Трипсиноподобная активность сыворотки крови у крыс, мкМоль/мг*мин

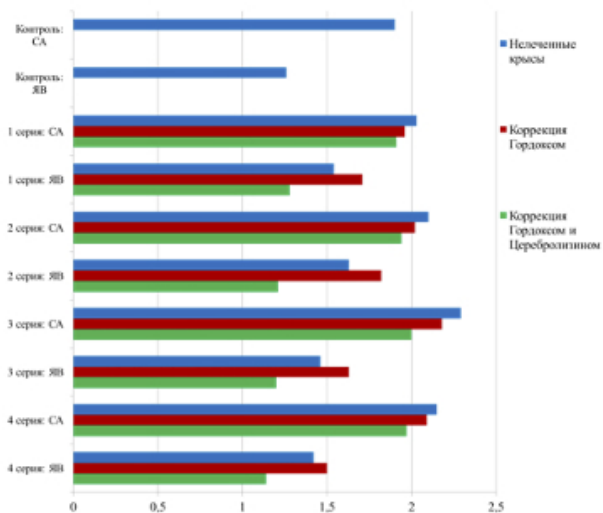


Рис. 3. Активность альфа-1-антитрипсина сыворотки крови у крыс, ИЕ/мл

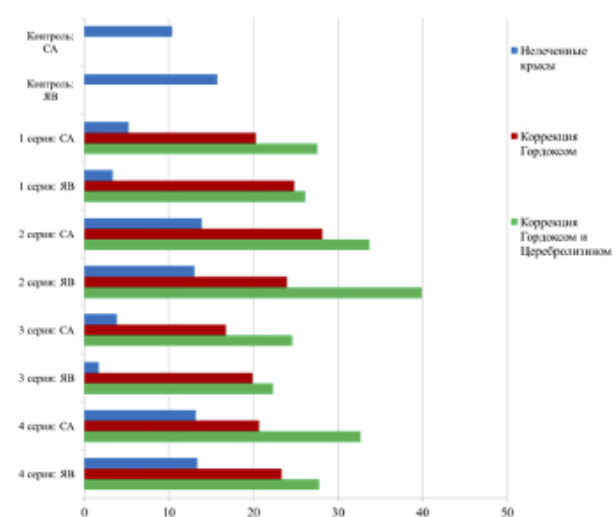


Рис. 4. Активность кислотостабильных ингибиторов протеаз сыворотки крови у крыс, ИЕ/мл

У нелеченных крыс обнаружено достоверное угнетение активности ингибиторов протеиназ сыворотки крови (снижение КСИ до 63,10% по

сравнению с интактными животными). Использование комбинации Гордокса с Церебролизи-

ном приводило к нормализации изучаемых показателей (рис. 3, 4).

В супернатантах гомогенатов головного мозга наблюдалось резкое повышение активности протеиназ при нелеченном реперфузионном синдроме (ЭПА – до 250,97%, ТПА – до 84,43%, $p < 0,001$), что в сериях с 6-часов ишемическим периодом сопровождалось снижением активности ингибиторов протеиназ (АТА – до 35,82%, а активность КСИ – до 52,56%, $p < 0,001$). Использование Гордокса незначительно улучшало исследуемые показатели, в то время как его комбинация с Церебролизином приводила к нормализации изучаемых показателей во всех сериях (рис. 5-8).

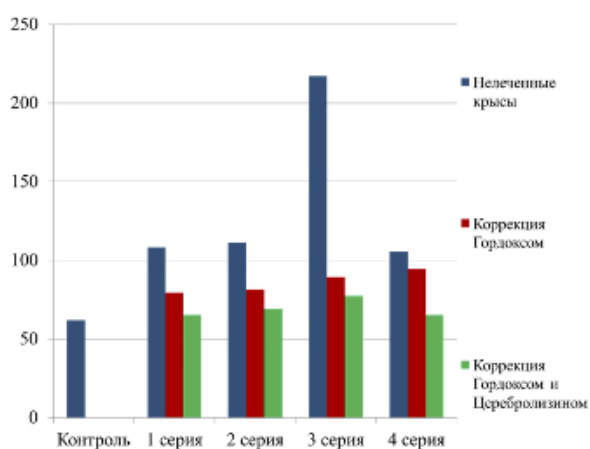


Рис. 5. Эластазаподобная активность супернатантов гомогенатов головного мозга у крыс, мкМоль/мг*мин

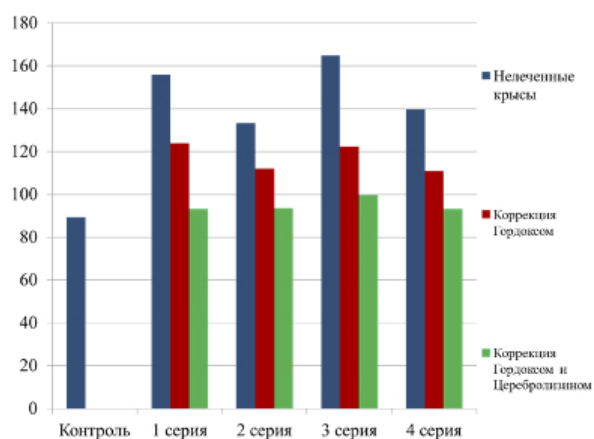


Рис. 6. Трипсиноподобная активность супернатантов гомогенатов головного мозга у крыс, мкМоль/мг*мин

Указанные изменения протеолитической активности в тканях мозга у нелеченных крыс сопровождались морфологическими изменениями головного мозга, что выражалось скоплением

микроглиоцитов вокруг нейронов с пикнотичными ядрами и перичеллюлярным отеком. Сосуды вещества мозга были полнокровны, наблюдались петехиальные кровоизлияния (рис. 9).

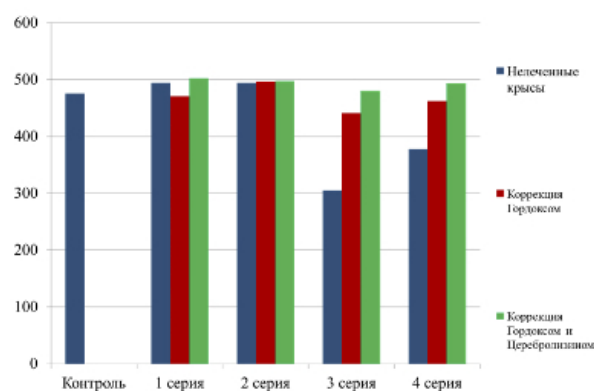


Рис. 7. Активность альфа-1-антитрипсина супернатантов гомогенатов головного мозга у крыс, ИЕ/мл

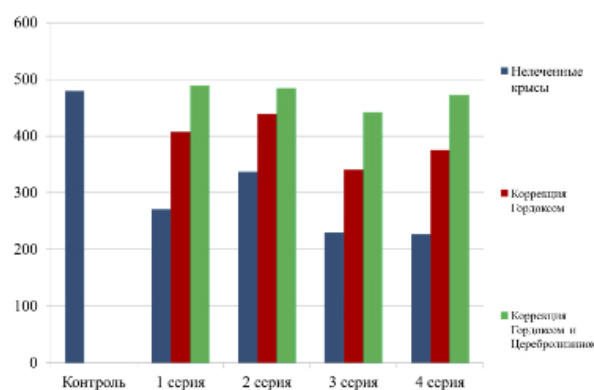


Рис. 8. Активность кислотостабильных ингибиторов протеаз супернатантов гомогенатов головного мозга у крыс, ИЕ/мл

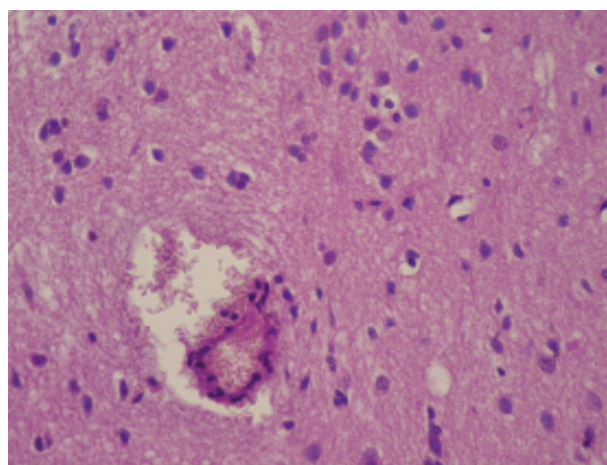


Рис.9. Микрофотография препарата головного мозга экспериментальной крысы, ишемический период – 6 часов, реперфузионный период – 12 часов (ув. 400).

В то же время при предлагаемой сочетанной коррекции в сером веществе нислевская зернистость в большинстве нейронов была сохранена, единичные клетки имели признаки зернистой дистрофии и внутриклеточного отека. В белом веществе незначительная зернистая дистрофия и внутриклеточный отек не наблюдались (рис. 10).

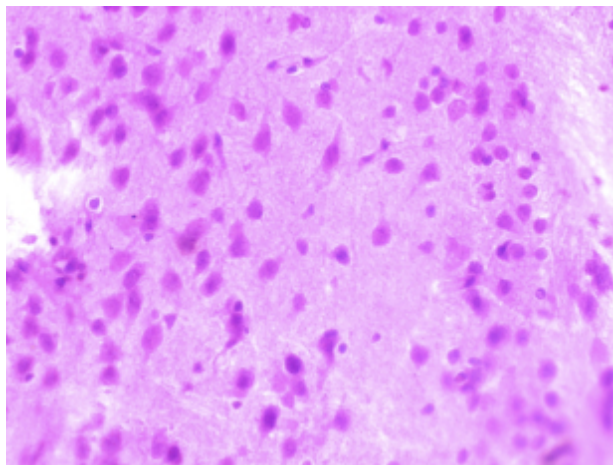


Рис. 10. Микрофотография препарата головного мозга экспериментальной крысы, ишемический период – 6 часов, реперфузионный период – 12 часов, коррекция Гордоксом и Церебролизином (ув. 400).

Изучение теста установки позы позволило зарегистрировать расстройства координации движений спустя 1 час после двухчасовой ишемии, причем у 80% крыс они восстанавливались к 12 часам наблюдения ($p < 0,001$). При этом после шестичасового ишемического периода указанные нарушения развивались тотчас после ревазуляризации, а двигательные функции не восстанавливались ($p < 0,001$).

Проведение адгезивного теста продемонстрировало расстройства чувствительности у нелеченных крыс 1 и 2 серий, начиная с 3 часов после снятия жгутов, а у крыс 3 и 4 серий – сразу после снятия турникета.

Кроме того, у нелеченных экспериментальных животных реакция на боль ослабевала после третьего часа реперфузионного периода, в то время как после шестичасовой ишемии к 6 часу после ревазуляризации у крыс реакция на боль отсутствовала.

Рефлекторная деятельность (корнеальный и Pinna-рефлекс) у нелеченных крыс 1 и 2 серий сохранялась в течение всего периода наблюдений, в то время как у крыс 3 и 4 серий к шести часам после ревазуляризации указанные рефлексы становились слабopоложительными.

Исследования расстройства сенсомоторной интеграции конечностей в ответ на тактиль-

ную, проприоцептивную и зрительную стимуляцию согласно тесту постановки конечностей на опору были прямо пропорционально связаны ($p < 0,001$) со временем ишемического периода и прогрессивно нарастали с увеличением периода реперфузии (рис. 11).

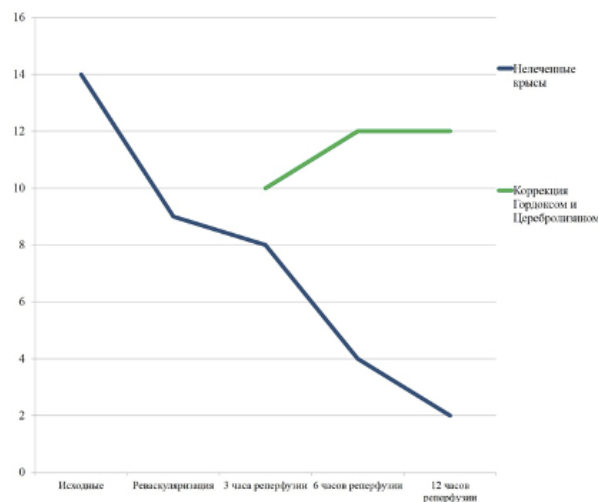


Рис. 11. Динамика изменения баллов в тесте постановки конечностей у крыс с 6-часовым ишемическим периодом (4 серия) без коррекции и с предлагаемой сочетанной терапией

При этом отмечена достоверная ($p < 0,001$) тенденция снижения баллов по интегральной шкале Гарсия (рис. 12). Подобные изменения говорят о тяжелом неврологическом дефиците, вызванном воздействием на нервную систему токсических продуктов после ревазуляризации тканей.

При этом сочетанная превентивная терапия препаратами «Гордокс» и «Церебролизин» в предлагаемых дозировках предотвращала развитие указанных функциональных расстройств при реперфузии ранее ишемизированных тканей исследуемой продолжительности.

Таким образом, при развитии реперфузионного синдрома постишемическая интоксикация сопровождается выраженными расстройствами функций нервной системы. Эти изменения прогрессивно нарастают с увеличением ишемического и реперфузионного периодов, при этом использование комбинации поливалентного ингибитора протеиназы и церебропротектора предупреждает развитие указанных расстройств.

ВЫВОДЫ

1. Реперфузионный синдром способствует протеолитическому повреждению тканей головного мозга, которое выражено прямо пропорционально длительности как ишемического, так и

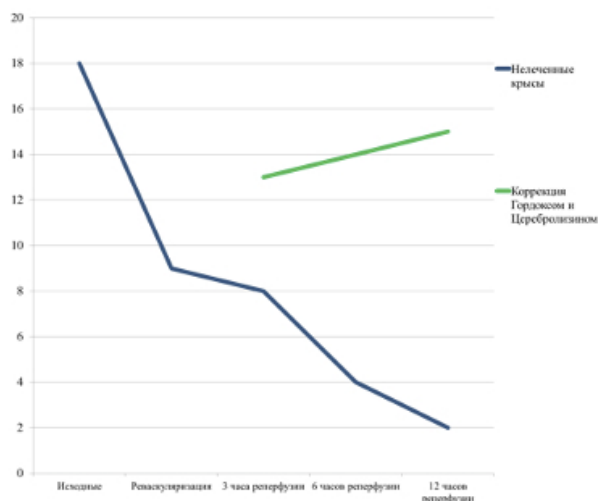


Рис. 12. Динамика изменения баллов по шкале Гарсия у крыс с 6-часовым ишемическим периодом (4 серия) без коррекции и с предлагаемой сочетанной терапией

реперфузионного периода и сопровождается его морфологическими изменениями.

2. Молекулярные и патоморфологические изменения в тканях мозга приводят к значительным нарушениям двигательной, чувствительной и рефлекторной сфер нервной деятельности при экспериментальном реперфузионном синдроме.

3. Сочетанная терапия поливалентным ингибитором протеиназ «Гордокс» (Венгрия) и церебропротектором «Церебролизин» (Австрия) предупреждает системную активацию протеолиза и повреждение головного мозга, предотвращая гибель экспериментальных животных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

- Харченко В. З., Алиев Л. Л., Фомочкина И. И., Харченко С. В. Механизмы развития органопатологии при экспериментальном реперфузионном синдроме. Вестник морского врача. 2008;6(6):168.
- Кубышкин А. В., Фомочкина И. И., Бугаенко О. А. Протеолитические механизмы поражений легких при критических состояниях в абдоминальной хирургии. Вестник морского врача. 2008;6(6):121.
- Виничук С. М. Новые возможности патогенетической коррекции ишемических повреждений ткани головного мозга: взгляд на проблему. Український медичний часопис. 2009;2(70):5-9.
- Харченко В. З., Кубышкин А. В., Фомочкина И. И. и др. Молекулярные механизмы развития экстремальных состояний и их коррекция. Симферополь; 2011.
- Гребенчиков О. А., Лихванцев В. В., Плотников Е. Ю., Силачев Д. Н., Певзнер И. Б., Зорова Л. Д., Зоров Д. Б. Молекулярные механизмы развития и адресная терапия синдрома ишемии-реперфузии. Актуальные вопросы анестезиологии и реаниматологии. 2014;(3):60-67.
- Харченко В. З., Мневцев Р. А., Бекетов А. А., Литвинова С. В. Протеолитические механизмы повреждения головного мозга при реперфузионном синдроме. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2018;8(3): 81-87.
- Фомочкина И. И., Кубышкин А. В. Патогенетическое значение протеиназ-ингибиторной системы в развитии локальной и системной патологии. Патология. 2012;25(2):50.
- Фомочкина И. И., Кубышкин А. В. Протеиназ-ингибиторная система в патогенезе экстремальных состояний. Вестник морского врача. 2008;6(6):167.
- Хельд Д. Р. Требования к лабораторным животным при осуществлении программ здравоохранения. Бюллетень ВОЗ. 1981;40(4):20.
- Кубышкин А. В. и др. Методы определения активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и биологических жидкостях. Киев; 2010.
- Schallert T., Woodlee M. T. Orienting and placing. In: In the Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests. Oxford: Oxford University Press; 2005:129-140.
- Sughrue M. E., Mocco J., Komotar R. J., Mehra A., D'Ambrosio A. L., Grobelny B. T., Penn D. L., Connolly E. S. Jr. An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats. J. Neurosci Methods. 2006;151(2):83-9.
- Chen J., Zhang C., Jiang H., Li Y. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2005;(25):281-290.
- Середенин С. Б., Поварнина П. Ю., Гудашева Т. А. Экспериментальная оценка терапевтического окна нейропротективной активности препарата ГК-2, низкомолекулярного миметика фактора роста нервов. Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова. 2018;118(7):49-53.
- Jolkkonen J., Puurunen K., Rantakomi S., Harkonen A., Naapalinna A., Sivenius J. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. Eur. J. Pharmacol. 2000;400:211-219.

16. Garcia J. H., Wagner S., Liu K. F., Hu X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*. 1995;26(4):627-634.

17. Shmonin A. A., Melnikova E. V., Galagudza M. M., Vlasov T. D. The characteristics of cerebral ischemia in major rat stroke models of middle cerebral artery ligation through craniectomy. *International Journal of Stroke*. 2012;(10):1747-4949.

REFERENCES

1. Kharchenko V. Z., Aliev L. L., Fomochkina I. I., Kharchenko S. V. Mehanizmy razvitiya organopatologii pri jeksperimental'nom reperfuzionnom sindrome. *Vestnik morskogo vracha*. 2008;6(6):168. (In Russ).

2. Kubyshkin A. V., Fomochkina I. I., Bugaenko O. A. Proteoliticheskie mehanizmy porazhenij legkih pri kriticheskikh sostojanijah v abdominal'noj hirurgii. *Vestnik morskogo vracha*. 2008;6(6):121. (In Russ).

3. Vinichuk S. M. Novye vozmozhnosti patogeneticheskoy korrekcii ishemicheskikh povrezhdenij tkani golovnogogo mozga: vzgljad na problemu / Ukraïns'kij medicnij chasopis. 2009;2(70):5-9. (In Russ).

4. Kharchenko V. Z., Kubyshkin A. V., Fomochkina I. I. i dr. Molekuljarnye mehanizmy razvitiya jekstremal'nyh sostojanij i ih korrekcija. Simferopol'; 2011. (In Russ).

5. Grebenchikov O. A., Lihvancev V. V., Plotnikov E. Ju., Silachev D.N., Pevzner I. B., Zorova L. D., Zorov D. B. Molekuljarnye mehanizmy razvitiya i adresnaja terapija sindroma ishemii-reperfuzii / Aktual'nye voprosy anesteziologii i reanimatologii. 2014; 3:60-67. (In Russ).

6. Kharchenko V. Z., Mnevets R. A., Beketov A. A., Litvinova S. V. Proteoliticheskie mehanizmy povrezhdeniya golovnogogo mozga pri reperfuzionnom sindrome. *Krymskij zhurnal eksperimental'noj i klinicheskoy mediciny*. 2018;8(3):81-87. (In Russ).

7. Fomochkina I. I., Kubyshkin A. V. Patogeneticheskoe znachenie proteinaz-ingibitornoj sistemy v razvitiu lokal'noj i sistemnoj patologii. *Patologija*. 2012;25(2):50. (In Russ)

8. Fomochkina I. I., Kubyshkin A. V. Proteinaz-ingibitornaja sistema v patogeneze jekstremal'nyh sostojanij. *Vestnik morskogo vracha*. 2008; 6(6): 167. (In Russ).

9. Hel'd D. R. Trebovanija k laboratornym zhivotnym pri osushhestvlenii programm zdavoohranenija. *Bjul. VOZ*. 1981;40(4):20. (In Russ).

10. Kubyshkin A. V. i dr. Metody opredelenija aktivnosti nespecificheskikh proteinaz i ih ingibitorov v syvorotke krovi i biologicheskikh zhidkostyah. Kiev; 2010. (In Russ).

11. Schallert T., Woodlee M. T. Orienting and placing. In *In the Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Oxford: Oxford University Press; 2005:129-140.

12. Sughrue M. E., Mocco J., Komotar R. J., Mehra A., D'Ambrosio A. L., Grobelny B. T., Penn D. L., Connolly E. S. Jr. An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats. *J. Neurosci Methods*. 2006;151(2):83-9.

13. Chen J., Zhang C., Jiang H., Li Y. Atorvastin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005;(25):281-290.

14. Seredenin S. B., Povarnina P. YU., Gudasheva T. A. Eksperimental'naya ocenka terapevticheskogo okna nejroprotektivnoj aktivnosti preparata GK-2, nizkomolekulyarnogo mimetika faktora rosta nervov. *ZHurnal nevrologii i psichiatrii imeni S. S. Korsakova*. 2018;118(7):49-53. (In Russ).

15. Jolkkonen J., Puurunen K., Rantakomi S., Harkonen A., Haapalinna A., Sivenius J. Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *Eur. J. Pharmacol*. 2000;400:211-219.

16. Garcia J. H., Wagner S., Liu K. F., Hu X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*. 1995;26(4):627-634.

17. Shmonin A. A., Melnikova E. V., Galagudza M. M., Vlasov T. D. The characteristics of cerebral ischemia in major rat stroke models of middle cerebral artery ligation through craniectomy. *International Journal of Stroke*. 2012;(10):1747-4949.

БИША МАРИ ФРАНСУА КСАВЬЕ (1771-1802)**Фоминых Т. А., Дьяченко А. П., Уланов В. С.**

Кафедра судебной медицины, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина, 5/7, Симферополь

Для корреспонденции: Фоминых Т.А., доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой судебной медицины Медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», e-mail: tanusha.ark@gmail.com

For correspondence: Fominykh T.A., MD, Professor, Head of the department of forensic medicine, Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: tanusha.ark@gmail.com

Information about authors:

Fominykh T. A., <http://orcid.org/0000-0001-6572-2387>

D'yachenko A. P., <http://orcid.org/0000-0002-7959-2824>

Ulanov V. S., <http://orcid.org/0000-0002-4096-2787>

РЕЗЮМЕ

В статье рассказывается о великом французском хирурге, анатоме и физиологе Биша, основателе науки о тканях – гистологии, первооткрывателе в анатомии и создателе таких медицинских дисциплин, как танатология (наука о смерти) и патологическая анатомия. Описаны наиболее важные моменты и факты из биографии ученого, кратко излагаются его основные научные взгляды. Перечислены главные научные труды и публикации, а также впервые описанные Биша анатомические структуры и образования. Его именем названы: крылонебная ямка, жировое тело щеки, отверстие в системе циркуляции ликвора, крестцово-подвздошная связка, поперечная щель головного мозга, внутренняя оболочка стенок кровеносных сосудов. Изложены основные положения предложенных им научных концепций в морфологии и патологической анатомии. Подчеркнуто важнейшее значение научных трудов и открытий Мари Ксавьера Биша для современной науки и практической медицины.

