

МЕДИЦИНСКИЙ АКАДЕМИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 3

ТОМ 18

2018

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

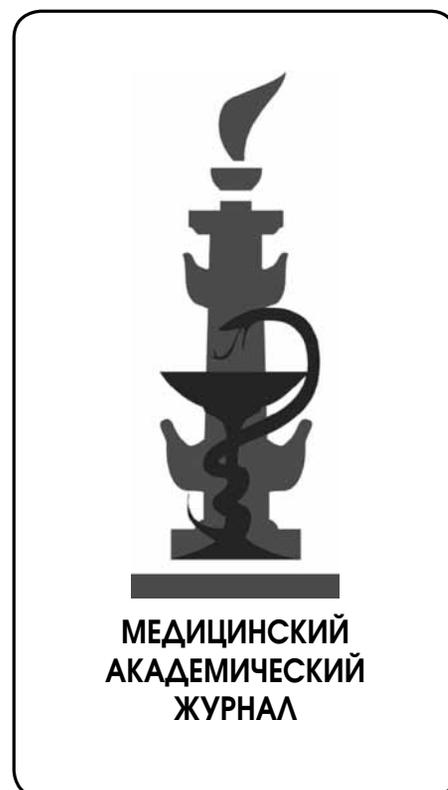
Институт экспериментальной медицины

Главный редактор:
академик РАН *Г.А. Софронов*

Заместители главного редактора:

академик РАН *Н.А. Беляков*,
профессор РАН *А.В. Дмитриев*

Ответственный секретарь:
доктор биологических наук
А.В. Соколов



Журнал рекомендован ВАК для публикации материалов диссертаций

Адрес: 197376, Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, 12.
Редколлегия журнала «Медицинский академический журнал»
Тел. (812) 234-68-57

E-mail: medicalacademicjournal@gmail.com

Журнал зарегистрирован Территориальным управлением по Санкт-Петербургу и Ленинградской области
Министерства РФ по делам печати, телевидения и средств массовой коммуникации.
Свидетельство о регистрации ПИ № 2-4952 от 17.01.2001

Редакционная коллегия

Э.К. Айламазян — академик РАН, Санкт-Петербург
С.Ф. Багненко — академик РАН, Санкт-Петербург
В.Б. Васильев — профессор, Санкт-Петербург
В.Р. Вебер — академик РАН, Великий Новгород
Ю.В. Лобзин — академик РАН, Санкт-Петербург
В.И. Мазуров — академик РАН, Санкт-Петербург
Н.А. Майстренко — академик РАН, Санкт-Петербург
А.О. Марьяндышев — член-корреспондент РАН, Архангельск
В.В. Рассохин — доктор медицинских наук, Санкт-Петербург
А.С. Симбирцев — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
А.Г. Софронов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
А.Н. Суворов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
А.А. Тотолян — академик РАН, Санкт-Петербург
Т.Н. Трофимова — профессор, Санкт-Петербург
Ю.А. Щербук — академик РАН, Санкт-Петербург
Ю.К. Янов — академик РАН, Санкт-Петербург
Янг Йонгхонг — иностранный член РАН, Китай
М.-П. Кини — Ph.D., Франция

Редакционный совет

А.Г. Баиндурашвили — академик РАН, Санкт-Петербург
В.С. Баранов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
И.П. Дуданов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
С.А. Кетлинский — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Е.А. Корнева — академик РАН, Санкт-Петербург
С.В. Лобзин — профессор, Санкт-Петербург
М.М. Одинак — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Н.С. Сапронов — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
А.А. Скоромец — академик РАН, Санкт-Петербург
П.И. Сидоров — академик РАН, Архангельск
С.А. Симбирцев — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Р.М. Тихилов — профессор, Санкт-Петербург
П.Д. Шабанов — профессор, Санкт-Петербург
А.В. Шабров — академик РАН, Санкт-Петербург
Е.В. Шляхто — академик РАН, Санкт-Петербург
В.Х. Хавинсон — член-корреспондент РАН, Санкт-Петербург
Н.А. Яицкий — академик РАН, Санкт-Петербург

MEDICAL ACADEMIC JOURNAL

No. 3

Volume 18

2018

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

Institute of Experimental Medicine

Editor in Chief:

G.A. Sofronov

Full Member of the Russian Academy of Sciences

Deputy Editor in Chief:

N.A. Belyakov

Full Member of the Russian
Academy of Sciences,

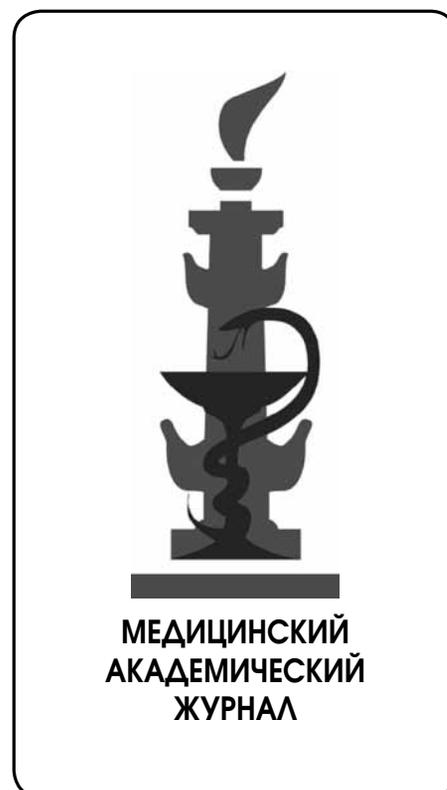
A.V. Dmitriev

Professor of the Russian Academy of Sciences

Executive Secretary:

A.V. Sokolov

Doctor of Biological Sciences



Address: 197376, Academic Pavlov's street, 12
Editorial board «Medical academic journal»
Tel. (812) 234-68-57

E-mail: medicalacademicjournal@gmail.com

Editorial Board

E.K. Ailamazian, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
S.F. Bagnenko, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
V.B. Vasiliev, professor, St. Petersburg
V.R. Veber, full member of the Russian Academy of Sciences, Velikiy Novgorod
Yu.V. Lobzin, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
V.I. Mazurov, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
N.A. Maistrenko, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A.O. Maryandyshev, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
V.V. Rassokhin, Doctor of Medical Science, St. Petersburg
A.S. Simbirtsev, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A.G. Sofronov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A.N. Suvorov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A.A. Totolyan, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
T.N. Trofimova, professor, St. Petersburg
Yu.A. Scherbuk, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
Yu.K. Yanov, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
Yang Yonghong, foreign member of the Russian Academy of Sciences, China
M.-P. Kiény, PhD, France

Editorial Council

A.G. Baidurashvili, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
V.S. Baranov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
I.P. Dudanov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
S.A. Ketlinskiy, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
Ye.A. Korneva, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
S.V. Lobzin, professor, St. Petersburg
M.M. Odinak, corresponding member of the Russian Academy Sciences, St. Petersburg
N.S. Sapronov, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
A.A. Skoromets, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
P.I. Sidorov, full member of the Russian Academy of Sciences, Arkhangelsk
S.A. Simbirtsev, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
R.M. Tikhilov, professor, St. Petersburg
P.D. Shabanov, professor, St. Petersburg
A.V. Shabrov, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
Ye.V. Shlyakhto, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
V.H. Khavinson, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg
N.A. Yaitsky, full member of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

СОДЕРЖАНИЕ

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ОБЗОРЫ

- Е.С. Умнякова, Л.Д. Пашинская, И.А. Кренин, С.В. Легковой, В.Н. Кокряков, М.Н. Берлов*
ЗАБОЛЕВАНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ДИСРЕГУЛЯЦИЕЙ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА,
И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ЛЕЧЕНИЯ 7
- В.Б. Войтенков, Е.В. Екушева, Н.В. Скрипченко, А.В. Климкин*
РОЛЬ ВОСПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПОЛИНЕВРОПАТИИ
ШАРКО – МАРИ – ТУТА 17

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРАКТИКА

- И.А. Верес*
ПРИМЕНЕНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ РОДИЛЬНИЦ
С ПОСЛЕРОДОВЫМ ЭНДОМЕТРИТОМ 23
- Д.А. Гранов, А.Р. Шералиев, О.А. Герасимова, А.А. Поликарпов*
ВНУТРИПОРТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ
АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ В ЛИСТЕ ОЖИДАНИЯ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ 32
- С.А. Налькин, С.В. Лобзин, М.Г. Соколова*
ОСОБЕННОСТИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С МИАСТЕНИЕЙ..... 41

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Ю.А. Калинина, Д.А. Суфиева*
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ НЕЙРОНОВ
И АСТРОЦИТОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫСЫ 46
- Д.П. Ковтун, Н.М. Аничков, О.Г. Полушин, Е.В. Пономарева, А.И. Любимов, Е.Ю. Калинина*
ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ АДЕНОКАРЦИНОМ:
ОБЪЕКТИВИЗАЦИЯ КРИТЕРИЕВ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ 52
- М.С. Дениско, О.И. Кривошеина, Е.О. Филиппова, Л.Р. Мустафина*
ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИСТРОФИИ
НА ФОНЕ ИНТРАСТРОМАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ
МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ..... 57
- В.А. Беляева*
МЕТЕОФАКТОРЫ И ОБРАЩАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ
ЗА НЕОТЛОЖНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩЬЮ 64
- Д.В. Зотова, Н.А. Грудинина, О.И. Антимопова, М.М. Шавловский, Д.С. Поляков*
ЛОКАЛИЗАЦИЯ И АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО СТРЕПТАВИДИНА
В КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ *E. COLI* 69
- Е.В. Мурзина, Г.А. Софронов, А.С. Симбирцев, Н.В. Аксенова, О.М. Веселова, А.М. Ищенко*
ОЦЕНКА РАДИОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА
ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗДЕЛЬНО ИЛИ В КОМБИНАЦИИ С ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-1 БЕТА 77
- М.А. Макарова, А.В. Дмитриев, З.Н. Матвеева, Л.А. Кафтырева*
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*
СЕРОГРУППЫ O26, ВЫЗЫВАЮЩИХ ДИАРЕЙНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ДЕТЕЙ 85

CONTENTS

ANALYTICAL REVIEWS

- E.S. Umnyakova, L.D. Pashinskaya, I.A. Krenev, S.V. Legkovoy, V.N. Kokryakov, M.N. Berlov*
DISEASES ASSOCIATED WITH COMPLEMENT SYSTEM DYSREGULATION
AND THE PROSPECTS OF THEIR TREATMENT 7
- V.B. Voitenkov, E.V. Ekusheva, N.V. Skripchenko, A.V. Klimkin*
INFLAMMATORY DISORDERS IN THE PATHOGENESIS
OF CHARCOT–MARIE–TOOTH HEREDITARY POLYNEUROPATHY 17