Ключевые слова: Мари Франсуа Ксавье Биша, история анатомии, танатология, витализм.

MARIE FRANÇOIS XAVIER BICHAT (1771-1802)**Fominykh T. A., D'yachenko A. P., Ulanov V. S.**

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

The article tells about the great French surgeon, anatomist and physiologist Marie-François Xavier Bichat, the founder of science about tissues – histology, discoverer in an anatomy and creator of such medical disciplines, as a thanatology (science about death) and pathoanatomy. The most essential moments and facts from biography of scientist are described, his basic scientific insights are briefly expounded. Main scientific works and publications, and also described by Bichat anatomic structures and formations are enumerated. His name is carried on by several eponyms in anatomy fossa (pterygopalatine fossa), Bichat's protuberance (buccal fat pad), Bichat's foramen (cistern of the vena magna of Galen), Bichat's ligament (lower fasciculus of the posterior sacroiliac ligament), Bichat's fissure (transverse fissure of the brain) and Bichat's tunic (tunica intima vasorum). The substantive provisions of the scientific conceptions offered to them in morphology and pathoanatomy are expounded. The critical importance of scientific works and discoveries of Marie-François Xavier Bichat for modern science and practical medicine is emphasized.

Key words: Marie François Xavier Bichat, history of anatomy, thanatology, vitalism.

Великий французский хирург, анатом, физиолог, создатель анатомической концепции нервной системы, а также основоположник учения о тканях, Мари Франсуа Ксавье Биша (Marie François Xavier Bichat) родился 14.11.1771 г. в г. Тиоретте (Энн). Отец Ксавье, Жан-Батист, также был врачом и его первым наставником в медицинской науке. Еще в детстве сын любил присутствовать при работе Биша-старшего и даже помогал отцу в осуществлении малых хирургических вмешательств. Позднее Биша учился в колледже Нантуа, затем – в семинарии Saint-Irenée (Сент-Ирене) в Лионе (рис. 1).

В 1793 г. Биша назначили хирургом Альпийской армии на службу в подчинение старшего коллеги Бюже в больнице Бурга, а с 1794 г. он совершенствовал специальность хирурга в Париже, будучи любимым учеником известного ученого – его учителем на протяжении ряда лет был известнейший Пьер-Жозеф Дезо. После смерти наставника и покровителя в 1795 г. Биша всячески поддерживал его семью, закончил начатые Пьером-Жозефом научные труды и счел своим долгом издать сочинения Дезо. В 1796 г. Биша с коллегами основали общество «Société Médicale d'Emulation» в качестве интеллекту-

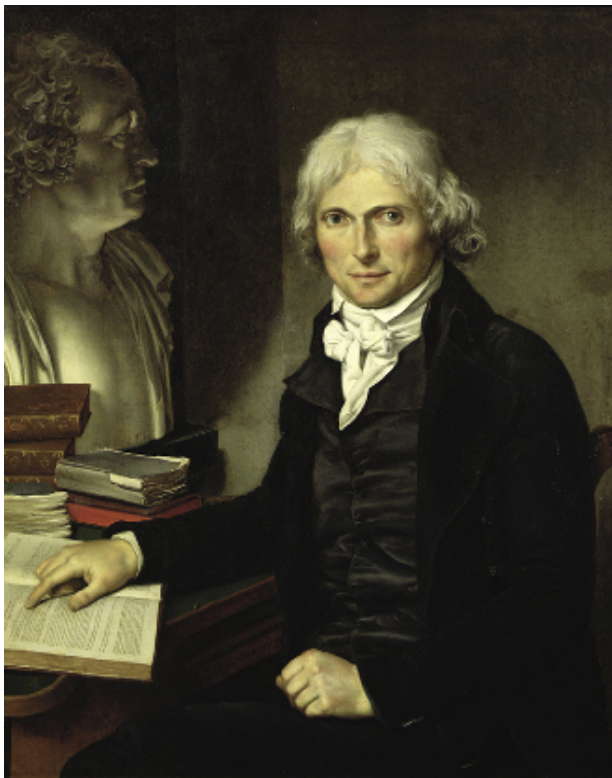


Рис. 1. Портрет Мари Франсуа Ксавьера Биша. Художник Пьер Максимилиан Деляфонтен, 1799 г.

альной платформы для обсуждения медицинских проблем. Во французской столице с 1797 г. Биша служил преподавателем по ряду специальностей – анатомии, физиологии, хирургии. Лекции по указанным дисциплинам Биша иллюстрировал вскрытием трупов и вивисекциями. В 1800 г. М. Биша был направлен на работу в столичную больницу Отель-Дьё (Hôtel-Dieu). Благодаря тому, что, в соответствии с Королевским Указом от 1706 года, было позволено проведение анатомических курсов на базе госпиталя Отель-Дьё, Биша имел неограниченные возможности для проведения морфологических исследований [3]. Руководителем и идейным вдохновителем исследователя был ведущий хирург упомянутой больницы Марк-Антуан Пти (1766-1811). Параллельно Мари Ксавье продолжил работу над объединением и переработкой хирургических доктрин, опубликованных его наставником Дезо в различных периодических изданиях; в частности, он написал «*Uvres chirurgicales de Desault, Ou tableau de sa doctrine, et de sa pratique dans le traitement des maladies externes*» [12] (рис. 2).

В своих воззрениях М. Биша придерживался взглядов витализма; он полагал, что главное отличие живых существ от объектов неживой природы связано с наличием в организмах особой «жизненной силы». В своих рассуждениях Биша находился на позициях несхожести за-



Рис. 2. Пьер-Жозеф Дезо и Мари Франсуа Ксавье Биша. Гравюра XIX века

конов органической и неорганической природы; он считал, что так называемое «жизненное начало» рассредоточено по всем тканям. В его формулировке «жизнь есть совокупность отправлений, противящихся смерти» превалирует идея о существовании в живом организме двух одновременно протекающих противоположных процессов – непрерывного созидания и разрушения. Биша является также одним из «отцов» танатологии. Он разработал концепцию «жизненного тренажника», особо подчеркнув, что процесс умирания происходит неравномерно [1; 2; 15; 17].

В научных работах М. Биша дано обоснование учения о тканях живого организма, а также аргументированы основы патологии. Сам знаменитый анатом описал 21 вид тканей (к которым он причислил также некоторые органы структуры и комплексы, в частности, кровеносную систему). Ученый расценивал ткани как структурные и физиологические единицы жизни, а также носители всех жизненных процессов в организме, в т. ч. и болезненных. Одно из основных положений учения Биша гласит о том, что каждый вид ткани обладает определенными специальными элементарными функциями: нервная ткань – чувствительностью, мышечная – способностью к сократимости и т. д., а также особыми морфологическими, химическими и биологическими характеристиками. В своих исследованиях Биша не использовал микроскоп, поэтому его научные выводы не содержали подтверждений на клеточном уровне. Однако,

ему удалось соединить в своих рассуждениях органную патологию Морганьи и клеточную патологию Рудольфа Вирхова [7; 11; 13].

Биша разработал классификацию тканей, принадлежащих к различным системам и формирующих органы. «В живых телах все связано и сцеплено до такой степени, что нарушение функций в одной какой-либо части неизбежно отражается на всех других», – говорил Биша. Тесную взаимосвязь жизнеобеспечивающих процессов в организме он называл взаимной «симпатией». Биша справедливо полагал, что рациональное понимание физиологических и патологических процессов, протекающих в организме в состоянии здоровья или болезни, должно основываться на изучении биохимических процессов [2; 6; 8].

Болезнь Биша рассматривал как патологический процесс, протекающий, прежде всего, в конкретных тканях, а не органах в целом, являясь апологетом «тканевой патологии». Для этого ученый тщательно изучил и подробно описал патологические изменения в тканях и органах людей, скончавшихся от разнообразных заболеваний. Болезнь понималась ученым изначально как процесс местного характера (на уровне клеток и тканей), только позднее охватывающий органы и системы. Результаты этих изысканий легли в основу современной патоморфологии [2; 21].

Разделив нервную систему на «растительную», или вегетативную, и «животную» (анимальную, соматическую) части, в 1800 г. Биша ввёл в анатомию и вообще в медицину термин «вегетативная нервная система», который теперь широко используется и в физиологии, и в других медицинских теоретических дисциплинах и лечебных специальностях [11; 14].

В настоящее время вегетативную нервную систему трактуют как часть нервной системы человека и животных, регулирующую деятельность внутренних органов, желез внутренней секреции, кровеносных и лимфатических сосудов, сердца, гладкой и отчасти поперечной мускулатуры. Вегетативная нервная система подразделяется также на симпатический и парасимпатический отделы; в ней также выделяют центральную и периферическую части. Эта система имеет двухнейронный принцип строения. Тела первых нейронов расположены в определённых отделах ЦНС. Аксоны этих нервных клеток (преганглионарные волокна), выходя за пределы ЦНС, отправляются к узлам вегетативной нервной системы, где оканчиваются у тел вторых нейронов. Отростки вторых нейронов (или постганглионарные волокна) направляются к органу-мишени.

Соответственно и органы Биша выделял «растительные», функционирующие непрерывно и без перерыва на отдых, и «животные», действующие произвольно и с перерывами на время сна [14].

Кроме того, впервые в медицину М. Биша ввёл термин «ткань» (в 1801 г.), используемый крайне широко и поныне. Этим термином в современной науке обозначается морфофункциональная система специфически дифференцированных клеток, а также неклеточных структур, объединяемых на основании общности строения, функции и (или) происхождения.

Термин «система» (греч. целое, составленное из частей; соединение) в медицинскую науку также введен впервые Биша. В современном понимании обозначает совокупность элементов, объединённых по своему анатомическому строению и функции; например, нервная система. А в наиболее общем понимании термин «система» обозначает «множество элементов, находящихся в отношениях и связях друг с другом, и образующих определённую целостность, единство». По мнению французского учёного, «Совокупность систем и их элементарных функций и составляет процесс жизнедеятельности организма» [16].

Как анатом М. Биша детально описал жировое тело щеки (жировой комок Биша), представляющее собой скопление жировой ткани между щёчной и жевательной мышцами. При этом ученый отметил, что у новорожденных и детей раннего возраста жировое тело щеки особенно хорошо выражено, т. к. имеет важное функциональное значение – препятствует втягиванию щёк во время сосания. В настоящее время в челюстно-лицевой и пластической хирургии жировое тело Биша является востребованным объектом интереса специалистов [5; 9; 18; 20].

Им описана срединная апертура IV желудочка (отверстие Биша) – отверстие в IV желудочке головного мозга, расположенное в области нижнего угла ромбовидной ямки и сообщающее мозговой желудочек с подпаутинным пространством (син.: отверстие Мажанди).

Известно пространство Биша, которое располагается между валиком мозолистого тела с одной стороны, и верхним придатком мозга и пластинкой четверохолмия – с другой.

Имя Биша носит крылонёбная ямка – небольшое пространство в глубокой области лица, ограниченное спереди бугром верхней челюсти, сзади – крыловидным отростком клиновидной кости, медиально – перпендикулярной пластинкой нёбной кости; содержимым ямки являются: крылонёбный вегетативный узел, описанный Иоганном Фридрихом Меккелем (старшим), а

также верхнечелюстная артерия и одноименный нерв [21].

Биша изучал эффекты переливания темной деоксигенизированной крови, проведя первые опыты с перекрестной циркуляцией. Он соединял проксимальный конец сонной артерии одной собаки с дистальным концом сонной артерии другой собаки. Когда собака-донор стала задыхаться и ее артериальная кровь потемнела, собака-реципиент также потеряла сознание, что явилось доказательством значения степени насыщенности крови кислородом для поддержания нормальной жизнедеятельности [4].

Также Биша описал внутреннюю оболочку стенок артерий (интиму), паутинную оболочку головного мозга (*tunica arahnioidea*), щель большого мозга и *ligamentum sacrospinale* позвоночного столба [10].

Среди трудов выдающегося французского учёного наиболее известными стали «Физиологические исследования о жизни и смерти» («*Recherches physiologiques sur la vie et la mort*», 1800); «Приложения общей анатомии к физиологии и медицине» («*Anatomie générale appliquée à la physiologie et à la médecine*», 2 vols, 1801). Биша успел завершить два из пяти задуманных томов «Описательной анатомии» («*Traité d'anatomie descriptive*, 1801-1803») [2]. Тканевую «систему» Биша подробно описал в работе «Трактат о мембранах и оболочках» («*Traite des membranes en general et de diverses membranes en particulie*», 1800). Публикация трех последних томов сочинений Биша, законченных М. Бюиссоном и П. Ру, состоялась в 1805 г. [10] (рис. 3).

Сочинения М. Биша пользовались неизменным успехом не только у медиков и естествоиспытателей, но и у философов, писателей и поэтов, особенно те, которые касались рассуждений о жизни и смерти.

Его учение получило дальнейшее развитие в работах одного из основоположников современной клинической медицины и пат. анатомии Рэне Теофила Гиацинта Лаэннека (1781-1826), французского физиолога Франсуа Мажанди (1783-1855) и других известных учёных.

Биша своими исследованиями сделал значительно больше, чем просто описал ткани в нормальном и патологическом состояниях, он сумел трансформировать анализ клинических данных в основную информацию для выявления и диагностики патологического процесса [7].

В своих научных наблюдениях Биша увидел нечто подобное открытиям его великого соотечественника, химика Лавуазье. Как говорил Биша, точно так, как в химии существуют простые тела, образующие с помощью различных реакций химические конструкции, также и в

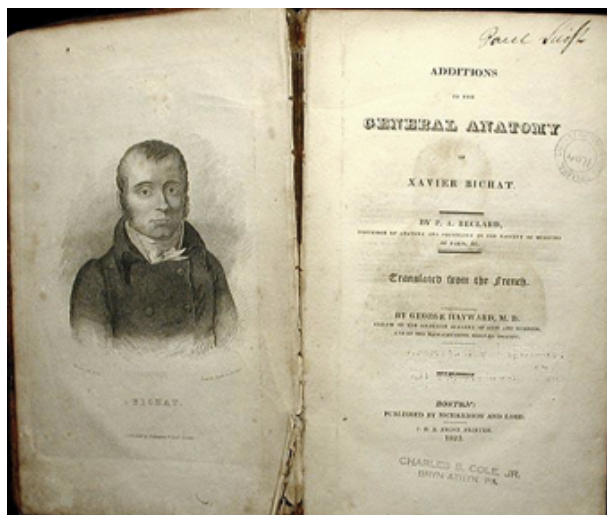


Рис. 3. Мари Франсуа Ксавье Биша. «Приложения к общей анатомии»

анатомии есть простые ткани, формирующие в результате различных сочетаний сложные органы [7].

Великий первопроходец морфологической науки Мари Франсуа Ксавье Биша скончался 22.07.1802 г. в Париже от туберкулезного менингита (есть также версия, что Биша заразился брюшным тифом от трупа во время вскрытия) в возрасте 30 лет [19] (рис. 4).



Рис. 4. Доктора Еспарон и Ру у постели умирающего Биша. Художник Луи Эрсан, 1817 г.

Лейб-медик Наполеона I, основоположник французской клинической медицины, доктор Ж.-Н. Корвизар отправил императору известие о непоправимой утрате со словами: «...едва ли найдется кто-нибудь другой, кто сделал в такое короткое время так много и столь важного» [10].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Е. В. Танатология и танатогенез: исторические факты, проблемы и перспективы изучения. Медицинские новости. 2018;2:10-17.

2. Биша Мари Франсуа Ксавье. Физиологические исследования о жизни и смерти: С прим. пер. и со ст. «О жизни, трудах и значении Биша». Пер. с фр. П. А. Бибикив. Санкт-Петербург: Тип. И. И. Глазунова, 1865; LVIII.

3. Михель Д. В. Власть, знание и мертвое тело: историко-антропологический анализ анатомических практик на Западе в эпоху Ранней Современности. LOGOS. 2003;4-5(39):219-233.

4. Никитина Е. А. Переливание крови: начало. Интегративная физиология. 2020;1 (3):169-180. doi: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-169-180

5. Слюсарев И. Ю., Слюсарев Н. И. Резекция и транспозиция жирового тела щеки: показания и противопоказания к операции. Актуальні проблеми сучасної медицини. 2018; 18(1):327-330.

6. Сперанский В. С., Гончаров Н. И. Очерки истории анатомии. Волгоград: Издатель, 2012.

7. Фуко М. Рождение клиники. М.: Смысл; 1998:190-224.

8. Яковлев В. М., Нечаева Г. И. Системные дисплазии соединительной ткани: актуальность проблемы в клинике внутренних болезней. Сибирский медицинский журнал. 2011;26(3)2:9-12.

9. Яременко А. И., Лебедев Д. В., Иванов В. В. Жировое тело Биша: анатомо-топографические предпосылки применения при пластическом замещении дефектов в полости рта. Пародонтология. 2017;22(4):17-19.

10. Androutsos G., Diamantis A., Vladimirov L. Cancer's conceptions of Marie François Xavier Bichat (1771-1802), founder of histology. Journal of BUON. 2007;12:295-302.

11. Bichat Xavier. Anatomie générale: appliquée à la physiologie et à la médecine. Paris, Brosson, Gabon et Cie., 1801.

12. Clarac F., Barbara J.-G., Broussolle E., Poirier J. Figures and institutions of the neurological sciences in Paris from 1800 to 1950. Introduction and Part I: Neuroanatomy. Revue Neurologique. 2012;168(1):2-14. DOI: 10.1016/j.neurol.2011.08.013

13. Forrester J. M. The homoeomerous parts and their replacement by Bichat's tissues. Medical History. 1994;38(4):444-458.

14. Fye W. B. Marie-François-Xavier Bichat. Clinical Cardiology. 1996; 19(9):760-761.

15. Haigh E. The roots of the vitalism of Xavier Bichat. Bulletin of the History of Medicine. 1975;49(1):72-86.

16. Haigh E. Xavier Bichat and the medical theory of the eighteenth century. Medical History. Supplement. 1984;(4):1-146.

17. Hwang S. [Xavier Bichat's Medical Thought in the Historical Context of French Vitalism] [Article in Ko]. Korean Journal of Medical History. 2012;2(1):141-170.

18. Klüppel L., Marcos R. B., Shimizu I. A., Da Silva M. A. D. Complications associated with the bichectomy surgery. Revista Gaúcha de Odontologia. 2018;66(3):278-284. doi: 10.1590/1981-8637201800030000143488

19. Kutia S. A., Pikalyuk V. S., Shaymardanova L. R., Zukow W. Famous morphologists who died young. Journal of Health Sciences. 2013;3(10):347-358.

20. Lagiera A., Alshawarebb F., Layounc W., Lagierc J.-P. Le corps adipeux de la joue dans la reconstruction des pertes de substances postérieures de la cavité buccale (Bichat's buccal fat pad for reconstruction of posterior oral cavity defects). Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale. 2020;111(3):152-154. doi: 10.13140/2.1.5021.7606

21. Shoja M. M., Tubbs R. Sh., Loukas M., Shokouhi G., Ardalani M. R. Marie-François Xavier Bichat (1771-1802) and his contributions to the foundations of pathological anatomy and modern medicine. Annals of Anatomy. 2008;190(5):413-420.

REFERENCES

1. Alekseeva E. V. Thanatology and thanatogenesis: historical facts, problems and perspectives of research. Medical news. 2018;2:10-17 (In Russ.).

2. Bichat Marie Francois Xavier. Physiological research on life and death. Transl. Fr. P.A. Bibikov. Sankt-Petersburg, publ. I.I. Glasunov, 1865; LVIII. (In Russ.).

3. Mikhel D.V. Power, knowledge and dead body: a historian and anthropological analysis of anatomy practices in the West in the age of early modernity. Logos. 2003;4-5(39): 219-233. (In Russ.).

4. Nikitina T. A. Transfusion of blood: beginning. Integrative Physiology. 2020;1(3): 169-180. (In Russ.). doi: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-169-180

5. Slusarev I. Yu., Slusarev N. I. Resection and transposition of buccal fat pads: indications and contraindications for operation. Actual Problems of the Modern Medicine. 2018; 18(1):327-330. (In Russ.).

6. Speransky V. S., Goncharov N. I. Essays on the history of anatomy. Volgograd: Publisher, 2012. (In Russ.).

7. Foucault M. The birth of the clinic. M.: Smysl, 1998:190-224. (In Russ.).
8. Yakovlev V. M., Nechayeva G. I. Systemic cases of connective tissue dysplasia: actuality of the problem in internal diseases clinic. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Tomsk) = Siberian Medical Journal (Tomsk)*. 2011;26(3)2:9-12. (In Russ.).
9. Yaremenko A. I., Lebedev D. V., Ivanov V. V. Bichat's fat pad: topographic anatomy and prospects for the application of plastic closure defects of the oral cavity. *Parodontologiya*. 2017;22 (4):17-19. (In Russ.).
10. Androutsos G., Diamantis A., Vladimiros L. Cancer's conceptions of Marie François Xavier Bichat (1771-1802), founder of histology. *Journal of BUON*. 2007;12:295-302.
11. Bichat Xavier. *Anatomie générale: appliquée à la physiologie et à la médecine*. Paris, Brosson, Gabon et Cie., 1801.
12. Clarac F., Barbara J.-G., Broussolle E., Poirier J. Figures and institutions of the neurological sciences in Paris from 1800 to 1950. Introduction and Part I: Neuroanatomy. *Revue Neurologique*. 2012;168(1):2-14. doi: 10.1016/j.neurol.2011.08.013
13. Forrester J. M. The homoeomerous parts and their replacement by Bichat's tissues. *Medical History*. 1994;38(4):444-458.
14. Fye W. B. Marie-François-Xavier Bichat. *Clinical Cardiology*. 1996; 19(9): 760-761.
15. Haigh E. The roots of the vitalism of Xavier Bichat. *Bulletin of the History of Medicine*. 1975; 49(1):72-86.
16. Haigh E. Xavier Bichat and the medical theory of the eighteenth century. *Medical History. Supplement*. 1984;(4):1-146.
17. Hwang S. [Xavier Bichat's Medical Thought in the Historical Context of French Vitalism] [Article in Ko]. *Korean Journal of Medical History*. 2012;2(1):141-170.
18. Klüppel L., Marcos R. B., Shimizu I. A., Da Silva M. A. D. Complications associated with the bichectomy surgery. *Revista Gaúcha de Odontologia*. 2018;66(3):278-284. doi: 10.1590/1981-8637201800030000143488
19. Kutia S. A., Pikalyuk V. S., Shaymardanova L. R., Zukow W. Famous morphologists who died young. *Journal of Health Sciences*. 2013;3(10):347-358.
20. Lagiera A., Alshawarebb F., Layounc W., Lagierc J.-P. Le corps adipeux de la joue dans la reconstruction des pertes de substances postérieures de la cavité buccale (Bichat's buccal fat pad for reconstruction of posterior oral cavity defects). *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale*. 2020;111(3):152-154. doi:10.13140/2.1.5021.7606
21. Shoja M. M., Tubbs R. Sh., Loukas M., Shokouhi G., Ardalan M. R. Marie-François Xavier Bichat (1771-1802) and his contributions to the foundations of pathological anatomy and modern medicine. *Annals of Anatomy*. 2008;190(5):413-420.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН КОЖИ

Цибулевский А. Ю.¹, Дубовая Т. К.², Демьяненко И. А.³

¹Московский медицинский университет «РЕАВИЗ», 107564, Краснобогатырская, 2, стр. 2., Москва, Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117997, ул. Островитянова, 1, Москва, Россия

³Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия.