CLINICAL RESEARCH AND PRACTICE

- I.A. Veres*
APPLICATION OF PHYSICAL FACTORS IN COMPLEX TREATMENT
OF PUERPERAS WITH POSTPARTUM ENDOMETRITIS 23
- D.A. Granov, A.R. Sheraliev, O.A. Gerasimova, A.A. Polikarpov*
INTRAPORTAL THERAPY OF AUTOLOGOUS BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS
IN PATIENTS ON THE WAITING LIST FOR LIVER TRANSPLANTATION 32
- S.A. Nalkin, S.V. Lobzin, M.G. Sokolova*
COGNITIVE FUNCTION IN PATIENTS WITH MYASTHENIA GRAVIS 41

ORIGINAL RESEARCHES

- Yu.A. Kalinina, D.A. Sufieva*
IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD OF SIMULTANEOUS DETECTION OF NEURONS
AND ASTROCYTES IN THE RAT BRAIN 46
- D.P. Kovtun, N.M. Anichkov, O.G. Polushin, E.V. Ponomaryeva, A.I. Lyubimov, E.Yu. Kalinina*
PROLIFERATIVE ACTIVITY OF COLORECTAL ADENOCARCINOMA:
OBJECTIFICATION OF CRITERIA OF MORPHOLOGICAL EVALUATION 52
- M.S. Denisko, O.I. Krivosheina, E.O. Filippova, L.R. Mustafina*
PATHOMORPHOLOGICAL FEATURES OF CORNEAL REGENERATION IN EXPERIMENTALLY
INDUCED DYSTROPHY AGAINST THE BACKGROUND OF INTRASTROMAL
ADMINISTRATION OF AUTOLOGOUS MONONUCLEAR LEUKOCYTES 57
- V.A. Belyayeva*
METEOFATORS AND ADMITTANCE OF PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION
FOR EMERGENCY MEDICAL CARE 64
- D.V. Zotova, N.A. Grudinina, O.I. Antimonova, M.M. Shavlovsky, D.S. Polyakov*
LOCALIZATION AND ACTIVITY OF RECOMBINANT STREPTAVIDIN
IN CELL FRACTIONS OF *ESCHERICHIA COLI* 69
- E.V. Murzina, G.A. Sofronov, A.S. Simbirtsev, N.V. Aksenova, O.M. Veselova, A.M. Ischenko*
EVALUATION OF THE RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF RECOMBINANT FLAGELLIN
WHEN USED ALONE OR IN COMBINATION WITH INTERLEUKIN-1 BETA 77
- M.A. Makarova, A.V. Dmitriev, Z.N. Matveeva, K.A. Kaftyreva*
MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF STRAIN *ESCHERICHIA COLI*
SEROGROUP O26 CAUSING DIARRHEAL DISEASES IN CHILDREN 85

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ОБЗОРЫ

УДК 571.27

ЗАБОЛЕВАНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ДИСРЕГУЛЯЦИЕЙ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА, И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ЛЕЧЕНИЯ

*Е.С. Умнякова¹, Л.Д. Пашинская², И.А. Кренив², С.В. Легковой²,
В.Н. Кокряков^{1, 2}, М.Н. Берлов^{1, 2}*

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

DISEASES ASSOCIATED WITH COMPLEMENT SYSTEM DYSREGULATION AND THE PROSPECTS OF THEIR TREATMENT

*E.S. Umnyakova¹, L.D. Pashinskaya², I.A. Krennev², S.V. Legkovoy²,
V.N. Kokryakov^{1, 2}, M.N. Berlov^{1, 2}*

¹Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

²Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

© Коллектив авторов, 2018

В настоящее время одна из серьезных проблем медицины заключается в практически полном отсутствии терапевтических средств, регулирующих уровень активации комплемента. Между тем система комплемента играет существенную роль в патогенезе целого ряда заболеваний, таких как возрастная макулодистрофия (дегенеративное заболевание глаз, являющееся главной причиной развития слепоты у пожилых людей), некоторые заболевания почек, в том числе атипичный гемолитико-уремический синдром и мембранопротрофиеративный гломерулонефрит II типа, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (болезнь Маркиафавы – Микели), наследственная ангиоэдема. Помимо этого комплемент и его компоненты участвуют в развитии и течении аутоиммунных патологических процессов, таких как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, аутоиммунная гемолитическая анемия; нейродегенеративных и опухолевых заболеваний, а также осложнений после инфарктов, инсультов и трансплантаций. В обзоре рассматриваются участие комплемента в патологических процессах, существующие методы лечения и перспективы развития препаратов, способных корректировать работу комплемента — важнейшего компонента врожденного иммунитета.

Ключевые слова: система комплемента; системная красная волчанка; возрастная макулодистрофия; атипичный гемолитико-уремический синдром; наследственная ангиоэдема; гломерулоспатии; аутоиммунные заболевания; регуляторы комплемента; антимикробные пептиды; дефенсины человека.

The lack of pharmaceutical agents that could modulate complement activation is one of the most serious problems in modern medical practice. Meanwhile, the complement system plays a significant role in the pathogenesis of numerous diseases such as age-related macular degeneration (degenerative eye disease, which is the main cause of blindness in the elderly), kidney diseases such as atypical hemolytic-uremic syndrome and membranoproliferative glomerulonephritis type II, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (Marchiafava–Micheli disease), and hereditary angioedema. The complement and its components are involved in the development and progression of autoimmune pathological processes, such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and autoimmune hemolytic anemia; neurodegenerative and neoplastic diseases; and complications after heart attacks, strokes, and transplants. This review considers the involvement of complements in the pathological processes, existing methods of treatment, and the prospects for the development of drugs that can correct the work of complement — the most important component of innate immunity.

Keywords: complement system; systemic lupus erythematosus; age-related macular degeneration; atypical hemolytic-uremic syndrome; hereditary angioedema; glomerulopathies; autoimmune diseases; complement regulators; antimicrobial peptides; human defensins.

Схемы лечения, которые главным образом применяются на ранних этапах развития инфекций, и противовоспалительная терапия, которая проводится на поздних стадиях сепсиса эффективны в наибольшей степени, и ингибирование комплемента на уровне C3 на модели позднего сепсиса у приматов оказывает благоприятное влияние на течение заболевания и на улучшение клинических показателей у животных.

Повреждения тканей при активации комплемента также были отмечены при ишемическо-геморрагических поражениях (инфаркте миокарда, инсульте), а также при повреждениях, возникающих в результате сосудистой хирургии или трансплантации органов. Геморрагия тканей, приводящая к кратковременному излиянию крови и запускающая воспаление и другие иммунные реакции, включая активацию комплемента, может служить причиной аутоповреждения тканей, уровень которого зависит от органа, в котором и происходит активация. Распознавание системой комплемента поврежденных клеток активирует каскад реакций, происходит выброс анафилатоксинов, которые активируют иммунные клетки. Освобождение активных форм кислорода и других сигнальных молекул провоцирует повреждения и клинические проявления патологических процессов. Несколько методов лечения, направленных на ингибирование комплемента, оказались эффективными только при лечении ишемическо-геморрагических повреждений, в особенности инфаркта миокарда [47].

Терапия заболеваний, связанных с дисрегуляцией комплемента

Поскольку в настоящее время существует ряд трудностей при лечении заболеваний, связанных с некорректной работой системы комплемента, остается актуальным поиск веществ, влияющих на активацию комплемента и модулирующих работу этой системы. Всего лишь два препарата были одобрены и используются в клинической практике: выделенный из плазмы человека C1inh (Cinryze™, ViroPharma) для лечения наследственной ангиоэдемы и терапевтические антитела к C5 — экулизумаб (Soliris®, Alexion) для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии и атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS). Однако стоимость этих препаратов довольно высока. Оба препа-

рата входят в пятерку самых дорогих лекарств в мире. Одним из возможных путей решения задачи терапии этих тяжелейших заболеваний может быть поиск молекул-регуляторов среди многочисленных антимикробных пептидов (АМП) различных структурных семейств. Согласно литературным данным некоторые АМП не только обладают антимикробными свойствами, что отражено в названии этих соединений [48, 49], но и взаимодействуют с различными компонентами иммунной системы. В частности, было обнаружено, что такие АМП, как α -дефенсин человека, протегрин-1 свиньи, ариеницин-1 пескожила и тахеплезин-1 мечехвоста, способны взаимодействовать с отдельными компонентами системы комплемента (C1q, MBL). Также было показано влияние пептидов на активацию комплемента: в различных условиях пептиды ее либо усиливали, либо ослабляли [50–58]. Для создания лекарственных средств, способных подавлять нежелательную активацию комплемента или, наоборот, усиливать ее в случае ослабления этой системы, необходимо вести поиск пептидов, которые бы либо с высокой аффинностью связывались с компонентами комплемента и предотвращали их взаимодействие со следующими участниками каскада, либо способствовали активации.

В настоящее время клинические испытания проходит пептидный препарат — модифицированный компстатин CP40. Компстатин первоначально был обнаружен с помощью фагового дисплея: случайным образом была подобрана аминокислотная последовательность пептида, который избирательно связывается с центральным компонентом комплемента C3 и его активным фрагментом C3b, предотвращая конверсию C3 в C3a и C3b, а также сборку конвертаза с участием последнего [59, 60]. Таким образом, компстатин ингибирует амплификацию и терминальные стадии комплемента.

На сегодняшний день сделаны только первые шаги, направленные на получение лекарственных средств на основе пептидов, которые могли бы модулировать активность комплемента. В дальнейшем необходимо более подробно и досконально изучать характер и стехиометрию взаимодействия пептидов с компонентами комплемента для того, чтобы определить параметры, изменяя которые можно либо активировать, либо ингибировать комплемент.

Список литературы

1. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I — Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015;6:262. doi: 10.3389/fimmu.2015.00262.
2. Erdei A, Sandor N, Macsik-Valent B, et al. The versatile functions of complement C3-derived ligands. *Immunol Rev.* 2016;274(1):127-140. doi: 10.1111/imr.12498.