Для корреспонденции: Цибулевский Александр Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры морфологии и патологии, Московский медицинский университет «РЕАВИЗ», e-mail: auts77@gmail.com

For correspondence: Alexandr Tcibulevskiy, MD, professor of the Department of Morphology and Pathology, REAVIZ Medical University, e-mail: auts77@gmail.com

Information about authors:

Tsibulevskiy A. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4449-7859>

Dubovaya T. K., <https://orcid.org/0000-0001-7936-180X>

Demyanenko I. A., <http://orcid.org/0000-0001-6148-7076>

РЕЗЮМЕ

Моделирование заболеваний человека на лабораторных животных непрерывно сопровождали историю медицинских открытий и помогли исследователям получить большое количество полезной информации, на базе которой основывались многие достижения в медицине. Разделение физиологических процессов на составные компоненты путем моделирования является одной из важных частей любого исследования. Заживление ран — это сложный процесс. Использование моделей (in vitro, in vivo — на животных и человеке) позволило провести масштабные исследования в этой области, что значительно улучшило знание механизмов заживления как острых, так и хронических ран кожи. Параллельно с полученными знаниями продолжается разработка новых методов лечения ран и понимание того, как усовершенствовать уход за ними, для достижения наилучших результатов. Хотя модели in vitro и модели на животных занимают определенное место в данных исследованиях, безусловно, лучшими моделями являются те, которые основаны на привлечении добровольцев и обеспечивают изучение физиологически более тонких механизмов патогенеза и заживления кожного покрова.

Ключевые слова: заживление кожи, заживление ран, модели ран.

MODELS OF WOUND HEALING

Tcibulevskiy A. Yu.¹, Dubovaya T. K.², Demyanenko T. K.³

¹REAVIZ Medical University, Moscow, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University), Moscow, Russia

³Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

Simulations of human disease in laboratory animals have continuously accompanied the history of medical discoveries and have helped researchers obtain useful information in medicine. The separation of physiological processes into their constituent components through modeling is one of the important parts of any research. Wound healing is a complex process. Using of models (in vitro, in vivo - on animals and humans) allowed large-scale research in this area, which significantly improved the knowledge of the healing mechanisms of both acute and chronic skin wounds. In parallel with the knowledge gained, the development of new wound treatments continues and the understanding of how to improve their care for the best results continues. Although in vitro and animal models have a place in these studies, by far the best models are those that rely on volunteers and provide physiologically more accurate mechanisms of skin pathogenesis and healing.

Key words: skin healing, wound healing, models of wound healing.

Моделирование заболеваний человека на лабораторных животных непрерывно сопровождали историю медицинских открытий и помогли исследователям получить большое количество полезной информации, на базе которой основывались многие прорывы и достижения в медицине [1]. Однако они не свободны от ряда ограничений и в ряде случаев недостаточны для выявления точных патогенетических механиз-

мов заболевания у людей. Так, животные модели подходят для изучения многих кожных заболеваний, в частности, для исследования заживления ран и других поражений [2; 3]. Сложный молекулярно-клеточный механизм заживления кожных ран, в котором участвуют самые разнообразные популяции клеток, не всегда находит свое отражение в экспериментальных моделях. По этой причине в каждом конкретном исследовании в

зависимости от поставленных задач необходим выбор адекватной модели. Так, клинические исследования (далее – человеческие модели) хронической раневой патологии не всегда являются хорошими предсказателями, но они дают хорошее понимание острой раневой патологии [4]. Исследователи часто сталкиваются с большими трудностями в поисках добровольцев с хроническим раневым процессом, поэтому используют модели острых ран у людей, что предоставляет возможность понять процесс заживления ран и эффективность различных средств, направленных на заживление ран. В данной статье приведен обзор наиболее популярных на сегодняшний день моделей по заживлению ран.

Предпосылки для разработки моделей

Заживление ран — это сложный и динамичный процесс, состоящий из четырех последовательных фаз, которые происходят точно регулируемым образом, включая гемостаз, воспаление, пролиферацию и эпителизацию (5, 6). Однако, напротив, некоторые кожные повреждения не проходят этот процесс, что приводит к хроническим незаживающим ранам, таким как венозные язвы ног и язвы диабетической стопы. Такие нарушения в нормальной регенерации кожного покрова заинтересовали исследователей по всему миру, что привело к вопросу о возможном моделировании процесса, в первую очередь для поиска минимально затратного лечения. Исследования по большей части полагались на использование моделей для имитации заживления ран. Основное внимание в этом исследовании уделялось областям, которые могут облегчить бремя и помочь в процессе заживления. основополагающая работа Winter [7], вероятно, является единственным наиболее важным достижением, которое привело к гипотезе о том, что влажная среда благоприятна для процесса заживления. С тех пор было признано, что это один из наиболее важных аспектов лечения острых или хронических ран. С того времени количество работ в области заживления ран существенно выросло, и был достигнут значительный прогресс в разработке того, что сейчас известно как продвинутые методы лечения кожных заболеваний.

Модели заживления

На сегодняшний день разработано большое количество моделей, способных воссоздать процесс реэпителизации кожи. К ним относятся модели *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, модели с участием человека-добровольца и чистые клинические модели, все со своими преимуществами и недостатками. Эти модели важны тем, что позволяют проанализировать и определить множество различных аспектов в процессе заживления раны. Модели *in vitro* и *in silico* наиболее часто при-

меняются на доклиническом этапе исследования препаратов для заживления кожи [8], поэтому в данном обзоре будут рассмотрены модели на животных и человеке, которые могут наиболее точно воспроизвести изучаемую патологию.

Животные модели. Различные аспекты заживления ран можно исследовать в хорошо воспроизводимой и контролируемой среде с использованием моделей на животных. Хотя заживление ран у животных не может быть прямым и истинным отражением аналогичного процесса у человека [9], эти модели необходимы для фундаментальных исследований и разработок в этой области.

Вместе с тем анатомия и физиология кожи оказывают существенное влияние на патофизиологию лечения. Грызуны представляют собой отличные доклинические модели для исследования заживления ран из-за их доступности, низкой стоимости и простоты обращения. Однако заживление ран на моделях грызунов принципиально отличается от такового у людей. Это связано с тем, что основным механизмом закрытия раны является стягивание краев раны, тогда как у людей реэпителизация и образование грануляционной ткани выходят на первый план [10; 11]. Другой часто используемой моделью заживления кожных ран являются свиные модели [12]. Это связано с тем, что анатомически и физиологически кожа свиньи больше похожа на кожу человека [13].

Общество Заживления Ран (WHS) определило, что модели заживления ран на свиньях имеют большие преимущества перед другими моделями на животных. Кроме того, было установлено, что для получения клинически значимых экспериментальных данных, необходимо задействовать образцы тканей человеческой раны. И что после того, как гипотеза была сформулирована и подтверждена на человеческих образцах, идентификация тех же механизмов у животных представляет собой действенный подход, который можно использовать для более глубоких исследований и экспериментальных манипуляций, невозможных на людях.

Человеческие модели. Использование людей в качестве основы моделей кожного заживления имеет большое значение в том смысле, что патология и физиология заживления будут идентичны патологии пациента. Существует ряд моделей ран, которые могут быть применены к человеку-добровольцу, чтобы предоставить точные и репрезентативные инструменты исследования.

Частичное истончение. Частичное повреждение ограничивается эпидермисом и поверхностной дермой без повреждения кровеносных сосудов дермы. Исцеление происходит путем ре-

генерации других тканей. Существует несколько способов такого повреждения.

Использование липкой ленты. Проще всего выполнить частичное истончение путем удаления рогового слоя с помощью липкой ленты. В этой модели ранения эпидермальный компонент обычно остается нетронутым. Однако из-за частичного удаления рогового слоя нарушается проницаемость кожи, что можно измерить с помощью трансэпидермальной потери воды [14]. Хотя это незначительное и очень поверхностное повреждение, оно достаточно разрушительно, чтобы активировать процессы восстановления эпидермиса, вызывая повышенную эпидермальную пролиферацию и гиперплазию. Важно отметить, что этот тип раны варьируется и зависит от различных методических факторов, например, липкости ленты, давления, оказываемого при наложении ленты на кожу, скорости и направления удаления ленты и, что наиболее важно, количества полос ленты. При использовании этой модели все эти факторы должны быть стандартизированы [15].

Хотя модель липкой ленты использовалась в основном для исследования барьерной функции кожи, её также успешно применяли в ряде работ, посвященных изучению лечения кожных ран [16]. Недавно эта модель была использована для оценки благотворного воздействия алоэ вера и витамина Е на экспериментальные раны. Полученные результаты показывают, что биоадгезивные пленки, содержащие витамин Е (альфа-токоферил ацетат) и алоэ вера, могут быть инновационной терапевтической системой для лечения ожогов кожи [17].

Преимущества этой модели заключаются в том, что она является быстрой и простой в использовании, относительно безболезненной и позволяет оценить компонент (реэпителизацию) острого заживления ран. Недостатки заключаются в том, что оценивается только отдельный компонент заживления ран и что эта модель не имеет отношения к более глубокой патологии раневого процесса.

Уртикарная модель. Изначально этот метод был разработан для измерения концентрации наркотиков в различных частях кожи [18], но вскоре стал использоваться и при исследовании заживления ран. Волдырь (лат. *urtica*) образуется в результате разделения эпидермиса и дермы на базальной мембране между *lamina lucida* и *lamina densa*. Полость пузыря заполняется тканевой или интерстициальной жидкостью [19]. Еще в 1960-х годах было выявлено, что для исследовательских целей существует потребность в методике, с помощью которой можно было бы отделить эпидермис от дермы чисто меха-

ническими силами, избегая химического или термического повреждения. Это приводило к разрыву базальной мембраны и, следовательно, аккуратному разделению эпидермиса и дермы. Для формирования кожных волдырей у добровольцев, можно использовать различные формы отсасывающих устройств [20; 21; 22]. Уртикарная модель использовалась в течение некоторого времени для изучения различных компонентов заживления ран в клинических исследованиях. Параметры заживления включают измерение трансэпидермальной потери воды и определение площади раны.

Krawczyk и Wilgram использовали эту модель для оценки синтеза кератиносом во время заживления эпидермальных ран [23], которые имеют определенные преимущества перед неконтролируемыми состояниями пациентов, поскольку они хорошо стандартизированы и управляемы для широкого спектра клинических исследований острого заживления кожных ран [20]. Уртикарная модель использовалась в качестве инструмента исследования для изучения кинетики заживления, особенно в отношении миграции, пролиферации и дифференциации кератиноцитов при остром заживлении ран [20; 24; 25] и долгосрочного курса регенерации эпидермиса [20, 26]. Кроме того, эта модель была определена как полезный исследовательский инструмент, помогающий выяснить механизмы потенциальной разработки методов лечения кожных заболеваний человека и нарушения заживления, включая хронические язвы [27].

Модель абразивной раны. Другая модель кожной регенерации является более инвазивной. Эта модель заключается в нанесении стандартизированных поверхностных ссадин путем многократного шлифования кожи хирургической щеткой до появления первых признаков лоснящейся кожи и точечного кровотечения [28]. Поскольку эпидермальные клетки относительно слабо прикреплены друг к другу, с помощью этой процедуры можно удалить почти весь эпидермис, оставляя при этом базальную мембрану интактной.

Таким образом, абразивная модель дает глубину раны, сопоставимую с уртикарной моделью. Поскольку базальная мембрана остается неповрежденной, раны заживают без образования рубцов [28]. Этот метод использовался в открытом, рандомизированном сравнительном пилотном исследовании для оценки заживляющих свойств полиуретана, гидроколлоида, гидрогеля и двух стандартных повязок на раны на здоровых добровольцах. Результаты показали, что однородные и идентичные стандартизированные раны могут быть созданы с помощью

абразивной щетки и что этот метод надежно выявляет различия в эффективности перевязочных материалов [29].

Модели ран, вызванных лазерным и микродермальным истиранием. Лазеры, а именно CO₂ и Er:YAG-лазеры, а также устройства для микродермабразии широко используются дерматологами и косметическими хирургами для процедур шлифовки кожи. Оба метода недавно были также внедрены в качестве инструментов исследования ран. Преимущество обоих методов заключается в том, что раны разной глубины можно индуцировать с высокой воспроизводимостью [30]. Ferrag с соавторами [31] использовали Er:YAG-лазер с общей плотностью энергии 15 Дж/см² и длительностью импульса 250 микросекунд, чтобы нанести 19 ран на 1 см². Результатом этой процедуры стало лишь частичное удаление эпидермиса. Трехмерный анализ показал, что лазерные раны были более поверхностными, чем раны при использовании уртикарной модели. Время заживления, однако, было сопоставимым для ран, индуцированных лазером, и уртикарных ран.

Послойные модели раны.

Резанная рана обычно связана с использованием устройства с острым лезвием (например, дерматома), которое наносит разрез параллельно поверхности кожи на определенной глубине. Это позволяет удалить слой эпидермиса / верхней дермы толщиной 100 – 1500 микрон. Остается значительная часть дермы, при этом большая часть производных кожи (сальных и потовых желез, волосяных фолликулов) остается неповрежденной, что особенно важно для определения качества реэпителизации, уровня воспалительного и иммунного ответа [32]. Более раннее исследование демонстрирует, как эта модель использовалась в качестве ценного исследовательского инструмента для оценки влияния возраста на заживление ран у здоровых людей.

Полнослойные модели ран. Эта модель требует полного удаления эпидермиса и дермы на глубину фасциальных тканей или подкожного жира и разрушает кровеносные сосуды дермы. Это можно сделать с помощью ряда устройств для нанесения поражения стандартным способом (пункционная биопсия, скальпель, дерматом, лазер). Эта модель предлагает преимущества заживления с участием всех кожных компонентов и эпителизации по краям раны. Заживление ран предполагает формирование нескольких типов тканей и образование рубцов. Кровотечение и потеря жидкости более обширны в таких моделях, поэтому существует большая восприимчивость к инфекции. Скорость заживления может

быть измерена макроскопически по отношению к общему объему иссечения (или площади поперечного сечения), образованию грануляционной ткани и реэпителизации. Взятие биопсии заживающей ткани позволяет оценить химические и гистологические процессы с точки зрения организации соединительной ткани, ангиогенеза и содержания коллагена или протеогликанов [33].

Перфорационная биопсия ран широко используется в исследованиях заживления ран как на животных моделях, так и в исследованиях на людях-добровольцах. Эти раны полезны с экспериментальной точки зрения, поскольку их размер и глубину можно точно контролировать. Поскольку они включают все компоненты процесса заживления, они представляют собой совершенный инструмент для исследования и использовались для изучения ангиогенеза [34; 35; 36], сокращения и закрытия ран [37; 38]. Эта модель также использовалась для исследования влияния новых методов лечения на заживление ран. Например, было показано, что местный фактор роста, полученный из тромбоцитов, ограничивает роль сокращения раны в закрытии раны и что раны, обработанные PDGF, закрываются за счет реэпителизации и заполнения рубцами [39; 40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разделение физиологических процессов на составные компоненты путем моделирования является одной из важных частей любого исследования. Заживление ран — это сложный процесс. Использование моделей (*in vitro*, *in vivo* – на животных и человеке) позволило провести масштабные исследования в этой области, что значительно улучшило знание механизмов заживления как острых, так и хронических ран кожи. Параллельно с полученными знаниями продолжается разработка новых методов лечения ран и понимание того, как усовершенствовать уход за ними, для достижения наилучших результатов. Хотя модели *in vitro* и модели на животных занимают определенное место в данных исследованиях, безусловно, лучшими моделями являются те, которые основаны на привлечении добровольцев и обеспечивают получение ценной информации о тонких механизмах патогенеза и заживления кожного покрова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matthews R. A. Medical progress depends on animal models – doesn't it? *J R Soc Med.* 2008;101:95–98.
2. Perez R., Davis S. Relevance of animal models for wound healing. *Wounds.* 2008;20:3–8.

3. Шаповалова Е. Ю., Демяшкин Г. А., Маланичев М. Ю., Погосян Д. А., Зорин И. А., Щекин В. И. Моделирование экспериментального сепсиса путем выполнения лигирования и пункции слепой кишки (CLP-процедура). Ульяновский медико-биологический журнал. 2020;3:150–158. doi: 10.34014/2227-1848-2020-3-150-158
4. Wilhelm K., Wilhelm D., Bielfeldt S. Models of wound healing: an emphasis on clinical studies. *Skin Res Technol.* 2017;23:3–12.
5. Gosain A., DiPietro L. Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004;28:321–326.
6. Mathieu D. Role of hyperbaric oxygen therapy in the management of lower extremity wounds. *Int J Low Extrem Wounds* 2006;5:233–235.
7. Winter G. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature.* 1962;193:293–294.
8. Ud Din S., Bayat A. Non animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Rep and Reg.* 2017;25:164–176.
9. Zomer H., Trentin A. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J Dermatol Sci.* 2018;90:3–12.
10. Galiano R., Michaels J., Dobryansky M., Levine J., Gurtner G. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* 2004;12:485–492.
11. Dunn L., Prosser H., Tan J., Vanags L., Ng M., Bursill C. Murine model of wound healing. *J Vis Exp.* 2013;28:e50265.
12. Seaton M., Hocking A., Gibran N. Porcine models of cutaneous wound healing. *ILAR J.* 2015;56:127–138.
13. Sullivan T., Eaglstein W., Davis S., Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.* 2001;9:66–76.
14. Gao Y., Wang X., Chen S., Li S., Liu X. Acute skin barrier disruption with repeated tape stripping: an in vivo model for damage skin barrier. *Skin Res Technol.* 2013;19:162–168.
15. Lademann J., Jacobi U., Surber C., Weigmann H., Fluhr J. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72:317–323.
16. van de Kerkhof P., de Mare S., Arnold W., van Erp P. Epidermal regeneration and occlusion. *Acta Derm Venereol.* 1995;75:6–8.
17. Pereira G., Guterres S., Balducci A., Colombo P., Sonvico F. Polymeric films loaded with vitamin E and aloe vera for topical application in the treatment of burn wounds. *Biomed Res Int.* 2014;641590.
18. Kiistala U. Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis. *J Invest Dermatol.* 1968;50:129–137.
19. Escobar Chávez J., Bonilla Martínez D., Villegas González M., Molina Trinidad E., Casas Alancaster N., Revilla Vázquez A. Microneedles: a valuable physical enhancer to increase transdermal drug delivery. *J Clin Pharmacol.* 2011;51:964–977.
20. Kottner J., Hillmann K., Fimmel S., Seité S., Blume Peytavi U. Characterisation of epidermal regeneration in vivo: a 60 day follow up study. *J Wound Care.* 2013;22:395–400.
21. Smith T., Wilson M., Young A., Montain S. A suction blister model reliably assesses skin barrier restoration and immune response. *J Immunol Methods.* 2015;417:124–130.
22. Alexis A., Wilson D., Todhunter J., Stiller M. Reassessment of the suction blister model of wound healing: introduction of a new higher pressure device. *Int J Dermatol.* 1999;38:613–617.
23. Krawczyk W., Wilgram G. Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing. *J Ultrastruct Res.* 1973;45:93-101.
24. Myers S., Leigh I., Navsaria H. Epidermal repair results from activation of follicular and epidermal progenitor keratinocytes mediated by a growth factor cascade. *Wound Repair Regen.* 2007;15:693–701.
25. Шаповалова Е. Ю., Демяшкин Г. А., Маланичев М. Ю., Погосян Д. А., Щекин В. И. Иммунофенотипическая характеристика пролиферации и апоптоза интактных кератиноцитов при системном воспалении. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2020;10(2):47–51. doi:10.37279/2224-6444-2020-10-2-48-52
26. Evans N., Oreffo R., Healy E., Thurner P., Man Y. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013;28:397–409
27. Martins Green M. The Yin and Yang of integrin function in reepithelialization during wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2:75–80.
28. Wigger Alberti W., Kuhlmann M., Ekanayake S., Wilhelm D. Using a novel wound model to investigate the healing properties of products for superficial wounds. *J Wound Care.* 2009;18:123–131.
29. Wigger Alberti W., Stauss Grabo M., Grigo K., Atiye S., Williams R., Korting H. Efficacy of a tyrothricin containing wound gel in an abrasive wound model for superficial wounds. *Skin Pharmacol Physiol.* 2013;26:52–56.

30. Lee W., Shen S., Kuo Hsien W., Hu C., Fang J. Lasers and microdermabrasion enhance and control topical delivery of vitamin C. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1118–1125.

31. Ferraq Y., Black D., Theunis J., Mordon S. Superficial wounding model for epidermal barrier repair studies: comparison of Erbium: YAG laser and the suction blister method. *Lasers Surg Med.* 2012;44:525–532.

32. Шаповалова Е. Ю., Демьяшкин Г. А., Маланичев М. Ю., Погосян Д. А., Зорин И. А., Щекин В. И. Иммунофенотипическая характеристика макрофагов кожи в условиях экспериментального сепсиса. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2020;10(3):49–53.

33. Park S., Teixeira L., Raghunathan V. Full-thickness splinted skin wound healing models in db/db and heterozygous mice: implications for wound healing impairment. *Wound Repair Regen.* 2014;22:368–380.

34. Brown N., Smyth E., Cross S., Reed M. Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds. *Wound Repair Regen.* 2002;10:245–251.

35. Lockhart A., Braun R., Yu D. A clinical model of dermal wound angiogenesis. *Wound Repair Regen.* 2003;11:306–313.

36. Ud Din S., Sebastian A., Giddings P., Colthurst J., Whiteside S., Morris J., Nuccitelli R., Pullar C., Baguneid M., Bayat A. Angiogenesis is induced and wound size is reduced by electrical stimulation in an acute wound healing model in human skin. *PLoS ONE.* 2015;10:e0124502.

37. de Vries H., Zeegelaar J., Middelkoop E., Gijssbers G., Van M., Wildevuur C., Westerhof W. Reduced wound contraction and scar formation in punch biopsy wounds. Native collagen dermal substitutes. A clinical study. *Br J Dermatol.* 1995;132:690–697.

38. Sørensen L., Toft B., Rygaard J., Ladelund S., Paddon M., James T., Taylor R., Gottrup F. Effect of smoking, smoking cessation, and nicotine patch on wound dimension, vitamin C, and systemic markers of collagen metabolism. *Surgery.* 2010;148:982–990.

39. Ehrlich H., Freedman B. Topical platelet derived growth factor in patients enhances wound closure in the absence of wound contraction. *Cytokines Cell Mol Ther.* 2002;7:85–90.

40. Демьяшкин Г. А., Шаповалова Е. Ю., Маланичев М. Ю., Погосян Д. А., Батов М. А., Зорин И. А., Щекин В. И. Молекулярно-биологическая характеристика промежуточных филаментов кератиноцитов интактной кожи в условиях системного воспаления. *Патологическая физиология и*

экспериментальная терапия. 2020;64(3):34–39. doi:10.25557/0031-2991.2020.03.34-39

REFERENCES

1. Matthews R. A. Medical progress depends on animal models – doesn't it? *J R Soc Med.* 2008;101:95–98.

2. Perez R., Davis S. Relevance of animal models for wound healing. *Wounds.* 2008;20:3–8.

3. Shapovalova E., Demyashkin G., Malanichev M., Pogosyan D., Zorin I., Shchekin V. Modelirovanie eksperimental'nogo sepsisa putem vypolneniya ligirovaniya i punktsii slepoy kishki (CLP-protsedura) [Simulation of experimental sepsis by cecal ligation and puncture (CLP)]. *Ul'yanovskiy medikobiologicheskiy zhurnal.* 2020;3:150–158. (in Russian). doi: 10.34014/2227-1848-2020-3-150-158

4. Wilhelm K., Wilhelm D., Bielfeldt S. Models of wound healing: an emphasis on clinical studies. *Skin Res Technol.* 2017;23:3–12.

5. Gosain A., DiPietro L. Aging and wound healing. *World J Surg.* 2004;28:321–326.

6. Mathieu D. Role of hyperbaric oxygen therapy in the management of lower extremity wounds. *Int J Low Extrem Wounds* 2006;5:233–235.

7. Winter G. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature.* 1962;193:293–294.

8. Ud Din S., Bayat A. Non animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. *Wound Rep and Reg.* 2017;25:164–176.

9. Zomer H., Trentin A. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J Dermatol Sci.* 2018;90:3–12.

10. Galiano R., Michaels J., Dobryansky M., Levine J., Gurtner G. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* 2004;12:485–492.

11. Dunn L., Prosser H., Tan J., Vanags L., Ng M., Bursill C. Murine model of wound healing. *J Vis Exp.* 2013;28:e50265.

12. Seaton M., Hocking A., Gibran N. Porcine models of cutaneous wound healing. *ILAR J.* 2015;56:127–138.

13. Sullivan T., Eaglstein W., Davis S., Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.* 2001;9:66–76.

14. Gao Y., Wang X., Chen S., Li S., Liu X. Acute skin barrier disruption with repeated tape stripping: an in vivo model for damage skin barrier. *Skin Res Technol.* 2013;19:162–168.

15. Lademann J., Jacobi U., Surber C., Weigmann H., Fluhr J. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72:317–323.
16. van de Kerkhof P., de Mare S., Arnold W., van Erp P. Epidermal regeneration and occlusion. *Acta Derm Venereol.* 1995;75:6–8.
17. Pereira G., Guterres S., Balducci A., Colombo P., Sonvico F. Polymeric films loaded with vitamin E and aloe vera for topical application in the treatment of burn wounds. *Biomed Res Int.* 2014;641590.
18. Kiistala U. Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis. *J Invest Dermatol.* 1968;50:129–137.
19. Escobar Chávez J., Bonilla Martínez D., Villegas González M., Molina Trinidad E., Casas Alancaster N., Revilla Vázquez A. Microneedles: a valuable physical enhancer to increase transdermal drug delivery. *J Clin Pharmacol.* 2011;51:964–977.
20. Kottner J., Hillmann K., Fimmel S., Seité S., Blume Peytavi U. Characterisation of epidermal regeneration in vivo: a 60 day follow up study. *J Wound Care.* 2013;22:395–400.
21. Smith T., Wilson M., Young A., Montain S. A suction blister model reliably assesses skin barrier restoration and immune response. *J Immunol Methods.* 2015;417:124–130.
22. Alexis A., Wilson D., Todhunter J., Stiller M. Reassessment of the suction blister model of wound healing: introduction of a new higher pressure device. *Int J Dermatol.* 1999;38:613–617.
23. Krawczyk W., Wilgram G. Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing. *J Ultrastruct Res.* 1973;45:93–101.
24. Myers S., Leigh I., Navsaria H. Epidermal repair results from activation of follicular and epidermal progenitor keratinocytes mediated by a growth factor cascade. *Wound Repair Regen.* 2007;15:693–701.
25. Shapovalova E., Demyashkin G., Malanichev M., Pogosyan D., Shchekin V. Immunophenotypic characteristics of proliferation and apoptosis of intact keratinocytes in systemic inflammation. *Crimea Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2020;10(2):47–51. (In Russ) doi:10.37279/2224-6444-2020-10-2-48-52
26. Evans N., Oreffo R., Healy E., Thurner P., Man Y. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013;28:397–409
27. Martins Green M. The Yin and Yang of integrin function in re epithelialization during wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2:75–80.
28. Wigger Alberti W., Kuhlmann M., Ekanayake S., Wilhelm D. Using a novel wound model to investigate the healing properties of products for superficial wounds. *J Wound Care.* 2009;18:123–131.
29. Wigger Alberti W., Stauss Grabo M., Grigo K., Atiye S., Williams R., Korting H. Efficacy of a tyrothricin containing wound gel in an abrasive wound model for superficial wounds. *Skin Pharmacol Physiol.* 2013;26:52–56.
30. Lee W., Shen S., Kuo Hsien W., Hu C., Fang J. Lasers and microdermabrasion enhance and control topical delivery of vitamin C. *J Invest Dermatol.* 2003;121:1118–1125.
31. Ferraq Y., Black D., Theunis J., Mordon S. Superficial wounding model for epidermal barrier repair studies: comparison of Erbium: YAG laser and the suction blister method. *Lasers Surg Med.* 2012;44:525–532.
32. Shapovalova E., Demyashkin G., Malanichev M., Pogosyan D., Zorin I., Shchekin V. Immunophenotypic characteristics of skin macrophages in experimental sepsis. *Crimea Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2020;10(3):49–53. (In Russ)
33. Park S., Teixeira L., Raghunathan V. Full-thickness splinted skin wound healing models in db/db and heterozygous mice: implications for wound healing impairment. *Wound Repair Regen.* 2014;22:368–380.
34. Brown N., Smyth E., Cross S., Reed M. Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds. *Wound Repair Regen.* 2002;10:245–251.
35. Lockhart A., Braun R., Yu D. A clinical model of dermal wound angiogenesis. *Wound Repair Regen.* 2003;11:306–313.
36. Ud Din S., Sebastian A., Giddings P., Colthurst J., Whiteside S., Morris J., Nuccitelli R., Pullar C., Baguneid M., Bayat A. Angiogenesis is induced and wound size is reduced by electrical stimulation in an acute wound healing model in human skin. *PLoS ONE.* 2015;10:e0124502.
37. de Vries H., Zeegelaar J., Middelkoop E., Gijssbers G., Van M., Wildevuur C., Westerhof W. Reduced wound contraction and scar formation in punch biopsy wounds. Native collagen dermal substitutes. A clinical study. *Br J Dermatol.* 1995;132:690–697.
38. Sørensen L., Toft B., Rygaard J., Ladelund S., Paddon M., James T., Taylor R., Gottrup F. Effect of smoking, smoking cessation, and nicotine patch on wound dimension, vitamin C, and systemic markers of collagen metabolism. *Surgery.* 2010;148:982–990.
39. Ehrlich H., Freedman B. Topical platelet derived growth factor in patients enhances wound closure in the absence of wound contraction. *Cytokines Cell Mol Ther.* 2002;7:85–90.

40. Demyashkin G., Shapovalova E., Malanichev M., Pogosyan D., Batov M., Zorin I., Shchekin V. Molecular and biological characteristics of keratin intermediate filaments in intact skin under systemic inflammation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(3): 34-39. (in Russ.). doi:10.25557/0031-2991.2020.03.34-39

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДИКИ В ЛЕЧЕНИИ И РЕАБИЛИТАЦИИ КОМБИНИРОВАННОГО (ПРОДОЛЬНО-ПОПЕРЕЧНОГО) ПЛОСКОСТОПИЯ

Ачкасов Е. Е., Фролов В. А., Березин В. В.

Кафедра спортивной медицины и медицинской реабилитации ФГАОУ ВО «Первый Московский Государственный Университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет)», 119991, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, Россия

Для корреспонденции: Березин Владимир Владимирович, аспирант кафедры спортивной медицины и медицинской реабилитации, ФГАОУ ВО «Первый Московский Государственный Университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)», e-mail: docberezin79@yandex.ru

For correspondence: Berezin Vladimir V., graduate student, Department of sports medicine and medical rehabilitation, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), e-mail: docberezin79@yandex.ru

Information about authors:

Achkasov E. E., <https://orcid.org/0000-0001-9964-5199>

Frolov V. A., <http://orcid.org/0000-0001-8712-7156>

Berezin V. V., <https://orcid.org/0000-0001-8511-5154>

РЕЗЮМЕ

В статье отражено рассмотрение проблемы лечения комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия и применения различных методов коррекции данной патологии. Рассмотрены основные подходы к лечению комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия, а также проведен краткий обзор экспериментальных исследований и патентных разработок в отношении лечения комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия. Представлен анализ опыта применения различных методов лечения комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия в зарубежной и отечественной практике, выделены проблемные аспекты борьбы с рассматриваемой патологией. Отмечено, что отдельное применение различных методик лечения комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия имеет недостаточную эффективность и сопровождаются риском повторного развития патологии, при том, что наибольший эффект на ранних стадиях развития комбинированного плоскостопия дает применение комплексного лечения с использованием одновременно и медикаментозного лечения и различных ортопедических методов, и ЛФК, и массажа. Определена необходимость дальнейшего научного поиска в отношении наиболее эффективного сочетания различных методов лечения комбинированного плоскостопия, которое дало бы положительную динамику изменений как в отношении стоп и нижних конечностей в целом, так и в отношении всего опорно-двигательного аппарата. Обоснована необходимость рассматривать опорно-двигательный аппарат и стопы как единый механизм, кинематическую цепь, обладающую степенями свободы (подвижность и деформируемость в суставе), в которых происходит передача реактивных или отраженных сил в связующих звеньях цепи.

Ключевые слова: комбинированное (продольно-поперечное) плоскостопие, симптом, патология, метод лечения, опорно-двигательный аппарат, кинематическая цепь.

BASIC APPROACHES AND USED METHODS IN THE TREATMENT OF COMBINED (LONGITUDINAL-TRANSVERSE) PLATFOOT

Achkasov E. E., Frolov V. A., Berezin V. V.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia.

SUMMARY

The article reflects the consideration of the problem of treatment of combined (longitudinal-transverse) flat feet and the use of various methods of correction of this pathology. The main approaches to the treatment of combined (longitudinal-transverse) flat feet are considered and a brief review of experimental studies and patent developments in relation to the treatment of combined (longitudinal-transverse) flat feet. The analysis of the experience of using various treatment methods for combined (longitudinal-transverse) flat feet in foreign and domestic practice is presented, problematic aspects of the fight against the pathology under consideration are highlighted. It is noted that the separate use of various treatment methods for combined (longitudinal-transverse) flatfoot has insufficient effectiveness and is associated with the risk of re-development of pathology, while the greatest effect in the early stages of the development of combined flatfoot gives the use of complex treatment, using both medication and various orthopedic methods, exercise therapy, and massage. The need for further scientific research in relation to the most effective combination of different treatment methods for combined flat feet was determined, which would give a positive dynamics of changes both in relation to the feet and lower extremities in general, and in relation to the entire musculoskeletal system. The necessity of considering the musculoskeletal system and the feet as a single mechanism, a kinematic chain with

degrees of freedom (mobility and deformability in the joint), in which the transfer of reactive or reflected forces in the linking chain of the chain.

Key words: combined (longitudinal-transverse) flat feet, treatment method, musculoskeletal system, kinematic chain.

Плоскостопие представляет собой врожденную или приобретенную ортопедическую патологию, связанную с деформацией стопы, при которой происходит понижение (уплощение) ее свода. При комбинированном (продольно-поперечном) плоскостопии происходит одновременно поражение поперечного и продольного свода стопы – подошва стопы полностью опирается на землю, а передняя часть ступни сильно расширяется.

Данный вид плоскостопия отличается от других тем, что полностью теряются амортизирующие свойства стопы. Комбинированное (продольно-поперечное) плоскостопие чаще всего развивается постепенно и на обеих конечностях. Гораздо реже встречается ситуация одностороннего поражения стопы, как следствие травмы [1].

Происходящие изменения анатомии стоп ведут к нарушению походки человека, которая становится неуклюжей с сильным разведением в стороны носков. Кроме этого, плоскостопие, которое относится к прогрессирующим заболеваниям, ведет к изменению нагрузки на весь опорно-двигательный аппарат человека, отрицательно влияя на его общее состояние здоровья и выражаясь в болевых ощущениях, нервозности, рассеянности, чрезмерной утомляемости, головных болях и др.

Главная опасность комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия состоит в том, что стопа перестает выполнять амортизационную функцию, что может привести к болезням позвоночника (сколиоз, грыжи, остеохондроз), артрозам, неврологическим расстройствам, гнойным повреждениям стопы, варикозному расширению вен и болезненному сокращению мышц нижних конечностей. Все эти проявления возникают вследствие перераспределения нагрузки со стопы на суставы (тазобедренный, коленный) и позвоночник, которые не приспособлены к подобным нагрузкам и начинают страдать от этого. Поэтому актуальным выглядит поиск наиболее эффективных методов лечения комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия, оказывающего негативное влияние на весь опорно-двигательный аппарат человека.

Обзор основных подходов к лечению комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия

На сегодняшний день существуют различные способы лечения комбинированного (про-

дольно-поперечного) плоскостопия. При этом назначение лечения предполагает проведение тщательных предварительных диагностических мероприятий с целью выявления причин и стадии заболевания, а также недопущения рецидивирования.

На ранней стадии протекания заболевания применяется консервативное лечение: лекарственные препараты, физиотерапия и лечебно-гимнастические упражнения для коррекции неправильной установки стопы. Препараты помогают снять боль и воспалительные процессы, гимнастика и процедуры укрепляют мышцы и связки, восстанавливают амортизирующие свойства стопы [2].

Эффективное лечение комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия лекарственными средствами, как и другими консервативными методами, возможно на начальных этапах заболевания. Для этого используются препараты местного значения из нескольких фармацевтических групп: анальгетики (обезболивающие); противовоспалительные (НПВС, глюкокортикоиды); хондропротекторы, витамины; лекарства общего воздействия для улучшения кровообращения.

На данном этапе высокую эффективность показывают аптечные средства на основе использования натуральных компонентов, а также народные средства [3].

При прогрессировании болезни переходят на пероральные и инъекционные системные препараты. Для полного исчезновения симптомов комбинированного плоскостопия проводят лечение с помощью физиопроцедур на основе применения лазера, ультразвука, ударно-волновой терапии, лечебных грязей. При более серьезных патологических изменениях курс коррекции дополняется сеансами остеопатии и рефлексотерапии. Применение физиотерапевтических процедур помогает снять отек и воспаление в области подошвы, а противовоспалительные мази и обезболивающие средства не только облегчают состояние, но и помогают справиться с осложнениями в виде бурситов и артрозов [4].

Одним из основных видов консервативного лечения является применение различных видов ортопедических средств, прежде всего, стелек, представляющих собой вкладыши под переднюю часть стопы, задники, стельки с супинатором под пяткой и пронататором в переднем отделе.

Ортопедические стельки учитывают строение стопы и еще ряд дополнительных факторов. Результатом использования ортопедических стелек являются следующие позитивные изменения у больного: нагрузки на ноги становятся меньше; стопы меньше устают; суставы больше не деформируются; улучшаются амортизирующие действия на стопу; уменьшается нагрузка на позвоночник [5].

По мере привыкания мышц и связок к ортопедическим стелькам у пациента нормализуется распределение нагрузок на подошву. При развитии *hallux valgus* дополнительно используются различные виды корректоров и фиксаторов, шины (ночные, дневные).

Важным аспектом лечения является ношение специальной ортопедической обуви, позволяющей поддерживать физиологический свод стопы. Специальная обувь производится по строгим требованиям: из натуральных материалов высокого качества (кожа, замша, нубук), с гибкой (часто резиновой) подошвой и низким каблуком (до 3-4 см). В настоящее время ортопедическая обувь выпускается в разных стилях, фасонах и моделях, но при ее использовании существуют ряд обязательных требований:

1. размер обуви должен обязательно соответствовать размеру ноги пациента, иначе возможно отсутствие лечебного эффекта, а плоскостопие трансформируется в следующую степень;
2. обязательна фиксация стопы с помощью жесткого задника [6].

Применение различных ортопедических средств при лечении комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия позволяет устранить болезненные симптомы, снизить нагрузку на опорно-двигательный аппарат, предотвратить дальнейшую деформацию стопы, избежать более серьезных проблем с суставами и позвоночником.

Лечение двухстороннего комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия возможно с применением массажа стоп. Массировать следует начиная с пальцев, постепенно переходя на плюсны и далее передвигаясь к таранным суставам. Массаж стопы помогает восстановить иннервацию и нормализовать кровоснабжение [7].

Например, С. В. Сиротиним описана авторская методика профилактики и лечения плоскостопия на основе применения массажа. Согласно предложенному подходу, проводят разогревающий массаж тыльной стороны стопы, разминание мышц, формирующих продольный свод стопы, причем более интенсивное воздействие оказывают на более ослабленные мышцы. Разминание

мышц производят в несколько сеансов до восстановления рессорной функции стопы [8].

Вместе с тем, данный метод не предполагает постоянную компенсацию плоскостопия. Экспериментальное исследование было выполнено на небольшом количестве испытуемых (до 10 человек), что не показывает его достаточной валидности. Кроме этого, метод не учитывает коррекции биомеханических нарушений на уровне грудно-поясничного отдела (перехода) позвоночника.

В ходе лечения комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия также рекомендовано регулярно использовать упражнения лечебной физкультуры (ЛФК), что может дать значительный эффект на первоначальной стадии заболевания [9].

При 3-ей степени деформации стопы уже возможно только хирургическое вмешательство. К нему прибегают в случае невозможности снять болевой синдром консервативными методами лечения, поскольку он является следствием сдавления нервных волокон, а также при неэффективности других методов [10].

Краткий обзор экспериментальных исследований и патентных разработок в отношении лечения комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия показал следующее.

Эффективным на ранних стадиях комбинированного (продольно-поперечного) плоскостопия выглядит применение комплексного подхода в лечении.

Так, А. В. Гуровым в рамках диссертационного исследования [11] был проведен эксперимент по комплексной реабилитации при комбинированном плоскостопии 1-ой, 2-ой и 3-ей стадии и патологии опорно-двигательного аппарата. В выборке было представлено 333 человека в возрасте 18-60 лет (163 мужчин, 170 женщин). Из них 68 человек являлись действующими спортсменами в возрасте 18-30 лет и еще 83 человека в возрасте 31-60 лет были ветеранами спорта.

В ходе лечения применялся усовершенствованный автором комплекс физических упражнений, разработанный специалистами ЦИТО М. Б. Цыкуновым и А. Ф. Каптелиным. Кроме этого, использовались индивидуально конструируемые стельки, изготовленные на основе компьютерной плантограммы и гипсового слепка стопы с использованием методики компенсаторного моделирования также использовался и массаж, специфический для различных групп испытуемых, исходя из тяжести заболевания.

В ходе экспериментального исследования была установлена эффективность применяемых методов: у 30% исследуемых с 1-ой степенью развития патологии была достигнута максимальная степень коррекции, у 70% был достиг-

нут профилактический эффект: отсутствовала прогрессия патологии, уменьшились болевые эффекты. Кроме этого, по результатам опроса обследуемых у них повысилась оценка качества жизни.

На 3-ей стадии заболевания применение комплексной методики практически не дало позитивных результатов, что объясняется сложностью клинической ситуации. Таким образом, следует полагать, что применение комплексного подхода в лечении комбинированного плоскостопия показывает наибольшую эффективность на ранних стадиях заболевания.

В другом исследовании П. А. Поповым [12] при восстановительном лечении плоскостопия у лиц, занимающихся спортом, использованы традиционные методики в сочетании с гравитационной терапией и разработанным автором специальным устройством, оказывающим корригирующее и физиотерапевтическое действие.

В зарубежной практике при неоперативном лечении взрослой приобретенной комбинированной плоскостопии также находят применение специальные ортопедические конструкции [13; 14].

Важно отметить, что с точки зрения биомеханики, двигательная функция организма включает в себя: пассивную часть (скелет) и активную часть (поперечнополосатую мускулатуру, сухожилия, фасции, суставы).

Перечисленные структуры образуют кинематические цепи, обладающие степенями свободы (подвижность и деформируемость в суставе), в которых происходит передача реактивных или отраженных сил в связующих звеньях цепи. Это доказывает взаимосвязь всех частей опорно-двигательного аппарата, а также возникновение структуральных нарушений на каком-либо уровне (звенье) цепи, приводящих к патологии.

Поэтому следует полагать, что воздействием на основные звенья кинематической цепи можно добиться эффективного восстановления функций органов и систем, вовлеченных в патогенез этих расстройств. Исходя из темы данного исследования, важным выглядит поиск безопасного метода коррекции болевого синдрома грудно-поясничного (перехода) отдела позвоночника, вызванного комбинированным (продольно-поперечным) плоскостопием.

Например, Я. В. Голуб и соавторами [15] был предложен динамический тренажер-корректор анатомических и биомеханических характеристик позвоночника и плечевого пояса для применения в неврологии, ортопедии и восстановительной медицине.

Вместе с тем, предложенный метод недостаточно корректирует патологию в позвоночнике.

Экспериментальная методика была апробирована на малом количестве испытуемых (19 человек). Кроме этого, предложенный динамический тренажер-корректор должен использоваться постоянно в течении дня, что делает его применение обязательным и недостаточно комфортным.

В. Р. Горст было предложено изобретение, которое может быть использовано для тракционной коррекции деформаций позвоночника, снятия болевого синдрома, устранения вертебральных блоков [16]. Вместе с тем, апробация применения данного устройства при комбинированном (продольно-поперечным) плоскостопии и оценка его эффективности на сегодняшний день не осуществлялись.

Проведенный научный поиск показывает, что до сих пор не существует четкого алгоритма купирования болевого синдрома в грудно-поясничном отделе (переходе) позвоночника и коррекции постуральных изменений при восходящей дисфункции как патологии при комбинированном (продольно-поперечном) плоскостопии.

ВЫВОДЫ

1. Главная опасность комбинированного плоскостопия состоит в том, что стопа перестает выполнять амортизационную функцию, что может привести к болезням позвоночника (сколиоз, грыжи, остеохондроз), артрозам, неврологическим расстройствам, гнойным повреждениям стопы, варикозному расширению вен и болезненному сокращению мышц нижних конечностей. Все эти проявления возникают вследствие перераспределения нагрузки со стопы на суставы (тазобедренный, коленный) и позвоночник, которые не приспособлены к подобным нагрузкам и начинают страдать от этого.