3. Tomlinson S, Taylor PW, Morgan BP, Luzio JP. Killing of gram-negative bacteria by complement. Fractionation of cell membranes after complement C5b-9 deposition on to the surface of Salmonella Minnesota Re595. *Biochem J*. 1989;263(2):505-511. doi: 10.1042/bj2630505.
4. Bloch EF, Knight EM, Carmon T, et al. C5b-7 and C5b-8 precursors of the membrane attack complex (C5b-9) are effective killers of E. Coli J5 during serum incubation. *Immunol Invest*. 2009;26(4):409-419. doi: 10.3109/08820139709022698.
5. Berends ET, Dekkers JF, Nijland R, et al. Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. *Cell Microbiol*. 2013;15(12):1955-1968. doi: 10.1111/cmi.12170.
6. Hoover DL, Berger M, Nacy CA, et al. Killing of Leishmania tropica amastigotes by factors in normal human serum. *J Immunol*. 1984;132(2):893-897.
7. Koski CL, Ramm LE, Hammer CH, et al. Cytolysis of nucleated cells by complement: cell death displays multi-hit characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12):3816-3820. doi: 10.1073/pnas.80.12.3816.
8. Kim SH, Carney DF, Hammer CH, Shin ML. Nucleated cell killing by complement: effects of C5b-9 channel size and extracellular Ca²⁺ on the lytic process. *J Immunol*. 1987;138(5):1530-1536.
9. Nauta AJ, Daha MR, Tijisma O, et al. The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *Eur J Immunol*. 2002;32(3):783. doi: 10.1002/1521-4141(200203)32:3<783::aid-immu783>3.0.co;2-q.
10. Li CKN. Proof of the one-hit mechanism of complement-induced lysis. *Immunochemistry*. 1975;12(1):89-92. doi: 10.1016/0019-2791(75)90054-3.
11. Hein E, Garred P. The Lectin Pathway of Complement and Biocompatibility. *Adv Exp Med Biol*. 2015;865:77-92. doi: 10.1007/978-3-319-18603-0_5.
12. Lintner KE, Wu YL, Yang Y, et al. Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2016;7:36. doi: 10.3389/fimmu.2016.00036.
13. Bohlsón SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, et al. Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front Immunol*. 2014;5:402. doi: 10.3389/fimmu.2014.00402.
14. Kishore U, Gaboriaud C, Waters P, et al. C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol*. 2004;25(10):551-561. doi: 10.1016/j.it.2004.08.006.
15. Nauta AJ, Bottazzi B, Mantovani A, et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):465-473. doi: 10.1002/immu.200310022.
16. Roumenina LT, Popov KT, Bureeva SV, et al. Interaction of the globular domain of human C1q with Salmonella typhimurium lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784(9):1271-1276. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.04.029.
17. Flierman R, Daha MR. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):363-370. doi: 10.1016/j.imbio.2006.11.005.
18. Trouw LA, Blom AM, Gasque P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol*. 2008;45(5):1199-1207. doi: 10.1016/j.molimm.2007.09.008.
19. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(10):729-740. doi: 10.1038/nri2620.
20. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, et al. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol*. 2015;6:257. doi: 10.3389/fimmu.2015.00257.
21. Panelius J, Meri S. Complement system in dermatological diseases — fire under the skin. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:3. doi: 10.3389/fmed.2015.00003.
22. Tichaczek-Goska D. Deficiencies and excessive human complement system activation in disorders of multifarious etiology. *Adv Clin Exp Med*. 2012;21(1):105-114.
23. Ricklin D, Lambris JD. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol*. 2013;190(8):3831-3838. doi: 10.4049/jimmunol.1203487.
24. Liszewski MK, Java A, Schramm EC, Atkinson JP. Complement Dysregulation and Disease: Insights from Contemporary Genetics. *Annu Rev Pathol*. 2017;12:25-52. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044145.
25. Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(9):1601-1606. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205287.
26. Yin Y, Wu X, Shan G, Zhang X. Diagnostic value of serum anti-C1q antibodies in patients with lupus nephritis: a meta-analysis. *Lupus*. 2012;21(10):1088-1097. doi: 10.1177/0961203312451202.
27. Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, et al. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):421-424. doi: 10.1126/science.1110189.
28. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(20):7227-7232. doi: 10.1073/pnas.0501536102.

29. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):419-421. doi: 10.1126/science.1110359.
30. Klein RJ. Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385-389. doi: 10.1126/science.1109557.
31. Shih AR, Murali MR. Laboratory tests for disorders of complement and complement regulatory proteins. *Am J Hematol*. 2015;90(12):1180-1186. doi: 10.1002/ajh.24209.
32. Carugati A. C1-inhibitor deficiency and angioedema. *Mol Immunol*. 2001;38(2-3):161-173. doi: 10.1016/s0161-5890(01)00040-2.
33. Sethi S, Fervenza FC. Membranoproliferative glomerulonephritis — a new look at an old entity. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1119-1131. doi: 10.1056/NEJMra1108178.
34. Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2009;361(17):1676-1687. doi: 10.1056/NEJMra0902814.
35. Malina M, Roumenina LT, Seeman T, et al. Genetics of hemolytic uremic syndromes. *Presse Med*. 2012;41(3 Pt 2):e105-114. doi: 10.1016/j.lpm.2011.10.028.
36. Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, et al. Complement factor B mutations in atypical hemolytic uremic syndrome-disease-relevant or benign? *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(9):2053-2065. doi: 10.1681/ASN.2013070796.
37. Dragon-Durey MA, Sethi SK, Bagga A, et al. Clinical features of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(12):2180-2187. doi: 10.1681/ASN.2010030315.
38. Bresin E, Ruruli E, Caprioli J, et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(3):475-486. doi: 10.1681/ASN.2012090884.
39. Fakhouri F, Fremeaux-Bacchi V, Noel LH, et al. C3 glomerulopathy: a new classification. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(8):494-499. doi: 10.1038/nrneph.2010.85.
40. Dragon-Durey MA, Blanc C, Marinozzi MC, et al. Autoantibodies against complement components and functional consequences. *Mol Immunol*. 2013;56(3):213-221. doi: 10.1016/j.molimm.2013.05.009.
41. Servais A, Noel LH, Roumenina LT, et al. Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. *Kidney Int*. 2012;82(4):454-464. doi: 10.1038/ki.2012.63.
42. Parker CJ. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:21-29. doi: 10.1182/asheducation-2011.1.21.
43. Berentsen S. Role of Complement in Autoimmune Hemolytic Anemia. *Transfus Med Hemother*. 2015;42(5):303-310. doi: 10.1159/000438964.
44. Alexander JJ, Anderson AJ, Barnum SR, et al. The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation — neuro-protection and -degeneration. *J Neurochem*. 2008;107(5):1169-1187. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05668.x.
45. Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:821-852. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115835.
46. Markiewski MM, DeAngelis RA, Lambris JD. Complexity of complement activation in sepsis. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6A):2245-2254. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00504.x.
47. Diepenhorst GM, van Gulik TM, Hack CE. Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg*. 2009;249(6):889-899. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181a38f45.
48. Кокряков В.Н., Алешина Г.М., Берлов М.Н., и др. Антимикробные пептиды животных как молекулярные факторы иммунитета // Российский иммунологический журнал. — 2014. — Т. 8. — № 3. — С. 325–328. [Kokryakov VN, Aleshina GM, Berlov MN, et al. Animal antimicrobial peptides as molecular factors of the immunity. *Russ J Immunol*. 2014;8(3):325-328. (In Russ.)]
49. Otvos L, Jr. Immunomodulatory effects of anti-microbial peptides. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2016;63(3):257-277. doi: 10.1556/030.63.2016.005.
50. Proha'szka Zn, Ne'met K, Csermely Pt, et al. Defensins purified from human granulocytes bind C1q and activate the classical complement pathway like the transmembrane glycoprotein gp41 of HIV-1. *Mol Immunol*. 1997;34(11):809-816. doi: 10.1016/s0161-5890(97)00097-7.
51. Bhat S, Song YH, Lawyer C, Milner SM. Modulation of the complement system by human beta-defensin 2. *J Burns Wounds*. 2007;5:e10.
52. Groeneveld TW, Ramwadhoebe TH, Trouw LA, et al. Human neutrophil peptide-1 inhibits both the classical and the lectin pathway of complement activation. *Mol Immunol*. 2007;44(14):3608-3614. doi: 10.1016/j.molimm.2007.03.003.
53. van den Berg RH, Faber-Krol MC, van Wetering S, et al. Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. *Blood*. 1998;92(10):3898-3903.
54. Chen J, Xu XM, Underhill CB, et al. Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells. *Cancer Res*. 2005;65(11):4614-4622. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2253.

55. Умнякова Е.С., Леонова Т.С., Берлов М.Н., Кокряков В.Н. Взаимодействие антимикробных пептидов с белком комплемента C1q // Медицинский академический журнал. — 2016. — Т. 16. — № 4. — С. 241–242. [Umnyakova ES, Leonova TS, Berlov MN, Kokryakov VN. Vzaimodeystvie antimikrobnnykh peptidov s belkom komplementa C1q. *Medical academic journal*. 2016;16(4):241-242. (In Russ.)]

56. Умнякова Е.С., Берлов М.Н., Кокряков В.Н. Дефенсины как регуляторы системы комплемента // Российский иммунологический журнал. — 2014. — Т. 8. — № 3. — С. 414–417. [Umnyakova ES, Berlov MN, Kokryakov VN. Defensins as regulators of the complement system. *Russ J Immunol*. 2014;8(3):414-417. (In Russ.)]

57. Берлов М.Н., Умнякова Е.С., Леонова Т.С., и др. Взаимодействие ареницина-1 с белком C1q // Биоорганическая химия. — 2015. — Т. 41. — № 6. — С. 664–668. [Berlov MN, Umnyakova ES, Leonova TS, et al. Interaction of arenicin-1 with C1q protein. *Bioorg Khim*. 2015;41(6):664-648. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0132342315060032.

58. Берлов М.Н., Умнякова Е.С., Леонова Т.С., и др. Действие антимикробных пептидов на активацию системы комплемента // Российский иммунологический журнал. — 2016. — Т. 10. — № 2–1. — С. 75–77. [Berlov MN, Umnyakova ES, Leonova TS, et al. Deystvie antimikrobnnykh peptidov na aktivatsiyu sistemy komplementa. *Russ J Immunol*. 2016;10(2-1):75-77. (In Russ.)]

59. Sahu A. Compstatin, a peptide inhibitor of complement, exhibits species-specific binding to complement component C3. *Mol Immunol*. 2003;39(10):557-566. doi: 10.1016/s0161-5890(02)00212-2.

60. Soulika AM, Holland MC, Sfyroera G, et al. Compstatin inhibits complement activation by binding to the beta-chain of complement factor 3. *Mol Immunol*. 2006;43(12):2023-2029. doi: 10.1016/j.molimm.2005.12.002.

Поступила в редакцию: 24.07.2018

Контакт: Екатерина Сергеевна Умнякова; umka-biolog@mail.ru

Сведения об авторах:

Екатерина Сергеевна Умнякова — канд. биол. наук, научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: umka-biolog@mail.ru.

Любовь Дмитриевна Пашинская — студент, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: lubell.96@gmail.com.

Илья Анатольевич Крнев — студент, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: il.krenev13@yandex.ru.

Станислав Вячеславович Легковой — аспирант, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: stanislav.legkovoy@gmail.com.

Михаил Николаевич Берлов — канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; доцент кафедры биохимии биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: berlov@yandex.ru.

Владимир Николаевич Кокряков — д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией общей патологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; профессор кафедры биохимии биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: kokryak@yandex.ru.

Ekaterina S. Umnyakova — PhD in Biological Sciences, Research Fellow, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: umka-biolog@mail.ru.

Lubov Dmitrievna Pashinskaya — student, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: lubell.96@gmail.com.

Ilya A. Krenev — student, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: il.krenev13@yandex.ru.

Stanislav V. Legkovoy — PhD student, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: stanislav.legkovoy@gmail.com.

Mikhail N. Berlov — PhD in Biological Sciences, Senior Research Fellow, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Associate Professor of Biochemistry Department of Biological Faculty, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: berlov@yandex.ru.

Vladimir N. Kokryakov — Doctor of Biological Sciences, Professor, the Head of Laboratory of General Pathology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Professor of Biochemistry Department of Biological Faculty, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: kokryak@yandex.ru.

УДК 616-009.6

РОЛЬ ВОСПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПОЛИНЕВРОПАТИИ ШАРКО – МАРИ – ТУТА

В.Б. Войтенков¹, Е.В. Екушева², Н.В. Скрипченко¹, А.В. Климкин¹

¹ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней
Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации
Федерального медико-биологического агентства», Москва

INFLAMMATORY DISORDERS IN THE PATHOGENESIS OF CHARCOT–MARIE–TOOTH HEREDITARY POLYNEUROPATHY

V.B. Voitenkov¹, E.V. Ekusheva², N.V. Skripchenko¹, A.V. Klimkin¹

¹Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia;

²Advanced Training Institute of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

© Коллектив авторов, 2018

Нами проведен обзор имеющихся данных по патогенезу наследственной моторно-сенсорной полиневропатии Шарко – Мари – Тута. Вопрос о роли в нем воспалительных изменений не до конца изучен. Известна важность процессов перекисного окисления липидов, воспалительных нарушений и увеличения или уменьшения гуморальных факторов воспаления, в том числе цитокинов. Описан ряд случаев сочетания наследственных, острых и хронических воспалительных полиневропатий. Данные патогенетические особенности в случае быстрого ухудшения состояния больных с болезнью Шарко – Мари – Тута позволяют предположить активацию воспалительных процессов, развивается болевой синдром, что нехарактерно для данного заболевания. В этом случае следует рассматривать вопрос о применении у пациентов противовоспалительной терапии.

Ключевые слова: Шарко – Мари – Тут; наследственная полиневропатия; хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия.

In our review, we discuss the inflammatory changes in the pathophysiology of Charcot–Marie–Tooth hereditary polyneuropathy, and this matter is still under further evaluation. Lipid oxidation, inflammatory changes, and blood inflammation agent (e.g., cytokines) concentration changes are important for the pathogenesis of this disorder. Several clinical cases of acute or chronic combination of hereditary and inflammatory polyneuropathies are identified. These clinical cases may be suspected when the typical course of Charcot–Marie–Tooth disease changed to rapid worsening of motor symptoms, inflammatory changes, and pain syndrome. Thus, anti-inflammatory treatment should be considered in these cases.

Keywords: Charcot–Marie–Tooth; hereditary polyneuropathy; chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

Наследственная моторно-сенсорная полиневропатия Шарко – Мари – Тута (ШМТ) представляет собой гетерогенную группу врожденных дегенеративных заболеваний со сходным клиническим фенотипом, характеризующимся комплексным патогенезом, существенной составной частью которого являются воспалительные нарушения [1, 2]. В настоящее время идентифицировано более 80 генов, ассоциированных с развитием этого заболевания [3]. ШМТ традиционно подразделяется на два варианта: демиелинизирующий тип (ШМТ1), для которого характерно существенное замедление скорости проведения импульса (СПИ),

обусловленное демиелинизацией, и нейрональный тип (ШМТ2), при котором наблюдаются нормальные СПИ и аксонопатия [4, 5]. В подавляющем большинстве случаев оба варианта ШМТ наследуются по аутосомно-доминантному типу. В связи со значительным прогрессом в области генетики этого заболевания рассматривается необходимость внедрения новой классификации ШМТ, в основу которой положен генетический принцип [6]. «Золотым стандартом» инструментальной диагностики ШМТ является стимуляционная электронейромиография [7], при которой наблюдаются типичные изменения вызванных моторных ответов

мутазы (СОД) и глутатион-S-трансферазы по сравнению со здоровыми детьми [36].

Активация ПОЛ у пациентов с ШМТ коррелирует с увеличением продукции провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-1b [37]. Существуют экспериментальные доказательства макрофагзависимой стимуляции воспалительных процессов и поражения миелина при ШМТ 1-го типа [38]. Напротив, подавление активности макрофагов в экспериментальных работах на мышцах с моделью ШМТ приводило к респрутингу аксонов и, как следствие, к повышению амплитуды вызванных моторных ответов [39]. По результатам биопсии периферических нервов у больных с ШМТ в ряде случаев обнаруживали макрофаг-ассоциированную демиелинизацию [16].

В ряде работ [34, 40] рассматривается роль хронического окислительного стресса и воспаления в патогенезе прогрессирующей потери мышечных волокон у пациентов с ШМТ, превосходящей способность мышц к возможной регенерации [34, 40]. У всех пациентов мужского пола (100 %) с ШМТ 1-го типа отмечается повышение уровня антител к периферическому миелиновому белку 22 [41].

Представленные патохимические процессы безусловно усугубляют имеющиеся у пациентов с ШМТ нарушения и способствуют дальнейшему прогрессированию этого дегенеративного заболевания. Логично предположить, что снижение интенсивности обнаруженных патологических реакций, например окислительного стресса, может замедлить скорость дегенеративного процесса в нервной системе и окажет положительный клинический эффект. В качестве возможных лекарственных средств, оказывающих влияние на вышеописанные патохимические реакции, в том числе процессы ПОЛ, рассматриваются антиоксиданты. Вместе

с тем согласно данным клинических исследований [42, 43] применение витамина С при ШМТ не имело положительного клинического эффекта, притом что наблюдалась нормализация иммунологических показателей, что, вероятно, связано с недостаточным воздействием витамина С на окислительно-восстановительное равновесие на уровне митохондрий. Применение мелатонина, антиоксидантные, гомеостатические и стресс-протективные свойства которого хорошо известны [44, 45], у детей с ШМТ привело к нормализации уровней СОД и глутатион-S-трансферазы и улучшению клинических показателей [36].

Заключение

Патогенез наследственной моторно-сенсорной полиневропатии Шарко – Мари – Тута изучен не до конца. Известна важность процессов перекисного окисления липидов, воспалительных нарушений и увеличения или уменьшения гуморальных факторов воспаления, в том числе цитокинов. Описан ряд случаев сочетания наследственных, острых и хронических воспалительных полиневропатий. Данные патогенетические особенности заболевания позволяют предположить в случае быстрого ухудшения состояния больных с болезнью Шарко – Мари – Тута активацию воспалительных процессов, развитие болевого синдрома, что нехарактерно для клинического течения заболевания. В этом случае следует рассматривать вопрос о применении у пациентов противовоспалительной терапии.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование не имело финансовой поддержки.

Список литературы

1. Weis J, Claeys KG, Roos A, et al. Towards a functional pathology of hereditary neuropathies. *Acta Neuropathol.* 2017;133(4):493-515. doi: 10.1007/s00401-016-1645-y.
2. Gabriel CM, Gregson NA, Wood NW, Hughes RAC. Immunological Study of Hereditary Motor and Sensory Neuropathy Type 1 A (HMSN1 A). *J Peripher Nerv Syst.* 2002;7(3):206-206. doi: 10.1046/j.1529-8027.2002.02026_6.x.
3. Stojkovic T. Hereditary neuropathies: An update. *Rev Neurol (Paris).* 2016;172(12):775-778. doi: 10.1016/j.neurol.2016.06.007.
4. Jani-Acsadi A, Ounpuu S, Pierz K, Acsadi G. Pediatric Charcot-Marie-Tooth disease. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62(3):767-786. doi: 10.1016/j.pcl.2015.03.012.
5. Dyck PJ. Lower Motor and Primary Sensory Neuron Diseases with Peroneal Muscular Atrophy. *Arch Neurol.* 1968;18(6):619. doi: 10.1001/archneur.1968.00470360041003.
6. Magy L, Mathis S, Le Masson G, et al. Updating the classification of inherited neuropathies: Results of an international survey. *Neurology.* 2018;90(10):e870-e876. doi: 10.1212/WNL.0000000000005074.
7. Команцев В.Н., Скрипченко Н.В., Савина М.В. Клиническая электронейромиография при нейроинфекциях у детей // Педиатр. – 2011. – Т. 2. – № 2. – С. 34–37. [Komantsev VN, Skripchenko NV,

Savina MV. Clinical electroneuromyography in neuroinfections in children. *Pediatrician (Saint Petersburg)*. 2011;2(2):34-37. (In Russ.)

8. Sugimoto T, Ochi K, Hosomi N, et al. Ultrasonographic nerve enlargement of the median and ulnar nerves and the cervical nerve roots in patients with demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease: distinction from patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol*. 2013;260(10):2580-2587. doi: 10.1007/s00415-013-7021-0.

9. Zaidman CM, Harms MB, Pestronk A. Ultrasound of inherited vs. acquired demyelinating polyneuropathies. *J Neurol*. 2013;260(12):3115-3121. doi: 10.1007/s00415-013-7123-8.

10. Вуйцик Н.Б., Четкин А.О., Павлов Э.В., и др. Клинико-ультразвуковые и нейрофизиологические сопоставления при наследственной моторно-сенсорной невропатии // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2014. – Т. 8. – № 4. – С. 9–14. [Vuysik NB, Chechetkin AO, Pavlov EV, et al. Clinical-ultrasound and neurophysiological comparisons in hereditary motor-sensory neuropathy. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy nevrologii*. 2014;8(4):9-14. (In Russ.)]

11. Oka N. Pathology of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Brain Nerve*. 2016;68(1):21-29. doi: 10.11477/mf.1416200342.