2. При 1-ой и 2-ой степенях комбинированного плоскостопия лечение может быть ограничено консервативными методами, включающими процедуры по нормализации биомеханики стопы. Пациентам назначают ношение специальной обуви с ортопедическими стельками, проводят массаж ног, используют лекарственные средства, применяют мази и физиотерапевтические процедуры. При 3-ей степени комбинированного плоскостопия уже возможно только хирургическое вмешательство.

3. На данный момент нет четкого алгоритма купирования болевого синдрома в грудно-поясничном отделе (переходе) позвоночника и коррекции плоскостопия с учетом анатомических и биомеханических нарушений опорно-двигательного аппарата. В научной литературе предлагается фармакотерапия, тракционный метод коррекции позвоночника, массаж стоп с целью профилактики и лечения плоскостопия и др. Но

данные методики являются недостаточно эффективными и сопровождаются риском повторного развития патологии.

4. Следует полагать, что наибольший эффект на ранних стадиях развития комбинированного плоскостопия дает применение комплексного лечения, когда используются одновременно и медикаментозное лечение, и различные ортопедические методы, ЛФК, и массаж. Однако, данные методы лечения и реабилитации имеют ряд негативных последствий, так как обладают кратковременным эффектом и в ряде случаев приводят к рецидивирующему течению патологии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мелихов Я. П. Актуальные вопросы развития плоскостопия и методы его коррекции. *Universum: психология и образование*. 2017;6(36):13-15.

2. Mayich D. J., Novak A., Vena D., Daniels T. R., Brodsky J. W. Gait analysis in orthopedic foot and ankle surgery topical review, part I: principles and uses of gait analysis. *Foot Ankle Int*. 2014;35(1):80-90. doi:10.1177/1071100713508394.

3. Булатов А. А., Емельянов В. Г., Михайлов К. С. Плоско-вальгусная деформация стоп у взрослых (обзор иностранной литературы). *Травматология и ортопедия России*. 2017;23(2):102-114. doi:10.21823/2311-2905-2017-23-2-102-114.

4. Кузьмин В. И. Теоретические и практические аспекты проектирования медицинских технологий качества лечения больных с деформациями стоп у взрослых: дис....док. мед. наук. Москва; 2019.

5. Виндерлих М. Е. Совершенствование лечебно-профилактической помощи детям и подросткам с нарушением опорно-рессорной функции стоп: дис.... канд. мед. наук. Пермь; 2019.

6. Алиев Р. Н. Таранно-ладьевидный артродез в комплексном лечении плосковальгусной деформации стоп: дис.... канд. мед. наук. Москва; 2014.

7. Куропаткина Н. А., Коршунов А. Научно-теоретические основы лечебной физкультуры и кинезиореабилитации: теория и методика современной лечебной физкультуры: монография. Германия: LAP LAMBERT Acad. Publ.; 2017.

8. Патент РФ на изобретение № 2185136 / 20.07.2002. Бюл. №20. Сиротин С. В. Способ профилактики и лечения плоскостопия.

9. Стельмашонок В. А., Владимирова Н. В. Основы реабилитации, физиотерапии, массажа и лечебной физкультуры. Мн.: РИПО; 2015.

10. Процко В. Г. Хирургическое лечение плосковальгусной деформации стоп у взрослых: дис....док. мед. наук. Москва; 2019.

11. Гуров А. В. Восстановление функции стопы при различных видах плоскостопия с помощью индивидуально конструируемых ортезов: дис....канд. биол. наук. Москва; 2009.

12. Попов П. А. Оптимизация комплекса восстановительного лечения плоскостопия у лиц, занимающихся спортом: дис....канд. мед. наук. Самара; 2010.

13. Chan J. Y., Greenfield S. T., Soukup D. S., Do H. T., Deland J. T., Ellis, S. J. Contribution of lateral column lengthening to correction of forefoot abduction in stage IIB acquired flatfoot deformity reconstruction. *Foot Ankle Int*. 2015;36(12):1400-1411. doi: 10.1177/1071100715596607.

14. Charwat-Pessler C. G., Hofstaetter S. G., Jakubek D. E., Trieb K. Interference screw fixation of FDL transfer in the treatment of adult acquired flat foot deformity stage II. *Arch Orthop. Trauma Surg*. 2015;135(10):1369-1378. doi: 10.1007/s00402-015-2295-6.

15. Патент РФ на полезную модель № 104061 / 10.05.11. Бюл. №13. Голуб Я. В., Голуб В. И., Голуб И. В., Голуб Т. П. Динамический тренажер-корректор анатомических и биомеханических характеристик позвоночника и плечевого пояса.

16. Патент РФ на изобретение № 2278653 / 27.06.2006. Бюл. №18. Горст В. Р. Устройство для тракционной коррекции грудного отдела позвоночника.

REFERENCES

1. Melikhov Ya. P. Actual problems of the development of flat feet and methods of its correction. *Universum: Psychology and Education*. 2017;6(36):13-15. (In Russ).

2. Mayich D. J., Novak A., Vena D., Daniels T. R., Brodsky J. W. Gait analysis in orthopedic foot and ankle surgery topical review, part I: principles and uses of gait analysis. *Foot Ankle Int*. 2014;35(1):80-90. doi: 10.1177/1071100713508394.

3. Bulatov A. A., Emelyanov V. G., Mikhailov K. S. Planovalgus foot deformity in adults (review of foreign literature). *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2017;23(2):102-114. doi: 10.21823/2311-2905-2017-23-2-102-114. (In Russ)

4. Kuzmin V. I. Theoretical and practical aspects of designing medical technologies for the quality of treatment of patients with foot deformities in adults: dissertation of the doctor of medical sciences. Moscow; 2019. (In Russ).

5. Vinderlich M. E. Improvement of medical and preventive care for children and adolescents with impaired support-spring function of the feet: dissertation of the candidate of medical sciences. Perm; 2019. (In Russ).
6. Aliev R. N. Talonavicular arthrodesis in complex treatment of planovalgus deformity of the feet: dissertation of the candidate of medical sciences. Moscow; 2014. (In Russ).
7. Kuropatkina N. A., Korshunov A. Scientific and theoretical foundations of physiotherapy exercises and kinesis rehabilitations: theory and methodology of modern exercise therapy: monograph. Germany: LAP LAMBERT Acad. Publ.; 2017. (In Russ).
8. Patent RU for invention № 2185136 / 20.07.2002. Bul. № 20. Sirotin S. V. Method of prevention and treatment of flat feet. (In Russ).
9. Stelmashonok V. A., Vladimirova N. V. Fundamentals of rehabilitation, physiotherapy, massage and exercise therapy. Minsk: RIPO; 2015. (In Russ).
10. Protsko V. G. Surgical treatment of planovalgus deformity of the feet in adults: dissertation of the doctor of medical sciences. Moscow; 2019. (In Russ).
11. Gurov A. V. Restoring the function of the foot in different types of flat feet with the help of individually designed orthoses: dissertation of the candidate of biological sciences. Moscow; 2009. (In Russ).
12. Popov P. A. Optimization of the complex of restorative treatment of flat feet in persons going in for sports: dissertation of the doctor of medical sciences. Samara; 2010. (In Russ).
13. Chan J. Y., Greenfield S. T., Soukup D. S., Do H. T., Deland J. T., Ellis, S. J. Contribution of lateral column lengthening to correction of forefoot abduction in stage IIB acquired flatfoot deformity reconstruction. *Foot Ankle Int.* 2015;36(12):1400-1411. doi: 10.1177/1071100715596607.
14. Charwat-Pessler C. G., Hofstaetter S. G., Jakubek D. E., Trieb K. Interference screw fixation of FDL transfer in the treatment of adult acquired flat foot deformity stage II. *Arch Orthop. Trauma Surg.* 2015;13(10):1369-1378. doi: 10.1007/s00402-015-2295-6.
15. Patent RU for utility model № 104061 / 10.05.11. Bul. № 13. Golub Ya.V., Golub V.I., Golub I.V., Golub T.P. Dynamic simulator-corrector of anatomical and biomechanical characteristics of the spine and shoulder girdle. (In Russ).
16. Patent RU for invention № 2278653 / 27.06.2006. Bul. № 18. Gorst V.R. Device for traction correction of the thoracic spine. (In Russ).

КОРОНАВИРУСЫ (СТРУКТУРА ГЕНОМА, РЕПЛИКАЦИЯ)**Хайтович А. Б.**

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина, 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Хайтович Александр Борисович, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, e-mail: khaytovych@rambler.ru

For correspondence: Aleksandr B. Khaitovich, MD, Professor of the Department of Microbiology, Virusology and Immunology, Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia. E-mail: khaytovych@rambler.ru

Information about author:

Khaitovich A. B., <http://orcid.org/0000-0001-9126-1182>

РЕЗЮМЕ

Обзор, представленный в статье, является продолжением публикации по коронавирусам. В работе рассматриваются современные данные о строении генома и процессе репликации у различных видов коронавирусов, вызывающих заболевания у людей и имеющих медицинское значение. Представлена структура геномов коронавирусов и функции генов, которые кодируют структуру вирусных частиц; описывается функция структурных генов и вспомогательных генов; показана роль генов, кодирующих неструктурные белки в структуре вирусной частицы и репликации коронавирусов. Анализ опубликованных исследований позволил сравнительно характеризовать геномы особо опасных коронавирусов: SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, описать их отличия в структуре и в процессе репликации. В обзоре анализируется строение генома и процесс репликации коронавирусов на молекулярном уровне с учетом особенностей у разных видов коронавирусов. Для анализа генетических структур и репликации коронавирусов использованы современные литературные источники, статьи в ведущих мировых медицинских и биологических журналах.

Ключевые слова: коронавирус, строение генома, стадии репликации, S-белок.

CORONAVIRUS (GENOME STRUCTURE, REPLICATION)**Khaitovich A. B.**

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

The overview presented in the article is a continuation of the publication on coronaviruses. The paper examines modern data on the structure of the genome and the replication process in various types of coronaviruses that cause diseases in humans and are of medical importance. The structure of the genomes of coronaviruses and the functions of genes that encode the structure of viral particles are presented; describes the function of structural genes and auxiliary genes; the role of genes encoding non-structural proteins in the structure of the viral particle and replication of coronaviruses is shown. The analysis of published studies made it possible to comparatively characterize the genomes of highly dangerous coronaviruses: SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, describe their differences in structure and in the process of replication. The review analyzes the structure of the genome and the replication process of coronaviruses at the molecular level, taking into account the characteristics of different types of coronaviruses. To analyze the genetic structures and replication of coronaviruses, modern literary sources, articles in the world's leading medical and biological journals were used.

Key words: coronavirus, genome structure, replication stages, S-protein.

Структура и процесс репликации детерминированы генами вируса, которые имеют некоторые отличия у разных видов и определяют процесс изменчивости коронавирусов (*HCoV*).

Структура геномов у коронавирусов

В центре вириона в спиралевидной форме находится РНК (рибонуклеиновая кислота), которая обладает информационной и наследственной функциями. Строение РНК у коронавирусов обычное, по химическому строению является рибонуклеиновой кислотой, в которой каждый

нуклеотид состоит из остатка фосфорной кислоты, рибозы и азотистых оснований: аденин (А), гуанин (Г), урацил (У), цитозин (Ц) или в латинской транскрипции как А, G, U, C, соответственно. Геном *HCoV* самый крупный среди РНК-вирусов и представляет одноцепочечную плюс РНК с содержанием G + C от 32% до 43% [1; 2]. У разных видов *HCoV* размер генома колеблется от 26,4 до 31,7 тысяч п.н. (пар нуклеотидов), при этом у *SARS-CoV* составляет 27,9 кб., *SARS-CoV-2* - 29,9 кб., *MERS-CoV* - 30,1 кб.

Геном не сегментирован, в отличие от вируса гриппа, поэтому обладает меньшей предрасположенностью к изменчивости при репликации и образовании новых вирусных частиц. Строение генома *HCoV* сложное и состоит из фрагментов РНК – генов, которые кодируют структурные белки, неструктурные белки (NSP) и вспомогательные гены (ORF) [2]. В структуре генома *HCoV* выделяются гены, кодирующие 29 белков, которые выполняют различные задачи от создания копий вируса и до подавления иммунных реакций инфицированного организма. Геном содержит 2 основные и длинные рамки считывания (ORF), занимающие около 70%, регулирующие процесс репликации и кодирующие полипротеины (структурные белки S, E, M, N, HE) и вспомогательные гены (ORF 1a, 1b, 3a, 6, 7a, 7b, 8 и 10) (рис. 1) [3 - 7]. Геномная РНК, имеющая 5'-кэп и поли-(А)-хвост на 3'-конце, содержит множество ORF. Гены расположены в следующем порядке: 5'-репликаза-S-E-M-N-3' с большим числом маленьких по размеру РНК – ORF (кодирующие вспомогательные белки), которые расположены между структурными генами [5]. Ген, кодирующий структурный HE-белок (гемагглютинин-эстераза), присутствует только у двух видов *HCoV-OC43* и *HCoV-HKU1*, а структурными генами, кодирующие другие структурные белки, обладают все виды *HCoV*, играющие роль в патологии человека [4].

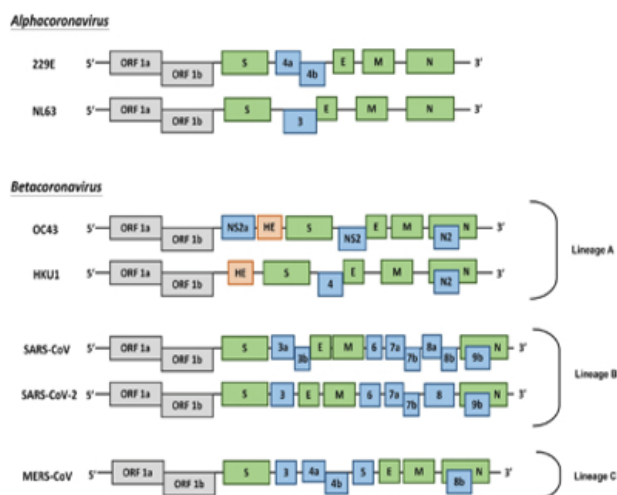


Рис. 1. Рисунок 1. Геномная организация *HCoV* [4]. Условные обозначения:

1. Принципиальная схема семи известных *HCoV* показана без масштаба. 2. Гены, кодирующие структурные белки спайк (S), оболочку (E), мембрану (M) и нуклеокапсид (N), выделены зеленым цветом. 3. Ген, кодирующий гемагглютинин-эстеразу (HE) в линии А бета-коронавирусов, находится в оранжевом цвете. 4. Гены, кодирующие вспомогательные белки, выделены синим цветом.

В геноме *HCoV* присутствуют гены, которые определяют структуру и репликацию вируса. Ген репликазы / транскриптазы (ген 1) кодирует процесс репликации вирусных частиц; ген S (ген 2) кодирует спайковый S-белок, координирующий сборку и высвобождение вириона, а также ответственный за адгезию; ген оболочки (ген 4) кодирует оболочечный E-белок; ген мембраны (ген 5) кодирует мембранный M-белок; ген нуклеокапсида (ген 9) кодирует нуклеокапсид N-белок, внутри которого находится одноцепочечная плюс РНК генома (ssRNA) в спиралевидной форме, которая обладает наиболее консервативными свойствами [8]. Последовательность «тела» генома SARS-CoV-2 фланкирована «лидерной» последовательностью длиной 72 нуклеотида на 5'-конце и поли (А) хвостом на 3'-конце [3]. Репликаза коронавируса кодируется двумя большими перекрывающимися ORF (ORF 1a и ORF 1b), занимает около двух третей генома и напрямую транслируется из геномной РНК. Тем не менее, структурные и вспомогательные гены транслируются из субгеномных РНК (sg-РНК), которые синтезируются во время транскрипции/репликации генома [5].

Ключевую функциональную роль у *HCoV* выполняет структурный S-белок, который формирует внешний слой *HCoV* и защищает РНК, который находится внутри вирусной частицы. S-протеины образуют крупные коронаподобные шипы на поверхности вируса, определяющие название таксономической группы вирусов – коронавирусы. Выявлена особенность в строении S-белка, находящегося на поверхности вирусной частицы, часть которого может расширяться и присоединяться к белкам клетки хозяина. Каждый вид *HCoV* обладает специфичностью и органотропностью: рецепторы вируса взаимодействуют со специфическими рецепторами клеток-хозяина разных органов и тканей организма; формирует механизм внедрения вируса в клетку и дальнейшую репликацию; определяет особенности развития патологических процессов и клинических проявлений коронавирусных инфекций; является точкой приложения для действия лекарственных противовирусных препаратов [1; 2; 6; 9].

S-белок у *HCoV* по химической структуре – это тримерный остроконечный спайк-гликопротеин, состоящий из 1255 аминокислот в длину [9; 10], и субъединиц S1 (от англ. bulb – луковица) и S2 (от англ. stalk – стебель) в каждом спайк-мономере на оболочке, для связывания с клеточными рецепторами. Белок S находится на поверхности *HCoV* и функционально субъединицы предназначены: S1 – для связывания с рецептором состоит из рецептор-связывающего

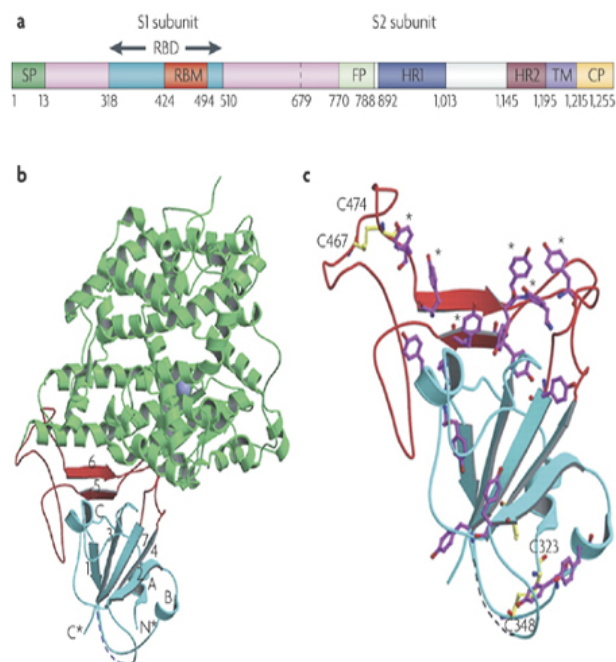


Рисунок 2. Структура S-белка SARS-CoV-2 и его комплекс с рецептором ACE2 [10, 11, 12]

Условные обозначения:

а. Общая топология спайкового мономера SARS-CoV-2. FP (пептид слияния); HR1 (гептадный повтор 1); HR2 (гептадный повтор 2); IC (внутриклеточный домен); NTD (N-терминальный домен); SD1 (поддомен 1); SD2 (поддомен 2); TM (трансмембранный регион).

б. Последовательность и вторичные структуры RBD SARS-CoV-2 (последовательность RBM показана красным).

с. Общая структура RBD SARS-CoV-2, привязанного к ACE2 (показано зеленым цветом); ядро RBD (показано голубым); RBM (показано красным). Дисульфидные связи в RBD показаны в виде палочек и обозначены стрелками. N-концевая спираль ACE2, ответственная за связывание, помечена.

домена (receptor binding domain – RBD) и S2 – для слияния мембран состоит из мембрано-связывающего домена (membrane binding domain – MBD) (рис. 2) [8; 10; 11; 12].

Субъединица S1 химически – аминоконцевой домен с 200 аминокислотами (aa), в пределах которого находится область непосредственного контакта – рецептор-связывающий мотив (receptor binding motif – RBM) и включает два независимых домена: N-терминальный домен (N-terminal domain – NTD) и C-терминальный домен (C-domain – CD). Домен CD RBD S-белка *HCoV* распознает в качестве конкретного для каждого вида *HCoV* специфический рецептор клетки-хозяина, который является основной мишенью для вируснейтрализующих антител [8; 10].

Субъединица S2 химически обладает карбокси-концевыми связями и структура состоит из набора белков: пептид слияния (fusion peptide – FP); гептадный повтор 1 (heptad repeat 1 – HR1); гептадный повтор 2 (heptad repeat 2 – HR2); трансмембранный домен (transmembrane domain – TM); центральная спираль (central helix – CH); коннекторный домен (connector domain – CD); цитоплазматический хвост (cytoplasmic tail – CT) [8; 10].

Аминокислотный состав белка S включает сигнальный пептид (аминокислоты 1–12), расположенные на N-конце; внеклеточный домен (аминокислоты 13–1195), трансмембранный домен (аминокислоты 1196–1215) и внутриклеточный домен (аминокислоты 1216–1255) [9; 10; 13].

Среди белков *HCoV*, по величине белковой молекулы, S-гликопротеин меньше только неструктурного белка (NSP) репликазы 3 (NSP3), который является крупнейшим белком, продуцируемым во время коронавирусных инфекций. Доменная организация группирует S-белок у *HCoV* с другими вирусными белками класса I, такими как вирус гриппа – гемагглютинин (HA), ВИЧ-1 – оболочечный белок (Env), вирус Эбола – гликопротеин 2 (Gp2), *HCoV* – рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка, которые считаются основной детерминантой диапазона хозяев. Функционально S-белок и RBD является ведущим фактором в определении диапазона хозяев у всех видов *HCoV* [8; 14]. Кроме того, белок S играет ключевую роль в индукции ответов нейтрализующих антител, T-клеток и в защитном иммунитете при заражении *SARS-CoV* [10].

Кроме S-белка, определенную роль в структуре и репликации *HCoV* принадлежит и другим структурным белкам, которые контролируются структурными генами. E-белок – оболочечный, помогает сформировать маслянистый пузырек вируса и выполняет функции, находясь уже внутри инфицированной клетки, где протеин соединяется с белками, помогающими включать/выключать гены и активно изменять паттерн активации собственных генов человека. M-белок – мембранный, является частью внешней оболочки вируса. N-белок – протеин нуклеокапсида, защищает РНК-вирус, сохраняя его в устойчивом состоянии внутри вирусной оболочки, при этом большое количество белков соединяются друг с другом в длинную спираль, обертываясь и наматываясь на РНК [1; 15].

В геноме РНК-вируса, кроме структурных генов, находятся вспомогательные гены, которые кодируют 9 рамок считывания [2]: ORF1ab – цепочка белков, создаваемая внутри зараженной клетки, представляет собой цепь из 16

объединенных вместе белков, два из которых действуют как ножницы, разрывая связи между различными протеинами, предназначение других белков пока неизвестна; ORF 3a – группа «вспомогательных белков», которые помогают изменить среду внутри зараженной клетки, облегчают репликацию вируса, при этом протеин пробивает отверстие в мембране зараженной клетки и создает условия для выхода новых вирусов из нее, запуская процесс воспаления, один из наиболее опасных симптомов COVID-19 (от англ. – coronavirus disease – 2019); ORF 3b – белки, которые частично накладываются на ту же область РНК, но пока не изучено использует ли *SARS-CoV-2* этот ген; ORF 6 – вспомогательный белок блокирует сигналы, посылаемые инфицированной клеткой иммунной системе, в частности, специфические внутриклеточные противовирусные белки, на которые нацелены, в том числе, такие вирусы как полиомиелит и грипп; ORF 7a – белок, сокращающий количество тетерина (мембранный белок, фактор рестрикции – ингибитор вирусных инфекций), создает благоприятные условия большему количеству новых вирусов выйти и вызывать самоубийство инфицированных клеток, повреждая при этом клетки и ткани органов организма; ORF 7a и ORF 7b – белки, накладываются на одинаковые участки РНК, но функция их неизвестна; ORF8 – вспомогательный белок, различается у разных HCoV, но функция неизвестна; ORF 9b и ORF 9c – вспомогательные белки накладываются на те же участки РНК; ORF 9b – вспомогательный белок, который блокирует интерферон – ключевую молекулу противовирусной защиты; ORF 9c – функция белка неизвестна; ORF 10 – вспомогательный белок небольшого размера и функция его не изучена [4].

После процессинга полипротеина образуется 16 неструктурных белков (NSP), которые образуют репликативный комплекс: NSP1 – белок замедляет выработку собственных белков инфицированной клеткой, заставляя клетку работать на вирус и производить больше вирусных белков, одновременно затрудняя ей собирать собственные противовирусные белки, которые могли бы его остановить; NSP2 – белок с неизвестной функцией, возможно, его действие будет понятно, наблюдая за белками, к которым он присоединяется (например, два из них помогают перемещать заполненные молекулами пузырьки, называемые эндосомами, внутри клетки); NSP3 – это крупный белок, у которого две важные задачи: отсечение других вирусных белков, чтобы выполнять свои собственные функции и изменить белки в зараженных клетках (здоровая клетка помечает состарившиеся поврежденные

белки для уничтожения, а HCoV может удалить эти метки, изменить баланс белков и уменьшить способность клетки бороться с вирусом); NSP4 в сочетании с другими белками помогает создавать в инфицированных клетках заполненные жидкостью пузырьки, внутри которых создаются детали для новых копий вируса; NSP5 – белок осуществляет большинство разрезов, с помощью которых другие белки NSP освобождаются для выполнения собственной работы; NSP6 взаимодействует с белками NSP3 и NSP4 для создания вирусных пузырьков-заводов; NSP7 и NSP8 – белки, помощники в копировании, делают большинство разрезов, с помощью которых другие белки NSP освобождаются для выполнения собственной работы; NSP9 – белок проникает по крошечным каналам в ядро зараженной клетки, где находится собственный геном, который контролирует движение молекул в ядро и из него; NSP10 – белок, совместно с белком NSP16, защищают вирус от иммунной системы, что позволяет уничтожать противовирусные белки в человеческих клетках; NSP11 – белок перекрывает часть того же участка РНК, как NSP12, но пока не определена функция малого белка; NSP12 – белок собирает генетические буквы в новые вирусные геномы (противовирусный препарат «Ремдесивир» препятствует работе); NSP13 – белок разматывает скрученную спираль РНК-вируса и позволяет другим белкам прочитать и скопировать информацию; NSP14 – белок вырезает ошибки при копировании, исправляет их и заменяет аминокислоты с неправильной на правильную; NSP15 – белок скрывает вирус от иммунной системы, измельчая обрывки поврежденной вирусной РНК; NSP16 – белок, совместно с NSP10, помогает генам вируса скрываться от белков, разрушающих РНК [2].

Два неструктурных белков NS7b и NS8, влияющих на передачу сигналов иммунного ответа, более консервативны у *SARS-CoV-2*, чем у *SARS-CoV*. Это позволяет сделать предположение о возможных функциональных изменениях инфекционных свойств этих белков во время эволюции вируса [16].

В коронавирусах *SARS-CoV-2*, NSP16 в сочетании с NSP10 метилирует 5'-конец, кодируемый вирусом мРНК, чтобы имитировать клеточные мРНК в присутствии родственного аналога субстрата РНК и донора метила – S-аденозилметионина (SAM). Происходит «обман» клетки хозяина и вирусная РНК считается частью клетки и вирус не вызывает ответную реакцию – иммунная система организма не реагирует на чужеродные включения, при этом наоборот защищает вирус от ограничений врожденного иммунитета хозяина. NSP16 / NSP10

захватывают в результате 2'-О метилирования рибозного сахара первый нуклеотид мРНК *SARS-CoV-2*, после чего наблюдаются конформационные изменения, связанные с субстратом, когда фермент переходит из бинарного в тройное состояние. Кроме того, удаленный (25 Å) лиганд-связывающий сайт, уникальный для *SARS-CoV-2*, может быть нацелен в дополнение плюс РНК и SAM, что указывает на еще одну мишень для противовирусных препаратов [17].

HCoV содержат, по меньшей мере, шесть ORF в своем геноме. Первый, из которых, участок 5'-ORF, ORF 1a (11826–13425 нуклеотидов) и ORF1b (от 7983 до 8157 нуклеотидов) присутствует у разных родов (исключение составляют представители *HCoV* рода *Gammacoronavirus*, обладающие NSP1), кодирующие полимеразу для синтеза РНК и других NSP и продуцирующие два полипептида: pp1a и pp1ab [1].

Геном коронавируса заканчивается фрагментом РНК, который останавливает считывание белков, после чего следует 16 генетических букв повторяющихся последовательностей «aaaaaa-aaaaaaa» [4].

Сравнение геномов *SARS-CoV-2*, *SARS-CoV*; *MERS-CoV* (рис. 1) показало, что они разного размера 29844 п.н., 29751 п.н., 30119 п.н., соответственно. Несмотря на то, что структура белков у них в основном одинакова, при сравнении S-белка шипа на 3'-конце среди *HCoV*, было визуализировано различие: 1273aa, 1493aa и 1270aa в *SARS-CoV-2*, *SARS-CoV*; *MERS-CoV*, соответственно. Генетически *SARS-CoV-2* имеет разное сходство: с *SARS-CoV* (около 79%) и *MERS-CoV* (около 50%) [10].

Расположение белков N, E, M в структуре *SARS-CoV-2* отличается от других представителей *Betacoronavirus*, но изменились, по сравнению с *SARS-CoV* [18; 19].

Наиболее консервативным оказался E-белок, став короче на 1 позицию, в С-концевой части. Белок M, напротив, стал длиннее на 1 аминокислоту и изменился по содержанию гидрофобных аминокислот (лейцина, изолейцина и валина) и серина [20]. Заметные изменения произошли в N-белке, который стал короче на 3 аминокислоты, в нем изменились количественные соотношения между гидрофобными и дикарбоновыми аминокислотами, но это не повлияло на общее количество отрицательных групп в N-белке; при сохранности количества положительно заряженных аминокислот (аргинина, лизина и гистидина), изменения в их соотношении привели к снижению положительного заряда в N-белке, вследствие чего произошло ослабление его связи с РНК и ускорение процессов репликации вирусов. Эти изменения и произошедшие отличия

могут оцениваться как маркер усиления контагиозности и патогенности *SARS-CoV-2* [20].

В N-белке коронавирусов содержание аргинина и лизина практически совпадают. Как и у других представителей *Coronavirinae*, в N-белке *SARS-CoV-2* отсутствует цистеин, что, по-видимому, связано с особенностями укладки геномной РНК в вирион. Крупная молекула по размерам, геномная РНК у *HCoV* не может обойтись без укладки в виде множества налагающихся друг на друга динамичных петлевых фигур. Отсутствие цистеина в структуре N-белка и образование дисульфидных связей служили бы препятствием формирования плотной упаковки рибонуклеопротеина в вирионе при высвобождении его при репликации. В отличие от других структурных белков, запреты в составе гена N-белка на триплеты UGC и UGU, кодирующие цистеин, жестко ограничивают в нем мутации по триптофану, тирозину и фенилаланину; меньшие ограничения проявляются по содержанию серина, аргинина и глицина, кодируемые большим количеством триплетов [20].

Две функционально разные субъединицы в S-белке *SARS-CoV-2* проявляют разные тенденции в изменении их первичной структуры. Длина S-белка увеличилась на 18 аминокислот, и этот прирост приходится на S1 субъединицу. За исключением цистеина, пролина, тирозина и триптофана, большинство аминокислот в нем подверглись существенным изменениям. Особенно следует отметить возрастание доли основных аминокислот (аргинина, лизина и гистидина) при большем снижении числа дикарбоновых аминокислот. В S1 субъединице на 6 остатков возросла доля аргинина при уменьшении на 1 остаток лизина и на 7 остатков – дикарбоновых аминокислот. Результатом этих изменений в количественных соотношениях основных (без учета доли гистидина) и кислых аминокислот S1 субъединица *SARS-CoV-2* получила положительную заряженность, свойственную поверхностным белкам вирусов с высокой контагиозностью (грипп, корь, паротит, краснуха, гепатит А, гепатит Е, ротавирусы). Известно, что положительная полярированность поверхностных белков вирусов служит молекулярным маркером их высокой контагиозности. В субъединице S1 сосредоточены все существенные изменения по содержанию других аминокислот. Выявленные особенности первичной структуры S1 позволяют спрогнозировать отсутствие перекрестного взаимодействия *SARS-CoV-2* с антителами к *SARS-CoV*. В S2 субъединице *SARS-CoV-2* количественное соотношение основных и кислых аминокислот близко к S2 субъединицы *SARS-CoV*, то есть в ней не только сохранилась отрицательная поляр-

ность, а даже усилилась, так как уменьшилась доля аргинина. С учетом меньших изменений в содержании других аминокислот структуру S2 субъединицы следует оценить как более консервативную, чем S1 субъединицы [20].

Не идентичность структуры S-белка *SARS-CoV-2*, по сравнению с *SARS-CoV*, проявляется множеством протяженных вставок в S1 субъединице, что порождает сомнения в естественном происхождении вируса. На природное происхождение вируса (вероятно, рекомбинантное), указывают произошедшие изменения в S-белке *SARS-CoV-2*, в течении длительного времени (несколько десятков лет) от изучения S-белка у *SARS-CoV*. Выявленная особенность генетического кода S-белка *SARS-CoV-2* (как наиболее длинного среди поверхностных белков вирусов), проявляющееся исключением триплетов CGA и CCA, кодирующих, соответственно, аргинин и пролин, отсутствует у *SARS-CoV*. Для

уточнения, какие запреты приходится на каждую субъединицу S-белка *SARS-CoV-2*, выполненный анализ генетического кода обеих субъединиц показал, что у субъединицы S1 в генетическом коде исключены триплеты CCG (пролин), CGC и CGA (аргинин), а у субъединицы S2 – GGG (глицин), TCG (серин), CGG и CGA (аргинин). Выявленные исключения триплетов из генетического кода распространяются на весь S-белок, избирательно на его субъединицы и обеспечивают структурно-функциональную консервативность S-белка. В S-белке *SARS-CoV-2* субъединица S1 подверглась более сильным изменениям, в отличие от субъединицы S2, которая более консервативна, что обусловило реализацию функции формирования эндосомы с включенным в нее вирусом. Для структурных белков E, M, N *SARS-CoV-2* характерна консервативность и установлена роль в упаковке геномной РНК. Функция связана с конформацией первичных и

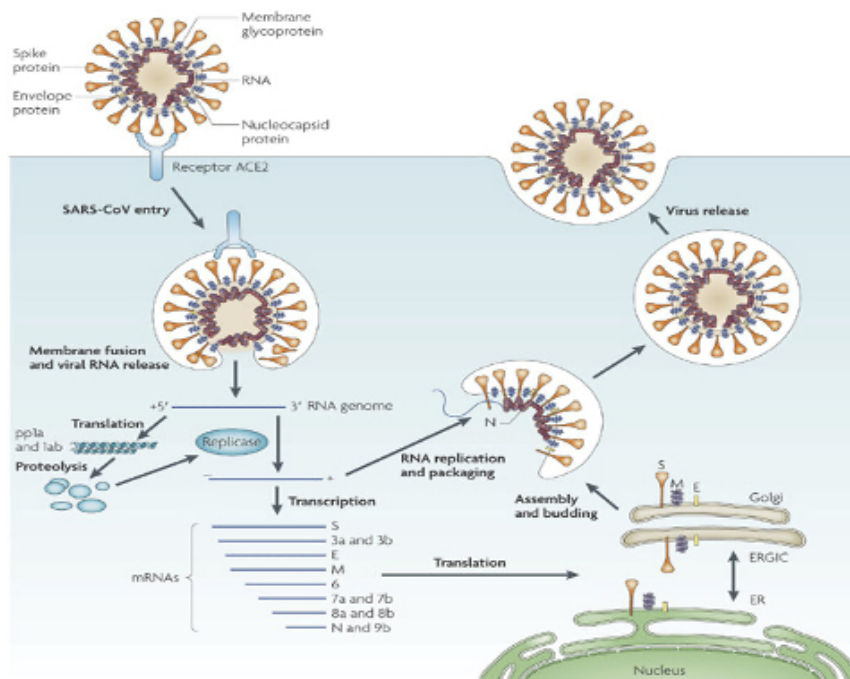


Рисунок 3. Принципиальная схема цикла репликации коронавирусов [10, 25 - 27]

Условные обозначения.

1. SARS-CoV-2 проникает в клетки-мишени через эндосомальный путь. Белок S сначала связывается с клеточным рецептором ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2). В комплексе ACE2-вирус затем транслоцируется в эндосомы, где белок S расщепляется протеазами эндосомных кислот (катепсин L) до активирования ядерной активности.
2. Вирусный геном высвобождается и транслируется в вирусную репликазу. полипротеины pp1a и 1ab, которые затем расщепляются на небольшие продукты вирусными протеиназами.
3. Субгеномные матрицы негативных цепей синтезируются из прерывистой транскрипции на геном плюс-цепь и служат шаблонами для синтеза мРНК. Полнометражный отрицательный шаблон цепи выполнен в качестве шаблона для геномной РНК.
4. Происходит синтез структурных белков.
5. Вирусные нуклеокапсиды собираются из геномной РНК и белка N в цитоплазме с последующим отпочкованием в просвет ERGIC (эндоплазматический ретикулум (ER) - аппарат Гольджи).
6. Вирионы затем высвобождаются из клетки через экзоцитоз.

изменениями во вторичной и третичной структурах, так как для каждого из структурных белков характерно множество синонимических замен в мРНК. Вариации синонимических замен в кодонах изменяют упаковку белков в клетке и, соответственно, свойств вирионов, что проявляется в формообразовании вирионов, изменении характера упаковки генома и топографии иммунных эпитопов [21;22;23]. Проведенные биоинформационные исследования В и Т эпитопов *SARS-CoV* указывают на конкретные области, которые с высокой вероятностью распознаются иммунными реакциями человека, а также на консервативность их как у *SARS-CoV*, так и у *SARS-CoV-2*. Разрабатываемая стратегия вакцинации предназначена для получения иммунного ответа на эти консервативные эпитопные области, которые могут генерировать иммунитет, а не только перекрестно защищать от видов вирусов, входящие в род *Betacoronavirus*. Следует отметить относительную устойчивость этих областей в продолжающейся эволюции вирусов, для чего чрезвычайно важен мониторинг потенциальных последствий генетических событий (мутационных и/или рекомбинантных) в местах нуклеотидных последовательностей, формирующие конкретные области В и Т эпитопов, при передаче вируса в популяции людей [24].

Геном вируса не только кодирует структуры и функцию вирусных частиц *HCoV*, но и репликацию вируса.

Репликация коронавируса

Жизненный цикл репликации у разных видов *HCoV* подобный и его условно можно разделить на 6 этапов: прикрепление и вхождение вируса в соматическую клетку; трансляция вирусной репликазы, транскрипция и репликация генома вируса; трансляция структурных белков вируса; сборка вириона; высвобождение вириона (рис. 3) [10; 25; 26; 27].

1 этап - прикрепление и внедрение в клетку включает: проникновение *HCoV*, которое инициируется связыванием белка S с рецептором клеточной поверхности соматической клетки. Связывание с рецептором является основной детерминантой диапазона хозяина и тканевого тропизма для *HCoV* и происходит эндоцитозом. Белок S находится на поверхности вируса *HCoV* и состоит из двух частей, где субъединица S1 отвечает за первичный контакт с рецептором клетки-хозяина, а субъединица S2 в последующем способствует слиянию с клеточной мембраной и проникновению в клетку, а затем высвобождению нуклеокапсида в цитоплазму [25; 26; 27].

HCoV через рецепторы, являющиеся структурой S-белка, S1 субъединицы RBM RBD, взаимодействуют с рецепторами соматической клет-

ки – ферментами клеточной поверхности, которые разные у видов *HCoV*: аминопептидаза N (от англ. aminopeptidase N – APN) протеолитический фермент, отщепляющий N-концевые остатки аминокислот от пептидов и белков, кластер дифференциации (CD) CD13 – для *HCoV-229E* [5; 28 - 31]; ангиотензинпревращающий фермент 2 (от англ. angiotensin converting enzyme 2 – ACE2) мембранный белок, экзопептидаза, катализирующая превращение ангиотензина I в ангиотензин 1-9 и ангиотензина II в ангиотензин 1-7 – для *HCoV-NL63* [5; 31-33] – для *SARS-CoV*, *SARS-CoV-2* [1; 5; 31; 33; 34]; дипептидилпептидаза 4 (от англ. Dipeptidyl – peptidase 4 – DPP4) мембранный фермент, гидролизующий пептидную связь с C-конца пролина, кластер дифференциации CD26 – для MERS-CoV [5; 35; 36]; 9-О-ацетилированная сиаловая кислота (от англ. 9-O acetylated sialic acid – 9-O-ASC) модификация сиаловой кислоты – О-замещённая производной нейраминовой кислоты – моносахарида с девятиатомной углеродной цепью, которая участвует в распознавании сиалогликанов) = для *HCoV-OC43* и *HCoV-HKU1* [5; 29; 31].

ACE2 является функциональным рецептором *SARS-CoV*, у которого фрагмент белка S из 193 аминокислот (остатки 318-510) связывает ACE2 более эффективно, чем полный домен S1 (остатки 12-672). Фрагменты белка S меньшего размера, экспрессирующие остатки 327-510 или 318-490, не связывали ACE2 заметно. Во время взаимодействия RBD представляет вогнутую поверхность для N-конца рецептора пептидазы, на которой аминокислоты 445–460 RBM закрепляют всю рецептор-связывающую петлю (аминокислоты 424–494 RBD) и создают полный контакт с рецептором ACE2. Среди 14 остатков RBM, которые находятся в прямом контакте с 18 остатками ACE2, шесть представляют собой тирозин, как гидроксильную группу, так и гидрофобное кольцо [10; 37]. Область RBD также содержит несколько остатков цистеина, которые связаны дисульфидными связями [12]. Адаптация S-белка у видов *HCoV* животного происхождения к ACE2 клеток тканей и органов человека облегчается с изменением остатков 479 на аспарагин и 487 на треонин. Это может определять развитие заболеваний у людей, тропизм *SARS-CoV* по диапазону хозяев, при этом любые остатки изменений в этих двух позициях усиливают передачу от животного к человеку или от человека к человеку [10; 38; 39]. Анализ RBM, который является частью RBD, вступающего в контакт с ACE2, показал, что большинство аминокислотных остатков, необходимых для связывания S-белка с ACE2 у *SARS-CoV*, сохранились в S-белке у *SARS-CoV-2* [34], что указывает на

подобные функциональные возможности в развитии инфекционного процесса и у этого вида.

Специфическое взаимодействие между субъединицей S1 и специфическим рецептором вызывает сильное конформационное изменение в субъединице S2, что приводит к слиянию между оболочкой HCoV и клеточной мембраной клетки [10]. Запускает процесс слияния у *SARS-CoV-2* пептид слияния. Однако вначале он должен разрезать S белок в одном из сайтов, но у вируса нет собственных протеинов, и он использует клеточные протеазы, которых существует несколько видов, но не все присутствуют во всех типах клеток. Расщепление белков S1/S2 у *HCoV* опосредуется одной или несколькими протеазами-хозяевами и отличается у различных видов. Белок S у *SARS-CoV* расщепляется на субъединицы S1 и S2 протеазами последовательно: эндосомальной цистеинпротеазой, рН – чувствительной эндосомальной протеазы катепсина L (CTSL) [15; 37; 40], фактором Ха (сериновая пептидаза расщепляется в сайте расщепления Gly-Arg) [41] и трипсиноподобная сериновая протеаза [42, 43]. Сайт расщепления CTSL сопоставляется с T678-M679 в белке S и расщепляет его в геноме *SARS-CoV* выше, а не рядом с пептидом слияния; действие трипсина происходит в R667-S668 [37], и это расщепление требуется для активации мембранного FP белка S после попадания в мишень клетки [13].

У *SARS-CoV-2* одной из наиболее эффективных протеаз является фурин (название от гена FUR – от англ. FES upstream region). Фурин – фермент, сериновая протеаза клеток человека и расщепляет белок в месте спаренных основных аминокислот, расположен в аппарате Гольджи и является одним из самых эффективных ферментов, который находится не только на поверхности клеток, но и внутри. Наличие нового фуринового сайта отличает *SARS-CoV-2* от *SARS-CoV*, что делает первый вид коронавируса опаснее, чем второго [8]. Подобный сайт присутствует и у *MERS-CoV* [44; 45]. S-белок *MERS-CoV* содержит два сайта расщепления для фурина, который является повсеместно экспрессируемой протеазой, при этом один сайт S1/S2 расщепляется во время синтеза S-белка *MERS-CoV*, а другой сайт S2 – во время проникновения вируса [5].

Белок S *HCoV-229E*, *SARS-CoV* и *SARS-CoV-2* участвует в активации трансмембранных сериновых протеаз типа II TMPRSS2 и TMPRSS11D, которые вовлечены в последующие стадии проникновения вируса [5]. Праймирование S белков *HCoV* протеазами клеток-хозяев необходимо для проникновения вируса в клетки и включает расщепление S белка в сайтах S1/S2. Сайт расщепления S1/S2 *SARS-CoV-2* содержит несколько

остатков аргинина (многоосновных), что указывает на высокую способность к расщеплению. S-белки *SARS-CoV* могут использовать эндосомальные цистеиновые протеазы CatB/L для праймирования S белков в клетках TMPRSS2 [40]. Тем не менее, праймирование S белка TMPRSS2 необходимо для проникновения вируса в первичные клетки-мишени и для распространения вируса у инфицированного хозяина [46]. Распространение *SARS-CoV-2* также зависит от активности TMPRSS2. Можно предположить, что фурин-опосредованное расщепление в сайте S1/S2 в инфицированных клетках может способствовать последующему TMPRSS2-зависимому проникновению в клетки-мишени, как и для *MERS-CoV* [44; 45]. TMPRSS2 в качестве фактора клетки-хозяина имеет решающее значение для распространения нескольких клинически значимых вирусов, включая вирусы гриппа А и *HCoV* [46]. Белок S у *HCoV-229E* взаимодействует с валосинсодержащим белком и способствует высвобождению из эндосом [10; 31; 38]. Процесс слияния происходит в кислой среде эндосом, а не на поверхности клетки-хозяина. Субъединица S2 содержит домены HR1 и HR2, которые играют важную роль и участвуют в слиянии *SARS-CoV* с клетками-мишенями. Связывание RBD S1 с рецептором ACE2 запускает конформационное изменение S2 от формы до слияния к форме после слияния, в результате чего в мишень вводится FP (аминокислоты 770–788), клеточная мембрана и ассоциация доменов HR1 и HR2 с образованием шестиспиральной основной структуры [10]. Это приводит к тому, что вирусная оболочка и клеточная мембрана-мишень находятся в непосредственной близости для слияния. Белок S *SARS-CoV* имеет более длинный регион HR1, чем регион HR2. Объединенные шесть спиралей имеют форму стержня (структура с длиной ~70 Å и диаметром ~28 Å), где три спирали HR1 образуют параллель – тримерную спиральную катушку, окруженную тремя спиральюми HR2 [10; 36; 47]. Следовательно, области HR1 и HR2 в доменах S2 участвуют в процессах слияния и проникновения вирусов, и могут быть мишенями для разработки лечебных препаратов и вакцин.