12. Салтыкова В.Г. Возможности высокоразрешающего ультразвукового исследования в диагностике болезни Шарко – Мари – Тута // *Ультразвуковая и функциональная диагностика*. – 2015. – № 5S. – С. 154–155. [Saltykova VG. Vozmozhnosti vysokorazreshayushchego ul'trazvukovogo issledovaniya v diagnostike bolezni Sharko-Mari-Tuta. *Ultrasound & functional diagnostics*. 2015;(5S):154-155. (In Russ.)]

13. Глушенко Е.В., Шнайдер Н.А., Кантимирова Е.А., и др. Опыт организации диагностической и медико-социальной помощи больным с наследственной невропатией Шарко – Мари – Тута в Красноярском крае // *Нервно-мышечные болезни*. – 2012. – № 1. – С. 41–53. [Gluschenko EV, Shneider NA, Kantimirova EA, et al. Organization experience of diagnostic and medicosocial services for patients with Charcot-Marie-Tooth disease in Krasnoyarsk region. *Neuromuscular diseases*. 2012;(1):41-53. (In Russ.)]

14. Carvalho AA, Vital A, Ferrer X, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: clinicopathological correlations in 24 patients. *J Peripher Nerv Syst*. 2005;10(1):85-92. doi: 10.1111/j.1085-9489.2005.10112.x.

15. Sinclair CDJ, Miranda MA, Cowley P, et al. MRI shows increased sciatic nerve cross sectional area in inherited and inflammatory neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;82(11):1283-1286. doi: 10.1136/jnnp.2010.211334.

16. Vital A, Vital C, Lagueny A, et al. Inflammatory demyelination in a patient with CMT1A. *Muscle Nerve*. 2003;28(3):373-376. doi: 10.1002/mus.10404.

17. Rajabally YA, Adams D, Latour P, Attarian S. Hereditary and inflammatory neuropathies: a review of reported associations, mimics and misdiagnoses. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(10):1051-1060. doi: 10.1136/jnnp-2015-310835.

18. Fujisawa M, Sano Y, Omoto M, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by homozygous MME gene mutation superimposed by chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Rinsho Shinkeigaku*. 2017;57(9):515-520. doi: 10.5692/clinicalneuro.17-001036.

19. Gazulla J, Almarcegui C, Berciano J. Reversible inflammatory neuropathy superimposed on Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Neurol Sci*. 2018;39(4):793-794. doi: 10.1007/s10072-017-3195-z.

20. Попова Т.Е., Таппахов А.А., Николаева Т.Я., и др. Хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия у пациентки с болезнью Шарко – Мари – Тута 1а типа // *Якутский медицинский журнал*. – 2015. – № 4. – С. 106–109. [Popova TE, Tappakhov AA, Nikolaeva TY, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in a patient with Charcot-Marie-Tooth type 1A disease. *Yakut medical journal*. 2015;(4):106-109. (In Russ.)]

21. Kume K, Deguchi K, Ikeda K, et al. Usefulness of the modified F-ratio for assessments of proximal conduction in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy superimposed on Charcot Marie-Tooth disease type 1A. *J Neurol Sci*. 2014;343(1-2):237-239. doi: 10.1016/j.jns.2014.05.046.

22. Cottenie E, Menezes MP, Rossor AM, et al. Rapidly progressive asymmetrical weakness in Charcot-Marie-Tooth disease type 4J resembles chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neuromuscul Disord*. 2013;23(5):399-403. doi: 10.1016/j.nmd.2013.01.010.

23. Weishaupt JH, Ganser C, Bahr M. Inflammatory demyelinating CNS disorder in a case of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: positive response to natalizumab. *J Neurol*. 2012;259(9):1967-1969. doi: 10.1007/s00415-012-6467-9.

24. Ben Youssef-Turki I, Kraoua I, Gargouri A, et al. [A genetically confirmed CMT1A mimicking relapsing CIDP]. *Rev Neurol (Paris)*. 2011;167(12):958-959. doi: 10.1016/j.neurol.2011.05.004.

25. Marques W, Jr., Funayama CA, Secchin JB, et al. Coexistence of two chronic neuropathies in a young child: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve*. 2010;42(4):598-600. doi: 10.1002/mus.21753.

26. Desurkar A, Lin JP, Mills K, et al. Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease 1A with superimposed inflammatory polyneuropathy in children. *Neuropediatrics*. 2009;40(2):85-88. doi: 10.1055/s-0029-1237720.
27. Houlden H, Laura M, Ginsberg L, et al. The phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4C due to SH3TC2 mutations and possible predisposition to an inflammatory neuropathy. *Neuromuscul Disord*. 2009;19(4):264-269. doi: 10.1016/j.nmd.2009.01.006.
28. Nakai Y, Okumura A, Takada H, et al. Inflammatory pathological changes in a 2-year-old boy with Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain Dev*. 2001;23(4):258-260. doi: 10.1016/s0387-7604(01)00205-4.
29. Malandrini A, Villanova M, Dotti MT, Federico A. Acute inflammatory neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology*. 1999;52(4):859-859. doi: 10.1212/wnl.52.4.859.
30. Martini R, Toyka KV. Immune-mediated components of hereditary demyelinating neuropathies: lessons from animal models and patients. *Lancet Neurol*. 2004;3(8):457-465. doi: 10.1016/s1474-4422(04)00822-1.
31. Ginsberg L, Malik O, Kenton AR, et al. Coexistent hereditary and inflammatory neuropathy. *Brain*. 2004;127(Pt 1):193-202. doi: 10.1093/brain/awh017.
32. Noack R, Frede S, Albrecht P, et al. Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum Mol Genet*. 2012;21(1):150-162. doi: 10.1093/hmg/ddr450.
33. Watila MM, Balarabe SA. Molecular and clinical features of inherited neuropathies due to PMP22 duplication. *J Neurol Sci*. 2015;355(1-2):18-24. doi: 10.1016/j.jns.2015.05.037.
34. Chahbouni M, Lopez MDS, Molina-Carballo A, et al. Melatonin Treatment Reduces Oxidative Damage and Normalizes Plasma Pro-Inflammatory Cytokines in Patients Suffering from Charcot-Marie-Tooth Neuropathy: A Pilot Study in Three Children. *Molecules*. 2017;22(10). doi: 10.3390/molecules22101728.
35. Sun DQ, Li AW, Li J, et al. Changes of lipid peroxidation in carbon disulfide-treated rat nerve tissues and serum. *Chem Biol Interact*. 2009;179(2-3):110-117. doi: 10.1016/j.cbi.2008.11.014.
36. Chahbouni M, Escames G, Venegas C, et al. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res*. 2010;48(3):282-289. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00752.x.
37. Li W, Zhu H, Zhao X, et al. Dysregulated Inflammatory Signaling upon Charcot-Marie-Tooth Type 1C Mutation of SIMPLE Protein. *Mol Cell Biol*. 2015;35(14):2464-2478. doi: 10.1128/MCB.00300-15.
38. Kobsar I, Hasenpusch-Theil K, Wessig C, et al. Evidence for macrophage-mediated myelin disruption in an animal model for Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A. *J Neurosci Res*. 2005;81(6):857-864. doi: 10.1002/jnr.20601.
39. Klein D, Patzko A, Schreiber D, et al. Targeting the colony stimulating factor 1 receptor alleviates two forms of Charcot-Marie-Tooth disease in mice. *Brain*. 2015;138(Pt 11):3193-3205. doi: 10.1093/brain/awv240.
40. Moylan JS, Reid MB. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve*. 2007;35(4):411-429. doi: 10.1002/mus.20743.
41. Da Y, Jia J. Study of antibodies to PMP22, IL-6 and TNF-alpha concentrations in serum in a CMTX1 family. *Neurosci Lett*. 2007;424(2):73-77. doi: 10.1016/j.neulet.2007.06.051.
42. Gutmann L, Shy M. Update on Charcot-Marie-Tooth disease. *Curr Opin Neurol*. 2015;28(5):462-467. doi: 10.1097/WCO.0000000000000237.
43. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, et al. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Sao Paulo Med J*. 2015;133(2):164-165. doi: 10.1590/1516-3180.20151332T1.
44. Anisimov VN, Vinogradova IA, Panchenko AV, et al. Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging. *Curr Aging Sci*. 2012;5(3):170-177.
45. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*. 2016;61(3):253-278. doi: 10.1111/jpi.12360.

Поступила в редакцию: 28.07.2018

Контакт: Владислав Борисович Войтенков; vlad203@inbox.ru

Сведения об авторах:

Владислав Борисович Войтенков — канд. мед. наук, заведующий отделением функциональных методов диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» ФМБА России, Санкт-Петербург. E-mail: vlad203@inbox.ru. orcid.org/0000-0003-0448-7402. РИНЦ id: 643867.

Vladislav B. Voitenkov — MD, PhD, Head of the Department of Functional Diagnostics. Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia. E-mail: vlad203@inbox.ru.

Евгения Викторовна Екушева — д-р мед. наук, профессор, и.о. заведующего кафедрой нервных болезней Института повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург. E-mail: ekushevaev@mail.ru.

Наталья Викторовна Скрипченко — д-р мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней», заслуженный деятель науки РФ, Санкт-Петербург. E-mail: snv@niidi.ru.

Андрей Васильевич Климкин — канд. мед. наук, научный сотрудник отдела лучевых и функциональных методов диагностики ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней», Санкт-Петербург. E-mail: emg.sonography@gmail.com.

Eugenia V. Ekusheva — MD, DM, Professor, Neurology Department Advanced Training Institute of the Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia. E-mail: ekushevaev@mail.ru.

Natalia V. Skripchenko — MD, DM, Professor, Deputy Director of Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia. E-mail: snv@niidi.ru.

Andrey V. Klimkin — MD, PhD, Researcher of Department of Clinical Neurophysiology. Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, Russia. E-mail: emg.sonography@gmail.com.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРАКТИКА

УДК 618.14-002-02:618.7-085.8

ПРИМЕНЕНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ РОДИЛЬНИЦ С ПОСЛЕРОДОВЫМ ЭНДОМЕТРИТОМ

И.А. Верес

Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

APPLICATION OF PHYSICAL FACTORS IN COMPLEX TREATMENT OF PUERPERAS WITH POSTPARTUM ENDOMETRITIS

I.A. Veres

Belarussian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

© И.А. Верес, 2018

Цель исследования — изучение эффективности комплексной терапии послеродового эндометрита (ПЭ) с использованием чрескожного электрофореза метронидазола в основной группе родильниц ($n = 43$; средний возраст — $27,6 \pm 5,2$ года). Пациентки из группы сравнения ($n = 42$; средний возраст — $26,3 \pm 4,1$ года) получали только базисное лечение по протоколу. С помощью клинической балльной шкалы определяли выраженность основных симптомов ПЭ у родильниц в баллах до и после лечения, количественно оценивали эффективность лечения в сравниваемых группах. Показано, что электрофоретическое чрескожное введение метронидазола в сочетании с базисной медикаментозной терапией оказывает выраженное противовоспалительное действие на местном и системном уровнях и снижает риск генерализации инфекции при эндометрите. Установлена высокая терапевтическая эффективность применения электрофореза с метронидазолом в комплексном лечении родильниц по сравнению с базисной терапией ПЭ.