Кроме ACE2, обнаружен еще один рецептор CD147, который тоже тесно связан с инвазией *SARS-CoV-2*, который связывается с вирусом, чтобы опосредовать инфекцию клеток-хозяев [6; 47]. Взаимодействие рецептора *HCoV* с рецепторами клеток хозяина CD147 было доказано при помощи поверхностного плазменного резонанса (SPR), который подтвердил взаимодействие CD147 и RBD S-белка с константой аффинности $1,85 \times 10^{-7}$ M; в анализе иммуно-

преципитации, когда антитело против S-белка и антитела против CD147 использовали для иммобилизации антител, соответственно; иммуноферментный анализ (ELISA конкурентного ингибирования) подтвердил взаимодействие CD147 и S-белка (RBD), указывая на новый потенциальный путь проникновения *SARS-CoV-2* в клетки-хозяева; иммуно-электронная микроскопия, которая показала, что взаимодействие CD147-S-белок усиливает вирусную инвазию для клеток-хозяев. Совместное воздействие CD147 и S-белка облегчало инвазию *SARS-CoV-2* для клеток-хозяев и одновременно указывает на новую мишень для разработки специфических противовирусных лекарственных средств при лечении COVID-19 [48].

Но факторы клетки-хозяина могут ограничивать присоединение и проникновение HCoV в клетку. Интерферон-индуцируемые трансмембранные белки (IFITM) проявляют антивирусные функции широкого спектра у РНК-вирусов [49]. IFITM ограничивает проникновение в клетку *SARS-CoV*, *MERS-CoV*, *HCoV-229E*, *HCoV-NL63*, *SARS-CoV-2* [50]. Напротив *HCoV-OC43* использует IFITM2 или IFITM3 в качестве фактора входа для облегчения проникновения в клетку [51]. Выявлено в IFITM несколько аминокислотных остатков, которые контролируют интенсивность внедрения *HCoV* [52]. Вирус не индуцирует образование интерферона в эпителиальных клетках дыхательных путей человека. Утрачивая способность к индукции синтеза интерферона, *HCoV* может тормозить специфическое вирусопосредованное ингибирование цитоплазматических факторов путем элиминации вирусных макромолекулярных белков внутри мембранных структур, что позволяет *HCoV* реплицироваться в клетках хозяина до инициации иммунного ответа, что приводит к высоким концентрациям вируса в органах. Высокая чувствительность *HCoV* к интерферону указывает на то, что введение интерферона I и III типов до начала инфекции и/или на начальных этапах развития инфекционного процесса, может эффективно снижать уровень репликации вирусных частиц в эпителиальных клетках дыхательных путей. Это указывает на возможность эффективного использования интерферона для профилактики болезни и на ранней стадии заболевания лечения (1-3 день клинических проявлений) [26; 35; 37; 50].

Роль S-белка *HCoV* во взаимодействии с человеческой клеткой определяет роль в развитии патогенеза, возможно произошедшие некоторое время назад мутации, помогло шипам плотно связываться, вирус эволюционировал и смог перейти от рукокрылых на человека [7; 48; 53; 54; 55].

2 этап – трансляция вирусной репликазы.

Нуклеотидная последовательность в геноме вируса осуществляется комплектованием механизмов внутри зараженной клетки, которые считывает аминокислоты на РНК и затем переводит их в белки *HCoV*. Синтез вирусной РНК включает в себя две стадии: на первой (репликация генома) – РНК входного генома реплицируется путем транскрипции матрицы минус-цепи; на второй (субгеномная транскрипция РНК) – субгеномные мРНК транскрибируются и впоследствии используются для трансляции структурных и вспомогательных белков из нижестоящих ORF (от ORF 2 к ORF 9 для *SARS-CoV*), что и приводит к трансляции структурных белков, необходимых для образования вирионов и завершения продуктивного цикла репликации вируса [50].

После проникновения вируса в клетку-хозяина, и снятия с него оболочки, геном транскрибируется (от англ. transcribe – переписывать с помощью транскрипции, что является процессом синтеза РНК в качестве матрицы для переноса генетической информации во вновь образованные РНК). Затем наступает трансляция (от англ. translatio – переносить/перемещать, осуществляется рибосомой процесс синтеза белка из аминокислот на матрице информационной (матричной – мРНК), где реализуется генетическая информация). Репликация и транскрипция генома *HCoV* происходит на цитоплазматических мембранах и включает скоординированные процессы как непрерывного, так и прерывного синтеза РНК, которые опосредуются репликацией вируса, огромного белкового комплекса, кодируемого геном репликазы размером 20 000 п.н. [54]. Репликативный комплекс состоит из 16 вирусных субъединиц и ряда клеточных белков. Помимо РНК-зависимой активности РНК-полимеразы, РНК-геликазы и РНК-протеазы, которые являются общими для РНК-вирусов, было установлено, что коронавирусная репликаза использует ряд РНК-ферментов, которые не обнаруживаются (или редко выявляются) в других РНК-вирусах. К процессу подключается - специфическая эндорибонуклеаза, 3'-5'-экзорибонуклеаза, 2'-О-рибозо-метилтрансфераза, ADP-рибозо-1'-фосфатаза и, дополнительно в подгруппе коронавирусов группы 2, циклическая фосфодиэстераза [53]. Белки собираются на клеточной мембране, и РНК включается в виде зрелых частиц путем отщепления от внутренних клеточных мембран [54; 55; 56].

Ген репликазы/транскриптазы, ORF 1a/1b транслируется с помощью рибосомного каркасного сдвига в полипептид 1a (440-500 кДа) и 1b (740-810 кДа) и образуются неструктурные белки. К числу NSPS, кодирующих ORF 1a/1b,

относятся NSP3 и NSP5 – вирусные протеазы, которые опосредуют расщепление полипептидов 1a и 1b; NSP8 – проявляет аденилаттрансферазную активность и участвует в поли (А) хвостах; NSP12 – белок с активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы для репликации и транскрипции вирусного генома [1;3]. Полипептиды (1a и 1b) обрабатываются, кодируемой вирусом, химотрипсин-подобной протеазой, основной протеазой (Mpro) и одной или двумя папаин-подобными протеазами, за активность которых отвечают гены NSP3 и NSP5, соответственно [57]. Гены NSP3, NSP4 и NSP6 также индуцируют перестройку клеточной мембраны с образованием двухмембранных везикул (от англ. Double – membrane vesicles – DMV) или сферулы [58;59], где собирается и закрепляется комплекс репликации-транскрипции (replication transcription complexes – RTC) *HCoV* [5;19]. Помимо вторичных структур РНК, запрограммированный рибосомный сдвиг рамки считывания может регулироваться вирусными факторами и/или факторами клетки-хозяина [5].

Все структурные и вспомогательные белки транслируются в субгеномные вирусные мРНК (sgRNAs) *HCoV*. Четыре основных структурных белка содержат белки S, M, E, N, кодируемые ORF 10, ORF 11 на одной трети генома около 3'-конца. Помимо четырех основных структурных белков, различные *HCoV* кодируют специальные структурные и вспомогательные белки, такие как белок HE, ORF 3a/3b и ORF 4a/4b, которые отвечают за несколько важных функций в поддержание генома и репликации вируса [2].

3 этап - транскрипция и репликация генома. РНК, в качестве матрицы, с помощью РНК-репликазы *HCoV* синтезирует полноразмерный антиген минус-цепи, которая служит шаблоном для синтеза новой геномной РНК. Во время прерывистой транскрипции генома полимеразы переключает матрицы в специфических сайтах, создавая тем самым набор минус-цепей sg-РНК (соответствуют 5'-концу антигена), которые являются шаблонами для синтеза набора плюс-цепей sg-РНК (соответствуют 3'-концу генома). Репликация/транскрипция генома ограничивается RTC и в этом процессе участвуют различные факторы клетки-хозяина [5]. N-белок может быть РНК-шапероном и облегчать считывание матрицы, способствуя синтезу геномной РНК и более длинных sg-РНК [60; 61]. С N-белком *SARS-CoV* связывается «гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин А1», который регулирует синтез вирусной РНК. РНК-связывающие белки клетки-хозяина («цинковый палец ССНС-типа и РНК-связывающий мотив 1»), митохондриальная аконитаза, поли-А-связывающий белок), также

могут связываться с нетранслируемыми областями (UTR) генома коронавируса для изменения скорости репликации/транскрипции [5].

Транскриптом *SARS-CoV-2*, непосредственно примыкающим к каждому 5'-концу ORF, представляет собой короткие мотивы, известные как регулирующие транскрипцию последовательности (от англ. transcriptional regulatory sequences – TRS). TRS – это сигналы, опосредующие прерывную транскрипцию sgRNAs. Образующиеся последовательности могут также направлять продукцию 9 главных sgRNA *SARS-CoV-2*, каждая из которых содержит 5'-лидер и 3'-поли (А) хвост, и их относительное содержание является следующим: N> S> 7a> 3a> 8> M> E> 6> 7b РНК. При этом вирусные транскрипты доминируют и подавляют экспрессию гена-хозяина [3]. Кроме канонических («законное» соединение аминокислот – G+C или A+U), рекомбинаций при транскрипции sgRNAs, транскрипты обнаруживаются и при неканонической рекомбинации, при этом выявлено 3 основных типа: TRS-L-зависимая неканоническая рекомбинация (слияние с «телом» в неожиданных 3'-участках внутри ORF или нетранслируемых областей); TRS-L-независимая дальняя рекомбинация (слияние на дальние расстояния > 5000 нуклеотидов между последовательностями, в которых не участвует лидер); TRS-L-независимая локальная рекомбинация (образует меньше делеций, в основном в структурных и вспомогательных генах). Эпигенетические модификации играют важную роль в жизненных циклах РНК-вирусов, в том числе *HCoV* патогенных для человека. Так, модифицированные аденозины влияют на жизнеспособность специфических РНК-вирусов путем модуляции структур вирусной оболочки, вирусной репликации и врожденной иммунной реакции [3].

Изменения в геноме у *HCoV* не настолько частые, как у других РНК-вирусов (гриппа, ВИЧ), поэтому мутации в них происходят, но относительно некоторых РНК-вирусов через большие промежутки времени и они способны изменять некоторые свойства вирусов.

4 этап - трансляция структурных белков. Большинство sg-РНК вируса являются функционально моноцистронными, и поэтому кэп-зависимым путем транслируется только 5'-ORF [62]. Используя геномную РНК в качестве матрицы, РНК-репликаза синтезирует полноразмерный отрицательно смысловой антигеном *HCoV*, который является матрицей для синтеза новой геномной РНК. РНК-репликаза может переключать матрицу во время прерывистой транскрипции генома в специфических сайтах, называемых регулируемыми транскрипцией

последовательностями. Некоторые sg-РНК для трансляции дополнительных белков ORF могут использовать ослабленное сканирование и внутреннюю посадку рибосомы. Трансляция трансмембранных структурных белков S, HE, M и E, связанных с мембраной, происходит в эндоплазматическом ретикулуме, а N-белок транслируется свободными рибосомами в цитозоле [62]. Большинство структурных белков вируса подвергаются посттрансляционным модификациям, которые модулируют их функции: белки S и M модифицируются путем гликозилирования; N-связанное гликозилирование S-белка не способствует связыванию с рецептором и участвует в процессе прикрепления вириона, опосредованном лектином; O-связанное гликозилирование M-белка влияет на способность *HCov* индуцировать репликацию интерферона I типа [5].

5 этап - самосборка вирусных частиц происходит в промежуточных структурах комплекса Гольджи и управляется белком M [62]. Гомотопическое взаимодействие белков M – основа морфогенеза вирионов, а взаимодействия белков M и S или M и N облегчают привлечение структурных компонентов в место сборки. Вирусный белок E взаимодействует с M-белком и формирует изгибы мембраны, а затем способствует сборке частиц и окончательному отщеплению вириона [63]. Взаимодействие M-белка с β -актином способствует сборке частиц и выходу из клетки. Большинство структурных белков *HCov* подвергается посттрансляционным модификациям, определяющие их функции в жизненном цикле вируса [5].

6 этап - высвобождение вириона. Частицы *HCov* транспортируются в везикулах и перемещаются по секреторному пути для высвобождения путем экзоцитоза. Структурные белки вируса взаимодействуют с цитоскелетом клетки. Взаимодействие тубулинов (белки, из которого построены микротрубочки) с цитозольными доменами S-белка характерно для *HCov-229E*, *HCov-NL63* [64]. Вирионы коронавируса переносятся на поверхность клетки в больших экзоцитических везикулах, и вирионы высвобождаются из клетки в процессе, который не требует лизиса клеток. [5].

Кроме различий *SARS-CoV-2* от *SARS-CoV* в геномах, выявлены различия и при репликации у *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus*, наиболее существенные из которых являются три геномные особенности при репликации у *SARS-CoV-2*. Первая заключается в том, что *SARS-CoV-2*, по-видимому, более оптимизирован для связывания с человеческим рецептором ACE2, в отличие от других *HCov* этого семейства. Вторая особенность определяется тем, что S-белок

SARS-CoV-2 имеет функциональный сайт многоосновного (фуринового) расщепления на границе S1/S2 посредством вставки 12 нуклеотидов, что дополнительно приводит к приобретению трех O-связанных гликанов вокруг сайта, которая создает «муциноподобный домен» и экранирует эпитопы или ключевые остатки белка-шипа, что позволяет ускользать от иммунного ответа. Третья особенность связана с наличием рецептора CD147 на клетке хозяина, который дополнительно усиливает аффинность S-белка у *SARS-CoV-2*.

Эти различия в строении генома и репликации *SARS-CoV-2* и *SARS-CoV* формируют отличия в патогенезе патологических процессов и, соответственно, в клинических проявлениях заболеваний; в формировании иммунного ответа; эпидемиологического процесса; и являются свидетельством возможной эволюции вируса, которые позволили перейти от рукокрылых на человека и передаваться в человеческой популяции от одного человека другому.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До появления *SARS-CoV* в 2002-2003 гг. в мире были известны только *HCov-229E* и *HCov-OC43*, которые вызывали легкие клинические проявления со стороны верхних дыхательных путей при заражении людей. Два других вируса *HCov-NL63* и *HCov-HKU1* идентифицированы после появления *SARS-CoV* в 2004 и 2005 гг., соответственно. В последнее 10-летие было выявлено еще два коронавируса *SARS-CoV MERS-CoV*. Это позволяет высказать предположение, *HCov*, выделяемые от людей, прошли длительный путь адаптации, насчитывающий, вероятно, много десятков лет пока превратились в группу вирусов, вызывающие заболевания людей. Вирус, вызвавший современную пандемию, *SARS-CoV-2* во многом подобен по происхождению, геномам и циклам репликации в клетках хозяина и существенных различий не имеет. Однако для каждого вида вируса имеются некоторые различия, которые позволяют отметить патогенетические особенности, разнообразие клинических проявлений и тяжести заболевания, неодинаковые закономерности эпидемического процесса, которые отображаются в нозологиях, вызываемые разными видами. Особенности *SARS-CoV-2* от других видов вирусов, сопряжены с незначительными изменениями в структуре генома и репликации вируса в клетке хозяина. Множественные изменения в первичной структуре субъединицы S1 (протяженные вставки и замены, приобретение положительной полярности), затрагивают рецептор-связывающий домен и допускают предположение об изменении спец-

ифичности. Это может проявляться в расширении диапазона рецепторов и приобретением способности клетки хозяина узнавать несколько рецепторов, что расширяет тропность, ускоряет трансмиссивность, облегчает взаимодействие, объясняет большую высокую контагиозность *SARS-CoV-2*. Изменения в структуре S-белка и его S1 субъединице, наличие дополнительного рецептора CD147 у клетки, появление нового фуринового сайта, сформировали новый мутант вируса – *SARS-CoV-2*, для которого появилась возможность перескочить с исходных носителей на людей и при этом потенциально изменить трансмиссивность вируса. Это проявилось множеством иммунных коллизий, отягощающих течение инфекционного процесса; расширилась клиническая симптоматика и проявилась разная степень тяжести патологического процесса; изменился эпидемиологический процесс, который приобрел глобальный характер и стал более интенсивным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mousavizadeh L., Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2020; doi:10.1016/j.jmii.2020.03.022.
2. Corum J., Zimmer C. Bad News Wrapped in Protein: Inside the Coronavirus Genome. *The New York Times*. 2020:17.
3. Kim D., Lee J.-Y., Yang J.-S., Kim J.W, Kim V.N., Chang H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*. 2020;181(4):914-921.e10. doi:10.1016/j.cell.2020.04.011.
4. Fung S. Y., Yuen K. S., Ye Z. W., Chan C. P., D. Y. A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses, *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):558-570. doi: 10.1080/22221751.2020.1736644.
5. Fung T. S., Liu D. X. Human Coronavirus: Host-Pathogen Infection. *Annual Review of Microbiology*. 2019;73:529-557. doi:10.1146 / annurev-micro-020518-115759.
6. Wrapp D., Wang N., Corbett K. S., Goldsmith J. A., Hsieh C.-L., Abiona O., Graham B. S., McLellan S., Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation *Science*. 2020;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507 (2020).
7. Fung S. Y., Yuen K. S., Ye Z. W., Chan C. P., D. Y. A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses, *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):558-570, doi:10.1080/22221751.2020.1736644.
8. Graham R. L., Baric R. S. Minireview Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission. *Journal of Virology*. 2010; 84(7):3134–3146. doi:10.1128/JVI.01394-09.
9. Li W., Moore M. J., Vasilieva N., Sui J., Wong S. K., Berne M. A., Somasundaran M., Sullivan J. L., Luzuriaga K., Greenough T. C. Choe H., Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426(6965):450–454. doi: 10.1038/nature02145.
10. Du L., He Y., Zhou Y., Liu S., Zheng B.-J., Jiang S. The spike protein of SARS-CoV - a target for vaccine and therapeutic. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(3):226–236. doi:10.1038/nrmicro2090.
11. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581(7807):215-220. doi:10.1038/s41586-020-2180-5.
12. Li F., Li W., Farzan M., Harrison S. C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*. 2005;309(5742):1864–1868. doi: 10.1126/science.1116480.
13. de Haan C. A., Te Lintelo E., Li Z., Raaben M., Wurdinger T., Bosch B. J., Rottier P. J. Cooperative involvement of the S1 and S2 subunits of the murine coronavirus spike protein in receptor binding and extended host range. *J. Virol*. 2006;80:10909–10918. doi:10.1128/JVI.00950-06.
14. Schickli J. H., Thackray L. B., Sawicki S. G., Holmes K. V. The N-terminal region of the murine coronavirus spike glycoprotein is associated with the extended host range of viruses from persistently infected murine cells. *J. Virol*. 2004;78(17):9073–9083. doi:10.1128/JVI.78.17.9073-9083.
15. De Haan A. M., Kuo L., Masters P. S., Vennema H., Rottier P. J. M. Coronavirus particle assembly primary structure requirements of the membrane protein. *J. Virol*. 1998;72(8): 6838–6850. doi:10.1128/JVI.72.8.6838-6850.
16. Fahmi M., Kubota Y., Ito M. Nonstructural proteins NS7b and NS8 are likely to be phylogenetically associated with evolution of 2019-nCoV. *Infect. Genet. and Evol.* 2020; 81:104272-104277. doi:10.1016/j.meegid.2020.104272.
17. Viswanathan T., Arya, S., Chan S., Qi S., Dai N., Misra A., Park J.-G., Oladunni F., Kovalsky D., Hromas R. A., Martinez-Sobrido L., Gupta Y. K. Structural basis of RNA cap modification by SARS-CoV-2. *Nat. Commun*. 2020;11:3718-3725. doi:10.1038/s41467-020-17496-8.
18. Woo P. C. Y., Huang Y., Lau S. K. P., Yuen K.-Y. Coronavirus genomics and bioinformatics

- analyses. *Viruses*. 2010; 2(8): 1804–1820. doi:10.3390/v2081803.
19. Van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T. M., Raj V. S., Zaki A. M., Osterhaus A. D. M. E., Haagmans B. L., Gorbalenya A. E., Snijder E. J., Fouchier R. A. M. Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans. *mBio*. 2012;3(6):e00473-12. doi: 10.1128/mBio.00473-12.
20. Харченко Е. П. Коронавирус SARS-Cov-2: особенности структурных белков, контагиозность и возможные иммунные коллизии. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2020;19(2):13–30. doi: 10.31631/2073-3046-2020-19-2-13-30.
21. Chan P. K., Chan M. C. Tracing the SARS-coronavirus. *J. Thorac. Dis.* 2013; 5(2):118–121. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.19.
22. McRoy W. C., Baric R. S. Amino acid substitutions in the S2 subunit of mouse hepatitis virus variant V51 encode determinants of host range expansion. *J. Virol.* 2008;82:1414–1424. doi: 10.1128 / JVI.01674-07.
23. Cheng A., Zhang W., Xie Y., Jiang W., Arnold E., Sarafianos S. G., Ding J. Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology*. 2005; 335:165–176. doi: 10.1016 / j.virol.2005.02.017.
24. Grifoni A., Sidney J., Yun Zhang, Scheuermann R. H., Peters B., Sette A. Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses ureto SARS-CoV-2. *Cell Host & Microbe*. 2020;27:671-680. doi:10.1016/j.chom.2020/03.002.
25. Маджидов Т. И., Куракин Г. Ф. Компьютерные технологии против коронавируса: первые результаты. *Природа*. 2020; 3:3-15. doi:10.7868/S0032874X20030011.
26. Holmes K. V. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J. Clin. Invest.* 2003;111:1605–1609. doi: 10.1172 / JCI18819.
27. Weiss S. R., Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005;69(4):635–664. doi:10.1128/MMBR.69.4.635–664.
28. Tusell S. M., Schittone S. A., Holmes K. V. Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range. *J. Virol.* 2007; 81:1261–1273. doi: 10.1128 / JVI.01510-06.
29. Gralinski L.E., Baric R.S. Molecular pathology of emerging coronavirus infections. *J. Pathol. Jan.* 2015; 235(2):185-195. doi: 10.1002/path.4454.
30. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E. C., Gao G. F., Wu G., Chen W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020; 395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
31. Супотницкий М. В. Новый коронавирус SARS-CoV-2 в аспекте глобальной эпидемиологии коронавирусных инфекций. *Вестник войск РХБ защиты*. 2020;4(1):32-65. doi: 10.35825/2587-5728-2020-4-1-32-65.
32. Wong S. K., Li W., Moore M. J., Choe H., Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 2004;279:3197–3201.
33. Jun L., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Crystal structure of the 2019-nCoV spike receptor-binding domain bound with the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581(7807):215-220. doi:10.1038/s41586-020-2180-5.
34. Hoffman M. Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T. S., Herrler G., Wu N-H., Nitsche A., Müller M. A., Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE-2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271–280. doi: 0.1016. j. cell 2020/02.052.
35. Puzelli S., Azzi A., Santini M. G., Di Martino A., Facchini M., Castrucci M. R., Meola M., Arvia R., Corcioli F., Pierucci F., Baretta S., Bartoloni A., Bartolozzi D., de Martino M., Galli L., Pompa M. G., Rezza G., Balocchini E., Donatelli I. Investigation of an imported case of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection in Florence, Italy, May to June 2013. *Euro surveillance*. 2013;18(34):1-3. pii=20564. doi: 10.2807/1560-7917. ES2013. 18.34.20564.
36. Song Z., Xu Y., Bao L., Zhang L., Yu P., Qu Y., Zhu H., Zhao W., Han Y., Qin C. From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. *Viruses*. 2019;11(59):1-28. doi:10.3390/v11010059.
37. Bosch B. J., Bartelink W., Rottier P. J. Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide. *J. Virol.* 2008;82:8887–8890. doi:10.1128/JVI.00415-08.

38. Qu X. X., Hao P., Song X. J., Jiang S. M., Liu Y. X., Wang P. G., Rao X., Song H. D., Wang S. Y., Zuo Y., Zheng A. H., Luo M., Wang H. L., Deng F., Wang H. Z., Hu Z. H., Ding M. X., Zhao G. P., Deng H.K. Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. *J. Biol. Chem.* 2005;280:29588–29595. doi:10.1074/jbc.M500662200.
39. Li W, Zhang C., Sui J., Kuhn J. H., Moore M. J., Luo S., Wong S-K., Huang I-C., Xu K., Vasilieva N., Murakami A., He Y., Marasco W. A., Guan Y., Choe H., Farzan M. Receptor and viral determinants of SARS coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 2005; 24(8):1634–1643. doi:10.1038/sj.emboj.7600640.
40. Simmons G., Gosalia D. N., Rennekamp A. J., Reeves J. D., Diamond S. L., Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005;102(33):11876–11881. doi:10.1073/pnas.0505577102.
41. Du L., Kao R. Y., Zhou Y., He Y., Zhao G., Wong C., Jiang S., Yuen K-Y., Jin D-Y., Zheng B-J. Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;359:174–179. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.092.
42. Sainz B. J., Rausch J. M., Gallaher W. R., Garry R. F., Wimley W. C. Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein. *J. Virol.* 2005;79:7195–7206. doi: 10.1128 / JVI.79.11.7195-7206.2005.
43. Xu Y., Lou Z., Liu Y., Pang H., Tien P., Gao G. F., Rao Z. Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(47):49414–49419. doi: 10.1074 / jbc.M408782200.
44. Kleine-Weber H., Elzayat M. T., Hoffmann M., Pöhlmann S. Functional analysis of potential cleavage sites in the MERS-coronavirus spike protein. *Scientific Reports.* 2018; 8(16597):1-11. doi: 10.1038/s41598-018-34859-w.
45. Chen Y., Rajashankar K. R., Yang Y., Agnihothram S. S., Liu C., Lin Y-L., Baric R. S., Li F. Crystal Structure of the Receptor-Binding Domain from Newly Emerged Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* 2013;87(19):10777–10783. doi: 10.1128/ JVI.01756-13.
46. Iwata-Yoshikawa N., Okamura T., Shimizu Y., Hasegawa H., Takeda M., Nagata N. TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *J. Virol.* 2019;93(6):1815-1818. doi: 10.1128/JVI.01815-18.
47. Liu S., Xiao G., Chen Y., He Y., Niu J., Escalante C. R., Xiong H., Farmar J., Debnath A. K., Tien P., Jiang S. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet.* 2004; 363(9413):938-947. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15788-7.
48. Wang K., Chen W., Zhou Y.-S., Lian J.-Q., Zhang Z., Du P., Gong L., Zhang Y., Cui H.-Y., Geng J.-J., Wang B., Sun X.-X., Wang C.-F., Yang X., Lin P., Deng Y.-Q., Wei D., Yang X.-M., Zhu Y.-M., Zhang K., Zheng Z.-H., Miao J.-L., Guo T., Shi Y., Zhang J., Fu L., Wang Q.-Y., Bian H., Zhu P., Chen Z.-N. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *bioRxiv.* 2020;1-10. doi: 10.1101/2020.03.14.988345.
49. Bailey C. C., Zhong G., Huang I-C., Farzan M. IFITM-family proteins: the cell's first line of antiviral defense. *Annu. Rev. Virol.* 2014;1:261–283. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085537.
50. Huang I-C., Bailey C. C., Weyer J. L., Radoshitzky S. R., Becker M. M., Chiang J. J., Brass A. L., Ahmed A. A., Chi X., Dong L., Longobardi L. E., Boltz D., Kuhn J. H., Elledge S. J., Bavari S., Denison M. R., Choe H., Farzan M. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLOS Pathog.* 2011;7(1): e1001258. doi:10.1371/journal.ppat.1001258.
51. Zhao X., Guo F., Liu F., Cuconati A., Chang J., Block T. M., Guo J-T. Interferon induction of IFITM proteins promotes infection by human coronavirus OC43. *Proc Natl Acad Sci U S A (PNAS).* 2014;111(18):6756–6761. doi:10.1073/pnas.1320856111.
52. Zhao X., Sehgal M., Hou Z., Cheng J., Shu S., Wu S., Guo F., Marchand S. J. L., Lin H., Chang J., Guo J-T. Identification of residues controlling restriction versus enhancing activities of IFITM proteins on entry of human coronaviruses. *J. Virol.* 2018;92(6):1-17 e01535–17. doi:10.1128/ JVI.01535-17.
53. Ziebuhr J. The coronavirus replisome. *Curr Top. Microbiol. Immunol.* 2005;287:57-94. doi: 10.1007/3-540-26765-4_3.
54. Стомба Л. Ф., Лебедев В. Н., Петров А. А., Ручко В. М., Кулиш В. С., Борисевич С. В. Новый коронавирус, вызывающий заболевание человека. Проблемы особо опасных инфекций. 2015;2: 68-74. doi:10.21055/0370-1069.
55. Thackray L. B., Holmes K. V. Amino acid substitutions and an insertion in the spike glycoprotein extend the host range of the murine

- coronavirus MHV-A59. *Virology*. 2004; 324:510–524. doi:10.1128 / JVI.79.22.14451-14456.
56. Thackray L. B., Turner B. C., Holmes K. V. Substitutions of conserved amino acids in the receptor-binding domain of the spike glycoprotein affect utilization of murine CEACAM 1a by the murine coronavirus MHV-A59. *Virology*. 2005;334:98–110. doi: 10.1016 / j.virol.
57. Ziebuhr J., Snijder E. J., Gorbalenya A. E. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* 2000;81(4):853–879. doi: 10.1099/0022-1317-81-4-853.
58. Angelini M. M., Akhlaghpour M., Neuman B. W., Buchmeier M. J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio*. 2013;4(4):1-10 e00524–13. doi: 10.1128/mBio.00524-13.
59. Maier H. J., Hawes P. C., Cottam E. M., Mantell J., Verkade P., Monaghan P., Wileman T., Britton P. Infectious bronchitis virus generates spherules from zippered endoplasmic reticulum membranes. *Mbio*. 2013;4(5):801–813. doi: 10.1128/mBio.00801-13.
60. Zúñiga S., Cruz J. L. G., Sola I., Mateos-Gómez P. A., Palacio L., Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* 2010;84(4):2169–2175. doi: 10.1128/JVI.02011-09.
61. Zúñiga S., Sola I., Moreno J. L., Sabella P., Plana-Durán J., Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology*. 20 Jan. 2007;357(2):215–227. doi: 10.1016/j.virol.2006.07.046.
62. Masters P. S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006;66:193–292. doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3/
63. Lim K. P., Liu D. X. The missing link in coronavirus assembly retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 2001;276(20):17515–17523. doi: 10.1074/jbc.M009731200.
64. Rüdiger A-T., Mayrhofer P., Ma-Lauer Y., Pohlentz G., Müthing J., von Brunn A., Schwegmann-Weßels C. Tubulins interact with porcine and human S proteins of the genus Alphacoronavirus and support successful assembly and release of infectious viral particles. *Virology*. 2016; 497:185–197. doi: 10.1016/j.virol.2016.07.022.
- roles in pathogenesis *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2020; doi:10.1016/j.jmii.2020.03.022.
2. Corum J., Zimmer C. Bad News Wrapped in Protein: Inside the Coronavirus Genome. *The New York Times*; 2020;17.
3. Kim D., Lee J-Y., Yang J-S., Kim J. W, Kim V. N., Chang H. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*. 2020;181(4).14:914-921.e10. doi:10.1016/j.cell.2020.04.011.
4. Fung S. Y., Yuen K. S., Ye Z. W., Chan C. P., D. Y. A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses, *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):558-570. doi: 10.1080/22221751.2020.1736644.
5. Fung T. S., Liu D. X. Human Coronavirus: Host-Pathogen Infection. *Annual Review of Microbiology*. 2019;73:529-557. doi:10.1146 / annurev-micro-020518-115759.
6. Wrapp, D., Wang N., Corbett K. S., Goldsmith J. A., Hsieh C-L., Abiona O., Graham B. S., McLellan S., Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation *Science*. 2020;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507 (2020).
7. Fung S. Y., Yuen K. S., Ye Z. W., Chan C. P., D. Y. A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses, *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):558-570, doi:10 .1080/22221751.2020.1736644.
8. Graham R. L., Baric R. S. Minireview Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission. *Journal of Virology*. 2010; 84(7):3134–3146. doi:10.1128/JVI.01394-09.
9. Li W., Moore M. J., Vasilieva N., Sui J., Wong S. K., Berne M. A., Somasundaran M., Sullivan J. L., Luzuriaga K., Greenough T. C. Choe H., Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426(6965):450–454. doi: 10.1038/nature02145.
10. Du L., He Y., Zhou Y., Liu S., Zheng B-J., Jiang S. The spike protein of SARS-CoV - a target for vaccine and therapeutic. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(3):226–236. doi:10.1038/nrmicro2090.
11. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581(7807):215-220. doi:10.1038/s41586-020-2180-5.
12. Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*.

REFERENCES

1. Mousavizadeh L., Ghasemi S., Genotype and phenotype of COVID-19: Their

- 2005;309(5742):1864–1868. doi: 10.1126/science.1116480.
13. de Haan, C. A., Te Lintelo E., Li Z., Raaben M., Wurdinger T., Bosch B. J., Rottier P.J. Cooperative involvement of the S1 and S2 subunits of the murine coronavirus spike protein in receptor binding and extended host range. *J. Virol.* 2006;80:10909–10918. doi:10.1128/JVI.00950-06.
14. Schickli J. H., Thackray L. B., Sawicki S. G., Holmes K.V. The N-terminal region of the murine coronavirus spike glycoprotein is associated with the extended host range of viruses from persistently infected murine cells. *J. Virol.* Sep. 2004;78(17):9073–9083. doi:10.1128/JVI.78.17.9073-9083.
15. De Haan A. M., Kuo L., Masters P. S., Vennema H., Rottier P. J. M. Coronavirus particle assembly primary structure requirements of the membrane protein. *J. Virol.* 1998;72(8): 6838–6850. doi:10.1128/JVI.72.8.6838-6850.
16. Fahmi M., Kubota Y., Ito M. Nonstructural proteins NS7b and NS8 are likely to be phylogenetically associated with evolution of 2019-nCoV. *Infect. Genet. and Evol.* 2020; 81:104272-104277. doi:10.1016/j.meegid.2020.104272.
17. Viswanathan, T., Arya, S., Chan, S. Qi S., Dai N., Misra A., Park J-G., Oladunni F., Kovalsky D., Hromas R. A., Martinez-Sobrido L., Gupta Y.K. Structural basis of RNA cap modification by SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* 2020;11:3718-3725. doi:10.1038/s41467-020-17496-8.
18. Woo P. C. Y., Huang Y., Lau S. K. P., Yuen K-Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analyses. *Viruses.* 2010;2(8):1804–1820. doi:10.3390/v2081803.
19. Van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T. M., Raj V. S., Zaki A. M., Osterhaus A. D. M. E., Haagmans B. L., Gorbalenya A. E., Snijder E. J., Fouchier R. A. M. Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans. *mBio.* 2012;3(6):e00473-12. doi: 10.1128/mBio.00473-12.
20. Kharchenko E. P. Coronavirus SARS-Cov-2: features of structural proteins, contagiousness and possible immune collisions. *Epidemiology and Vaccine Prophylaxis.* 2020;19(2):13-30. doi: 10.31631 / 2073-3046-2020-19-2-13-30.
21. Chan P. K., Chan M. C. Tracing the SARS-coronavirus. *J. Thorac. Dis.* 2013;5(2): 118–121. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.19.
22. McRoy W. C., Baric R. S. Amino acid substitutions in the S2 subunit of mouse hepatitis virus variant V51 encode determinants of hostrange expansion. *J. Virol.* 2008; 82:1414–1424. doi: 10.1128 / JVI.01674-07.
23. Cheng A., Zhang W., Xie Y., Jiang W., Arnold E., Sarafianos S. G., Ding J. Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology.* 2005;335:165–176. doi: 10.1016 / j.virol.2005.02.017.
24. Grifoni A., Sidney J., Yun Zhang, Scheuermann R. H., Peters B., Sette A. Sequence Hemology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses ureto SARS-CoV-2. *Cell Host & Microbe.* 2020;27:671-680. doi:10.1016/j.chom.2020/03.002.
25. Madzhidov T. I., Kurakin G. F. Computer technologies against coronavirus: first results. *Nature.* 2020;3:3-15. doi: 10.7868 / S0032874X20030011.
26. Holmes K. V. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J. Clin. Invest.* 2003;111:1605–1609. doi: 10.1172 / JCI18819.
27. Weiss S. R., Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005;69(4):635–664. doi:10.1128/MMBR.69.4.635–664.
28. Tusell S. M., Schittone S. A., Holmes K. V. Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range. *J. Virol.* 2007;81:1261–1273. doi: 10.1128 / JVI.01510-06.
29. Gralinski L. E., Baric R. S. Molecular pathology of emerging coronavirus infections // *J. Pathol.* 2015;235(2):185-195. doi: 10.1002/path.4454.
30. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G. F., Wu G., Chen W., Sh W. i, Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020;395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
31. Supotnitsky M. V. Novel coronavirus SARS-CoV-2 in the aspect of the global epidemiology of coronavirus infections. *Bulletin of the RCB protection troops.* 2020; 4 (1): 32-65. doi: 10.35825 / 2587-5728-2020-4-1-32-65.
32. Wong S. K., Li W., Moore M. J., Choe H., Farzan M. A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 2004;279:3197–3201.
33. Jun L., Ge J., Yu1 J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Crystal structure of the 2019-nCoV spike receptor-binding domain bound with the ACE2 receptor.

- Nature. 2020; 581(7807):215-220. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
34. Hoffman M., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T. S., Herrler G., Wu N.-H., Nitsche A., Müller M. A., Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE-2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020; 181(2): 271–280. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
35. Puzelli S., Azzi A., Santini M. G., Di Martino A., Facchini M., Castrucci M. R., Meola M., Arvia R., Corcioli F., Pierucci F., Baretta S., Bartoloni A., Bartolozzi D., de Martino M., Galli L., Pompa M. G., Rezza G., Balocchini E., Donatelli I. Investigation of an imported case of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection in Florence, Italy, May to June 2013. *Euro surveillance*. 2013;18(34):1-3. pii=20564. doi: 10.2807/1560-7917.ES2013.18.34.20564.
36. Song Z., Xu Y., Bao L., Zhang L., Yu P., Qu Y., Zhu H., Zhao W., Han Y., Qin C. From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. *Viruses*. 2019;11(59):1-28. doi:10.3390/v11010059.
37. Bosch B. J., Bartelink W., Rottier P. J. Cathepsin L functionally cleaves the severe acute respiratory syndrome coronavirus class I fusion protein upstream of rather than adjacent to the fusion peptide. *J. Virol.* 2008;82:8887–8890. doi: 10.1128/JVI.00415-08.
38. Qu X. X., Hao P., Song X. J., Jiang S. M., Liu Y. X., Wang P. G., Rao X., Song H. D., Wang S. Y., Zuo Y., Zheng A. H., Luo M., Wang H. L., Deng F., Wang H. Z., Hu Z. H., Ding M. X., Zhao G. P., Deng H. K. Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. *J. Biol. Chem.* 2005;280:29588–29595. doi:10.1074/jbc.M500662200.
39. Li W., Zhang C., Sui J., Kuhn J. H., Moore M. J., Luo S., Wong S.-K., Huang I.-C., Xu K., Vasilieva N., Murakami A., He Y., Marasco W. A., Guan Y., Choe H., Farzan M. Receptor and viral determinants of SARS coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 2005;24(8):1634–1643. doi: 10.1038/sj.emboj.7600640.
40. Simmons G., Gosalia D. N., Rennekamp A. J., Reeves J. D., Diamond S. L., Bates P. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005;102(33):11876–11881. doi:10.1073/pnas.0505577102.
41. Du L., Kao R.-Y., Zhou Y., He Y., Zhao G., Wong C., Jiang S., Yuen K.-Y., Jin D.-Y., Zheng B.-J. Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;359:174–179. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.092.
42. Sainz B. J., Rausch J. M., Gallaher W. R., Garry R. F., Wimley W. C. Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein. *J. Virol.* 2005;79:7195–7206. doi: 10.1128/JVI.79.11.7195-7206.2005.
43. Xu Y., Lou Z., Liu Y., Pang H., Tien P., Gao G. F., Rao Z. Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core. *J. Biol. Chem.* 2004;279(47):49414–49419. doi: 10.1074/jbc.M408782200.
44. Kleine-Weber H., Elzayat M. T., Hoffmann M., Pöhlmann S. Functional analysis of potential cleavage sites in the MERS-coronavirus spike protein. *Scientific Reports*. 2018; 8(16597):1-11. doi: 10.1038/s41598-018-34859-w.
45. Chen Y., Rajashankar K.R., Yang Y., Agnihothram S.S., Liu C., Lin Y.-L., Baric R. S., Li F. Crystal Structure of the Receptor-Binding Domain from Newly Emerged Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* Oct. 2013; 87(19): 10777–10783. doi: 10.1128/JVI.01756-13.
46. Iwata-Yoshikawa N., Okamura T., Shimizu Y., Hasegawa H., Takeda M., Nagata N. TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *J. Virol.* 2019;93(6):1815-1818. doi: 10.1128/JVI.01815-18.
47. Liu S., Xiao G., Chen Y., He Y., Niu J., Escalante C. R., Xiong H., Farmer J., Debnath A. K., Tien P., Jiang S. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet*. 2004;363(9413):938-947. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15788-7.
48. Wang K., Chen W., Zhou Y.-S., Lian J.-Q., Zhang Z., Du P., Gong L., Zhang Y., Cui H.-Y., Geng J.-J., Wang B., Sun X.-X., Wang C.-F., Yang X., Lin P., Deng Y.-Q., Wei D., Yang X.-M., Zhu Y.-M., Zhang K., Zheng Z.-H., Miao J.-L., Guo T., Shi Y., Zhang J., Fu L., Wang Q.-Y., Bian H., Zhu P., Chen Z.-N. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *bioRxiv*. 2020;1-10. doi: 10.1101/2020.03.14.988345.
49. Bailey C. C., Zhong G., Huang I.-C., Farzan M. IFITM-family proteins: the cell's first line of antiviral defense. *Annu. Rev. Virol.* 2014;1:261–283. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085537.
50. Huang I.-C., Bailey C. C., Weyer J. L., Radoshitzky S. R., Becker M. M., Chiang J. J., Brass A. L., Ahmed A. A., Chi X., Dong L., Longobardi L. E., Boltz D., Kuhn J. H., Elledge

- S. J., Bavari S., Denison M. R., Choe H., Farzan M. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLOS Pathog.* 2011;7(1): e1001258. doi: 10.1371/journal.ppat.1001258.
51. Zhao X., Guo F., Liu F., Cuconati A., Chang J., Block T. M., Guo J-T. Interferon induction of IFITM proteins promotes infection by human coronavirus OC43. *Proc Natl Acad Sci U S A (PNAS)*. 2014;111(18):6756–6761. doi: 10.1073/pnas.1320856111.
52. Zhao X., Sehgal M., Hou Z., Cheng J., Shu S., Wu S., Guo F., Marchand S. J. L., Lin H., Chang J., Guo J-T. Identification of residues controlling restriction versus enhancing activities of IFITM proteins on entry of human coronaviruses. *J. Virol.* 2018;92(6):1-17 e01535–17. doi: 10.1128/JVI.01535-17.
53. Ziebuhr J. The coronavirus replisome. *Curr Top. Microbiol. Immunol.* 2005;287:57-94. doi: 10.1007/3-540-26765-4_3.
54. Stovba L. F., Lebedev V. N., Petrov A. A., Ruchko V. M., Kulish V. S., Borisevich S. V. A new coronavirus that causes human disease. *Problems of especially dangerous infections*, 2015;2:68-74. doi: 10.21055 / 0370-1069.
55. Thackray L. B., Holmes K. V. Amino acid substitutions and an insertion in the spike glycoprotein extend the host range of the murine coronavirus MHV-A59. *Virology.* 2004; 324:510–524. doi: 10.1128 / JVI.79.22.14451-14456.
56. Thackray L.B., Turner B.C., Holmes K.V. Substitutions of conserved amino acids in the receptor-binding domain of the spike glycoprotein affect utilization of murine CEACAM 1a by the murine coronavirus MHV-A59. *Virology.* 2005; 334:98–110. doi: 10.1016 / j.virol.
57. Ziebuhr J., Snijder E. J., Gorbalenya A. E. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* 2000;81(4):853–879. doi: 10.1099/0022-1317-81-4-853.
58. Angelini M. M., Akhlaghpour M., Neuman B. W., Buchmeier M. J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio.* 2013;4(4):1-10 e00524–13. doi: 10.1128/mBio.00524-13.
59. Maier H. J., Hawes P. C., Cottam E. M., Mantell J., Verkade P., Monaghan P., Wileman T., Britton P. Infectious bronchitis virus generates spherules from zippered endoplasmic reticulum membranes. *mBio.* 2013;4(5):801–813. doi: 10.1128/mBio.00801-13.
60. Zúñiga S., Cruz J. L. G., Sola I., MateosGómez P. A., Palacio L., Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* 2010;84(4):2169–2175. doi: 10.1128/JVI.02011-09.
61. Zúñiga S., Sola I., Moreno J. L., Sabella P., Plana-Durán J., Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology.* 2007;357(2):215–227. doi: 10.1016/j.virol.2006.07.046.
62. Masters P. S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66:193–292. doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
63. Lim K. P., Liu D. X. The missing link in coronavirus assembly retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 2001.276(20):17515–17523. doi: 10.1074/jbc.M009731200.
64. Rüdiger A-T., Mayrhofer P., Ma-Lauer Y., Pohlentz G., Muthing J., von Brunn A., Schwegmann-Weßels C. Tubulins interact with porcine and human S proteins of the genus Alphacoronavirus and support successful assembly and release of infectious viral particles. *Virology.* 2016;497:185–197. doi:10.1016/j.virol.2016.07.022.