Ключевые слова: послеродовой эндометрит; электрофорез; метронидазол; балльная шкала; клиническая эффективность.

This study aimed to investigate the effectiveness of the complex therapy of postpartum endometritis (PE) using percutaneous electrophoresis of metronidazole in the main group of puerperas ($n = 43$, mean age 27.6 ± 5.2 years). Patients from the comparison group ($n = 42$, mean age 26.3 ± 4.1 years) received only basic treatment according to the protocol. This study determined the severity of the main symptoms of PE in puerperas before and after the treatment using the clinical scale. The effectiveness of the treatment was evaluated quantitatively. Electrophoretic percutaneous administration of metronidazole combined with basic drug therapy exerted a pronounced anti-inflammatory effect at the local and systemic levels and reduced the risk of infection in endometritis. Compared with the basic therapy of PE, the high therapeutic effectiveness of electrophoresis with metronidazole was established.

Keywords: postpartum endometritis; electrophoresis; metronidazole; scoring scale; clinical efficacy.

В соответствии с данными Всемирной организации здравоохранения до 150 тысяч родильниц ежегодно умирает от послеродовых инфекционных осложнений [1], при этом в их структуре эндометрит сохраняет лидирующее положение и служит серьезным препятствием для эффективного восстановления здоровья женщины после родов. Распространенность эндометрита в общей популяции после самопроизвольных родов составляет 3–8 %, при пато-

логических родах — 10–20 %, после экстренной операции кесарева сечения — 15–25 % [2, 3, 14].

Тенденция к увеличению числа послеродовых гнойно-воспалительных заболеваний диктует необходимость разработки новых и совершенствования существующих способов лечения послеродового эндометрита (ПЭ). Использование физических факторов в составе традиционной терапии ПЭ позволяет повысить эффективность лечения путем минимизации

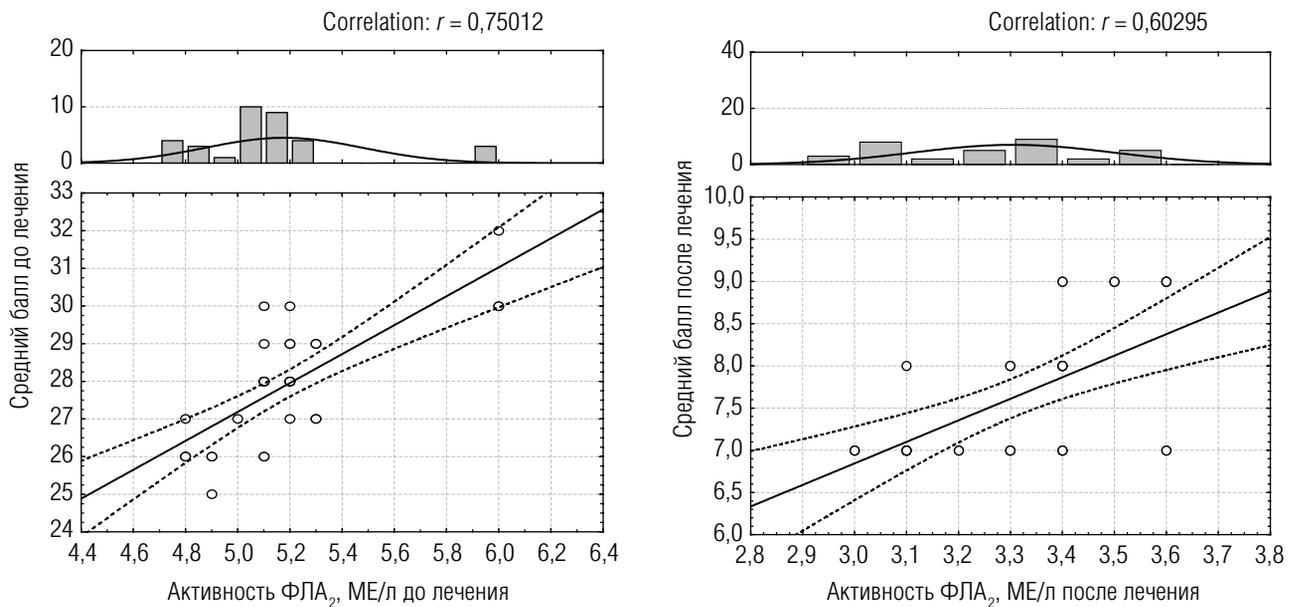


Рис. Корреляционная зависимость между средним баллом выраженности клинической симптоматики и активностью фосфолипазы A_2 (ФЛА $_2$) в основной группе рожениц до и после комплексного лечения послеродового эндометрита

при ПЭ. Применение метода чрескожного электрофореза метронидазола в комплексной терапии ПЭ способствует скорейшей нормализации клинико-лабораторных показателей и регрессу воспалительного очага в матке. При этом активность ФЛА $_2$ служит ценным диагностическим критерием для оценки эффективности проводимого лечения ПЭ. Для практического здравоохранения разработан эффективный, безопасный и не требующий больших материальных затрат метод лечения послеродовых осложнений с применением электрофореза метронидазола, позволяющий повысить эффективность лечения рожениц с ПЭ.

Выводы

1. Включение метода чрескожного электрофореза метронидазола в комплексную терапию ПЭ способствует повышению ее эффективности, что характеризуется нормализацией клинико-лабораторных параметров и снижением выраженности клинической сим-

птоматики заболевания с $28,8 \pm 12,75$ до $7,3 \pm 2,59$ балла ($p < 0,05$), что в 1,7 раза меньше среднего балла в группе сравнения после лечения ($p < 0,05$).

2. Установлена прямая корреляционная взаимосвязь между воспалительным маркером ФЛА $_2$ и суммарным средним баллом на одну пациентку с ПЭ в основной группе ($r = 0,75$; $p = 0,001$) и группе сравнения ($r = 0,68$; $p = 0,003$), что свидетельствует о тесном сопряжении процессов воспаления и выраженности клинической симптоматики у рожениц с эндометритом до начала терапии.
3. Чрескожное электрофоретическое введение метронидазола длительностью 20 мин с плотностью тока $0,05 \text{ мА/см}^2$ ежедневно в течение 6 дней нормализует уровень фосфолипазы A_2 до $3,37 \pm 0,14 \text{ МЕ/л}$, оказывает противовоспалительное действие и патогенетически обосновано, о чем свидетельствует прямая корреляционная зависимость активности фосфолипазы A_2 от выраженности клинической симптоматики после комплексного лечения ПЭ ($r = 0,60$; $p = 0,024$).

Список литературы

1. World Health Organization. Maternal mortality: newsletter. Geneva: WHO; 2018.
2. Анохова Л.И., Белоκριцинская Т.Е., Патеюк А.В., Кохан С.Т. Послеродовой эндометрит и его профилактика (обзор литературы) // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2016. – № 4. – С. 6–13. [Anokhova LI, Belokritsinskaya TE, Pateyuk AV, Kokhan ST. Postnatal endometritis and its prevention (review of literature). *Nauchnoe obozrenie. Meditsinskie nauki*. 2016;(4):6-13. (In Russ.)]
3. Шляпников М.Е., Жестков А.В., Кияшко И.С., и др. Клинико-микробиологическая характеристика и динамические особенности современного течения изолированного и сочетанного с раневой инфекцией пуэрперального эндомиометрита // Вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии. –

2015. – Т. 14. – № 2. – С. 63–69. [Shlyapnikov ME, Zhestkov AV, Kiyashko IS, et al. A clinical and microbiological characteristic and dynamic specificities of the current course of puerperal endomyometritis both isolated and in combination with wound infection. *Problems of gynecology, obstetrics, and perinatology*. 2015;14(2):63-69. (In Russ.)]

4. Тирская Ю.И., Баринов С.В., Долгих Т.И., и др. Прогнозирование и способ профилактики послеродового эндометрита у родильниц инфекционного риска // *Акушерство и гинекология*. – 2014. – № 5. – С. 37–42. [Tirskaya YI, Barinov SV, Dolgikh TI, et al. The prediction of an infection risk and the way to prevent postpartum endometritis in puerperas at risk for infections. *Akush Ginekol (Mosk)*. 2014;(5):37-42. (In Russ.)]

5. Кузьмин В.Н. Новые подходы к лечению воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // *Фарматека*. – 2008. – № 14. – С. 45–48. [Kuzmin VN. Novye podkhody k lecheniyu vospalitel'nykh zabolevaniy organov malogo taza u zhenshchin. *Farmateka*. 2008;(14):45-48. (In Russ.)]

6. Иванова О.В. Комплексный подход в профилактике послеродового эндометрита у родильниц инфекционного риска: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Омск, 2015. [Ivanova OV. Kompleksnyy podkhod v profilaktike poslerodovogo endometrita u rodil'nits infektsionnogo riska. [dissertation] Omsk; 2015. (In Russ.)]

7. Федорова Т.А., Быкова К.Г., Пучко Т.К., Василенко И.А. Внутривенное лазерное освечение крови в комплексной профилактике инфекционно-воспалительных осложнений у родильниц после операции кесарева сечения // *Вестник новых медицинских технологий*. [Электронное издание]. – 2018. – № 1. – С. 76–86. [Fedorova TA, Bykova KG, Puchko TK, Vasilenko IA. Intravenous laser blood illumination in combined prevention of infectious-inflammatory complications in obstetric patients after caesarean section. *Journal of new medical technologies*. 2018;(1):76-86. (In Russ.)]. doi: 10.24411/2075-4094-2018-15960.

8. Меджидова Д.Р. Преимущества применения озонлазерной и лимфотропной терапии в комплексном лечении женщин с послеродовым эндометритом // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2007. – Т. 14. – № 1. – С. 93–95. [Medzhidova DR. Advantages of ozonolaser and lymphotropic therapy s use in integrated treatment of women with postlabour endometriosis. *Journal of new medical technologies*. 2007;14(1):93-95. (In Russ.)]

9. Жаркин Н.А., Кен-Амоа С. Профилактика и лечение эндометрита после кесарева сечения методом вагинальной рефлексотерапии // *Акушерство и гинекология*. – 2007. – № 4. – С. 57–59. [Zhar-kin NA, Ken-Amoa S. The prevention and treatment of endometritis after cesarean section by vaginal reflex therapy. *Akush Ginekol (Mosk)*. 2007;(4):57-59. (In Russ.)]

10. Можейко Л.Ф., Вербицкая М.С., Вербицкий В.С. Прогнозирование и профилактика послеродового эндометрита: инструкция по применению. – Минск: БелМАПО, 2008. [Mozheyko LF, Verbitskaya MS, Verbitskiy VS. Prognozirovanie i profilaktika poslerodovogo endometrita: instruktsiya po primeneniyu. Minsk: BelMAPO; 2008. (In Russ.)]

11. Улащик В.С. Электрофорез лекарственных веществ: руководство для специалистов. – Минск: Белорусская наука, 2010. [Ulashchik VS. Elektroforez lekarstvennykh veshchestv: rukovodstvo dlya spetsialistov. Minsk: Belarusskaya nauka; 2010. (In Russ.)]

12. Стругацкий В.М., Маланова Т.Б., Арсланян К.Н. Физиотерапия в практике акушера-гинеколога. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. [Strugatskiy VM, Malanova TB, Arslanyan KN. Fizioterapiya v praktike akushera-ginekologa. Moscow: MEDpress-inform; 2008. (In Russ.)]

13. Верес И.А. Лечение больных хроническим сальпингоофоритом с применением электрофореза милдроната: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Минск, 2007. [Veres IA. Lechenie bol'nykh khronicheskim sal'pingooforitom s primeneniem elektroforeza mildronata. Minsk; 2007. (In Russ.)]

14. Ордзжоникидзе Н.В., Мешалкина И.В. Современные представления о гнойно-воспалительных осложнениях у родильниц // *Журнал Российского общества акушеров-гинекологов*. – 2006. – № 3. – С. 18–25. [Ordzhonikidze NV, Meshalkina IV. Sovremennye predstavleniya o gnoyno-vospalitel'nykh oslozhnениyakh u rodil'nits. *Zhurnal Rossiyskogo obshchestva akusherov-ginekologov*. 2006;(3):18-25. (In Russ.)]

15. Патент РБ на изобретение № 20882/2017. Бюл. № 2. Верес И.А., Улащик В.С., Войтов В.В. Способ введения метронидазола в организм человека. [Patent RB No. 20882/2017. Byul. No. 2. Veres IA, Ulashchik VS, Voytov VV. Sposob vvedeniya metronidazola v organizm cheloveka. (In Russ.)]

16. Верес И.А. Новый подход для оценки послеродового эндометрита с применением балльной оценки // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. – 2016. – № 1. – С. 25–28. [Veres IA. A new methodology for quantifying postpartum endometritis. *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk)*. 2016;(1):25-28. (In Russ.)]

17. Верес И.А., Камышников В.С., Пересада О.А., и др. Фосфолипаза А₂ и состояние про-/антиоксидантного баланса у родильниц с послеродовым эндометритом // *Лабораторная диагностика*. Восточная

Европа. – 2018. – № 1. – С. 75–82. [Veres IA, Kamyshnikov VS, Peresada OA, et al. Phospholipase A₂ and the state of pro-/antioxidant balance in puerperal with postpartum endometritis. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2018;(1):75-82. (In Russ.)]

18. Tappia PS, Dhalla NS. Phospholipases in Health and Disease. New York: Springer; 2014.

19. Ишутина Н.А. Активность фосфолипазы A₂ и состояние процессов перекисного окисления липидов в периферической крови у беременных с герпесвирусной инфекцией // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 2. – С. 12–14. [Ishutina NA. Activity of phospholipase A₂ and the state of processes of lipid peroxidation in peripheral blood in pregnant women with herpes-viral infection. *Advances in current natural sciences*. 2013;(2):12-14. (In Russ.)]

Поступила в редакцию: 24.07.2018

Контакт: Ирина Анатольевна Верес; veres.irochka@mail.ru

Сведения об авторе:

Ирина Анатольевна Верес — канд. мед. наук, ассистент кафедры акушерства и гинекологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Беларусь. E-mail: veres.irochka@mail.ru.

Irina A. Veres — PhD in medicine, Assistant of the Department of Obstetrics and Gynecology of Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus. E-mail: veres.irochka@mail.ru.

УДК 606, 617

ВНУТРИПОРТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ В ЛИСТЕ ОЖИДАНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

Д.А. Гранов, А.Р. Шералиев, О.А. Герасимова, А.А. Поликарпов

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова»
МЗ РФ, Санкт-Петербург

INTRAPORTAL THERAPY OF AUTOLOGOUS BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS IN PATIENTS ON THE WAITING LIST FOR LIVER TRANSPLANTATION

D.A. Granov, A.R. Sheraliev, O.A. Gerasimova, A.A. Polikarpov

A.M. Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russia

© Коллектив авторов, 2018

Данная работа посвящена исследованию особенностей методики внутриворотальной введения мононуклеарных клеток (МНК) аутологичного костного мозга человека у пациентов из листа ожидания трансплантации печени. В исследование были включены 8 пациентов. Показатель печеночной недостаточности по шкале MELD превышал 10 баллов (от 12 до 22 баллов), а по критерию Child-Turcotte-Pugh тяжесть печеночной недостаточности соответствовала классам В и С. Методом билатеральной трепан-аспирации из заднего гребня подвздошной кости получали от 224 до 320 мл аспирата аутологичного костного мозга, объем фракции МНК составил от 47,1 до 58,3 мл (медиана — 47 мл). Абсолютное количество полученных жизнеспособных МНК равнялось $1,24 \cdot 10^9$ – $5,84 \cdot 10^9$, а CD34⁺-клеток — $2,54 \cdot 10^6$ – $48,20 \cdot 10^6$. После катетеризации воротальной вены и прямой портографии во всех случаях отмечено наличие венозных коллатералей. Для определения оптимальной скорости селективной перфузии сегментарных ветвей воротальной вены выполняли портофлоуметрию. Инфузию в воротальную вену осуществляли со скоростью 0,3–1,5 мл/с. Во время процедуры получения костного мозга и введения МНК серьезных нежелательных явлений отмечено не было. У всех пациентов в период 3 мес. наблюдения после введения МНК зафиксирована стабилизация цирроза печени — отсутствие ухудшения исходного статуса по данным показателей MELD и Child-Turcotte-Pugh. Наблюдалось улучшение соматического статуса по опроснику SF-36.

В исследовании доказана безопасность внутриворотальной терапии МНК у пациентов в листе ожидания трансплантации печени, продемонстрирована методика таргетной доставки МНК аутологичного костного мозга в печень, позволяющая минимизировать их потерю при внутриворотальном способе введения. Для оценки эффективности воздействия мононуклеарных клеток аутологичного костного мозга требуется увеличение выборки пациентов, сроков наблюдения и дальнейшее совершенствование данной методики.

Ключевые слова: мононуклеарные клетки аутологичного костного мозга (МНК); внутриворотальное введение; костный мозг; портофлоуметрия; цирроз печени; трансплантация печени.

This study was carried out to explore the methodology of intraportal infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in patients in the waiting list for liver transplantation. The study included eight patients. The Model for End-Stage Liver Disease (MELD) score as a predictor of hepatic failure exceeds 10 points, i.e., 12–22 points. According to Child–Turcotte–Pugh (CTP) classification, the severity of cirrhosis ranged from class B to C. The bone marrow volume of 224–320 ml was harvested by bilateral aspiration from the posterior iliac crest. The total volume of the mononuclear cells (MNC) was 47.1–58.3 ml (median, 47 ml). The absolute viable count of isolated MNC was $1.24 \cdot 10^9$ – $5.84 \cdot 10^9$ and CD34⁺ cells $2.54 \cdot 10^6$ – $48.20 \cdot 10^6$. After portal vein catheterization, direct transhepatic portography was performed, and portosystemic collaterals were found in all cases. Portal flowmetry was performed to determine the optimal selective perfusion rate of the segmental branches of the portal vein. Portal vein infusion was performed at 0.3–1.5 ml/sec. Serious side effects were not detected during bone

Катетеризация портальной вены несет определенный риск кровотечения в условиях асцита и умеренной коагулопатии у пациентов с ЦП. Однако предварительная эвакуация асцита, применение методики пломбировки пункционного канала гемостатической губкой позволяют минимизировать геморрагические осложнения. Изучив особенности внутриворотальной введения МНК аутологичного костного мозга, мы подтвердили наличие портальной гипертензии с формированием венозных коллатералей и изменение портальной гемодинамики. В связи с этим возник вопрос инфузии и селективной доставки в печень МНК в этих условиях. Для решения этой проблемы экспериментальным путем после проведения прямой портографии с помощью предварительной портофлуометрии мы устанавливали оптимальную скорость селективной перфузии сегментарных ветвей воротной вены для каждого пациента, что позволило избежать потери клеток по внепеченочным венозным коллатералям (см. табл. 2, рис. 2, 3). Необходимо отметить, что при внутриворотальном и внутриартериальном введении гемопоэтических и мезенхимных стволовых клеток аутологичного костного мозга в ранее проведенных исследованиях авторы не рассматривали актуальность скорости введения клеток.

Таким образом, нами апробирована персонализированная методика введения предварительно подготовленного аутологичного клеточного материала в воротную вену реципиента

с учетом особенностей портальной гемодинамики и оптимальной скорости селективной перфузии сегментарных ветвей воротной вены.

Заключение

В исследовании доказана безопасность внутриворотальной терапии МНК у пациентов в листе ожидания ТП. Продемонстрирована методика таргетной доставки МНК аутологичного костного мозга в печень, позволяющая минимизировать их потерю при внутриворотальном способе введения. Для оценки эффективности воздействия мононуклеарных клеток аутологичного костного мозга требуется увеличение выборки пациентов, сроков наблюдения и дальнейшее усовершенствование данной методики.

Благодарность

Авторы выражают благодарность за получение МНК аутологичного костного мозга и проведение внутриворотальной терапии ООО «Покровский банк стволовых клеток» (Санкт-Петербург) и группе специалистов рентгенэндоваскулярной методики диагностики и лечения ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ — А.С. Полехину, А.В. Моисеенко, врачу-хирургу группы трансплантации, канд. мед. наук И.И. Тилеуберганову. Также авторы выражают благодарность заведующему лаборатории иммуногистохимии центра д-ру мед. наук Г.А. Раскину.

Список литературы

1. Шевела Е.Я., Старостина Н.М., Пальцев А.И., и др. Эффективность клеточной терапии при циррозе печени // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2015. — № 4. — С. 232–138. [Shevela EY, Starostina NM, Pal'tsev AI, et al. Effektivnost' kletochnoy terapii pri tsirroze pecheni. *Kletochnyye tekhnologii v biologii i meditsine*. 2015;(4):232-138. (In Russ.)]
2. Готье С.В., Хомяков С.М. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2016 году // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2017. — Т. 19. — № 2. — С. 6–26. [Gautier SV, Khomyakov SM. Donorstvo i transplantatsiya organov v Rossiyskoy Federatsii v 2016 godu. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2017;19(2):6-26. (In Russ.)]
3. Andreone P, Catani L, Margini C, et al. Reinfusion of highly purified CD133⁺ bone marrow-derived stem/progenitor cells in patients with end-stage liver disease: A phase I clinical trial. *Dig Liver Dis*. 2015;47(12):1059-1066. doi: 10.1016/j.dld.2015.08.018.
4. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 2003;422(6934):901-904. doi: 10.1038/nature01539.
5. Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, et al. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2003;21(1):98-104. doi: 10.1634/stemcells.21-1-98.
6. am Esch JS, 2nd, Knoefel WT, Klein M, et al. Portal application of autologous CD133⁺ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells*. 2005;23(4):463-470. doi: 10.1634/stemcells.2004-0283.
7. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004;40(6):1275-1284. doi: 10.1002/hep.20469.
8. Peng L, Xie DY, Lin BL, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology*. 2011;54(3):820-828. doi: 10.1002/hep.24434.

9. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*. 2000;406(6793):257. doi: 10.1038/35018642.
10. Levicar N, Pai M, Habib NA, et al. Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34⁺ cells in patients with chronic liver disease. *Cell Prolif*. 2008;41 Suppl 1:115-125. doi: 10.1111/j.1365-2184.2008.00491.x.
11. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-1298. doi: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1.
12. Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*. 2006;24(10):2292-2298. doi: 10.1634/stemcells.2005-0542.
13. Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. 2005;106(2):756-763. doi: 10.1182/blood-2005-02-0572.

Поступила в редакцию: 29.07.2018

Контакт: Аслан Рахимджонович Шералиев; sherali.aslan@gmail.com

Сведения об авторах:

Дмитрий Анатольевич Гранов — д-р мед. наук, профессор, член-кор. РАН, научный руководитель ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ, Санкт-Петербург.

Аслан Рахимджонович Шералиев — аспирант, врач-хирург отделения хирургии № 1 ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ, Санкт-Петербург. E-mail: sherali.aslan@gmail.com.

Ольга Анатольевна Герасимова — д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ, Санкт-Петербург. E-mail: ren321@mail.ru.

Алексей Александрович Поликарпов — д-р мед. наук, врач отделения ангиографии, профессор кафедры радиологии и хирургических технологий ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ, Санкт-Петербург.

Dmitrii A. Granov — Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member the RAS, Academic Adviser of A.M. Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russia. E-mail: dmitriigranov@gmail.com.

Aslan R. Sheraliev — PhD student, Surgeon in the Surgery Unit No. 1 of A.M. Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russia. E-mail: sherali.aslan@gmail.com.

Olga A. Gerasimova — Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher of A.M. Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russia. E-mail: ren321@mail.ru.

Aleksey A. Polikarpov — Doctor in the Angiography Unit, Professor of Department of Radiology and Surgical Technologies A.M. Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russia.

УДК 616.8

ОСОБЕННОСТИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С МИАСТЕНИЕЙ

*С.А. Налькин, С.В. Лобзин, М.Г. Соколова*ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»,
Санкт-Петербург

COGNITIVE FUNCTION IN PATIENTS WITH MYASTHENIA GRAVIS

S.A. Nalkin, S.V. Lobzin, M.G. Sokolova

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

© С.А. Налькин, С.В. Лобзин, М.Г. Соколова, 2018

В статье приведены результаты комплексного нейропсихологического обследования больных миастенией, которое выявило интеллектуально-мнестические расстройства в 36,6 % случаев: нарушения процессов запоминания, снижение объема кратковременной памяти, более быструю истощаемость внимания. Было установлено, что у больных миастенией с тимомой (до проведения тимэктомии) и у пациентов с длительностью заболевания более 10 лет наблюдались более выраженные нарушения памяти и внимания ($p < 0,05$).

Ключевые слова: миастения; когнитивные нарушения; базальная холинергическая система головного мозга; ацетилхолиновые рецепторы; нейропсихологическое обследование.

The study presents the results of a complex neuropsychological examination of patients with myasthenia gravis, which revealed intellectual disorders in 36.6% of cases, i.e., violations of memory processes, decreasing short-term memory level, and rapid deterioration of attention. A study of patients with myasthenia gravis with thymoma (before thymectomy) and patients with disease duration of more than 10 years found more pronounced memory and attention disorders ($p < 0.05$).

Keywords: myasthenia gravis; cognitive impairment; basal forebrain cholinergic system; acetylcholine receptor; neuropsychological examination.

Миастения — хроническое аутоиммунное заболевание, характеризующееся преходящей слабостью и утомляемостью скелетных мышц вследствие выработки антител к различным антигенным мишеням нервно-мышечного синапса [1, 2].

Заболевание может манифестировать в любом возрасте, во многих случаях приводит к инвалидизации и потере трудоспособности, в связи с чем остается актуальной проблемой с множеством нерешенных вопросов в отношении не только этиологии и патогенеза, но и клинической картины заболевания [3, 4]. В последние годы широко изучаются вопросы, касающиеся оценки когнитивных функций при миастении. Известно, что в гипоталамусе, гиппокампальной извилине, среднем мозге, коре головного мозга имеются ацетилхолиновые рецепторы, структурно и генетически сходные с рецепторами на постсинаптической мембране нервно-мышечного синапса [5, 6]. Однако до настоящего времени обсуждается вопрос о возможности взаимодействия циркулирующих в крови антител с нейрональными холи-

норецепторами [7]. Были выявлены косвенные признаки дисфункции базальной холинергической системы головного мозга по данным пупиллометрии и при помощи метода когнитивных вызванных потенциалов головного мозга [8, 9]. Другие авторы придерживаются мнения, что из-за сверхмалой концентрации антител в ликворе и структурных особенностей нейрональных холинорецепторов их взаимодействие маловероятно [10].

М.В. Eizaguirre et al. (2017) [11] обнаружили высокую распространенность когнитивных расстройств у пациентов с миастенией. Среди обследованных 24 больных нарушения внимания были отмечены в 37,5 %, вербальной памяти — в 33,3 %, исполнительных функций — в 29,2 % случаев. Достоверные различия получены при сравнении показателей долговременной памяти, отсроченного воспроизведения и теста аналогий с результатами здоровых людей.

Согласно результатам исследований когнитивные функции при миастении могут быть абсолютно сохранными и иметь выраженные

у 83,3 % пациентов, умеренные — у 16,7 %. В группе контроля когнитивные нарушения диагностированы у 33,3 % испытуемых, из них легкие нарушения выявлены у 80,0 % обследованных, умеренные — у 20,0 %. Случаев деменции зафиксировано не было. Однако у больных с тимомой до выполнения тимэктомии и у пациентов с длительностью заболевания более 10 лет наблюдались более выраженные нарушения памяти и внимания ($p < 0,05$).

Заключение

Таким образом, на основании проведенного исследования установлено, что у больных миастенией имеются легкие нейродинамические нарушения, проявляющиеся в виде снижения объема кратковременной памяти, более бы-

строй истощаемости внимания и нарушения процессов запоминания. Случаев развития тяжелых когнитивных нарушений среди исследованных пациентов зарегистрировано не было, однако вследствие более тонкой организации и особенностей анатомического строения нарушения функции памяти и внимания могут развиваться при миастении уже на ранних этапах заболевания. Данные нарушения могут оставаться вне поля зрения как клинициста, так и самого пациента и выявляются лишь при углубленном нейропсихологическом тестировании. Однако подобные изменения могут накладывать ограничения на профессиональную деятельность, связанную с быстротой принятия решений и запоминания большого объема информации, что обуславливает необходимость их выявления и коррекции.

Список литературы

1. Санадзе А.Г. Миастения и миастенические синдромы. — 2-е изд. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. [Sanadze AG. Miasteniya i miastenicheskie sindromy. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2017. (In Russ.)]
2. Миастения: диагностика и лечение / Под ред. С.В. Лобзина. — СПб.: СпецЛит, 2015. [Miasteniya i miastenicheskie sindromy. Ed by S.V. Lobzin. Saint Petersburg: SpetsLit; 2015. (In Russ.)]
3. Косачев В.Д., Алексеева Т.М., Лобзин С.В., и др. Отдаленные результаты хирургического лечения миастении // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. — 2016. — Т. 8. — № 3. — С. 19–23. [Kosachev VD, Alekseeva TM, Lobzin SV, et al. Long-term results of surgical treatment of myasthenia. *Herald of the Northwestern State Medical University named after I.I. Mechnikov*. 2016;8(3):19-23. (In Russ.)]
4. Косачев В.Д., Соколова М.Г. Миастения (клиническая картина, диагностика, лечение). — СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2013. [Kosachev VD, Sokolova MG. Miasteniya (klinicheskaya kartina, diagnostika, lechenie). Saint Petersburg: Izdatel'stvo SZGMU im. I.I. Mechnikova; 2013. (In Russ.)]
5. Joshi D, Bhatia M, Gupta S, et al. Cognitive evaluation in myasthenia gravis: A P300 and neuropsychological study. *Neurol Asia*. 2006;(11):97-102.
6. Yakel JL. Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease. *Pflugers Arch*. 2013;465(4):441-450. doi: 10.1007/s00424-012-1200-1.
7. Wonnacott S, Bermudez I, Millar NS, Tzartos SJ. Nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol*. 2018;175(11):1785-1788. doi: 10.1111/bph.14209.
8. Kaltsatou A, Fotiou D, Tsiptios D, Orologas A. Cognitive impairment as a central cholinergic deficit in patients with Myasthenia Gravis. *BBA Clin*. 2015;3:299-303. doi: 10.1016/j.bbacli.2015.04.003.
9. Hamed S, Mohamed M, Youssef A, et al. Assessment of cognitive function in patients with myasthenia gravis. *Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2014;1(3):141. doi: 10.4103/2347-8659.143671.
10. Marra C, Marsili F, Quaranta D, Evoli A. Determinants of cognitive impairment in elderly myasthenia gravis patients. *Muscle Nerve*. 2009;40(6):952-959. doi: 10.1002/mus.21478.
11. Eizaguirre MB, Aguirre F, Yastremiz C, et al. Neuropsychological performance in patients with myasthenia gravis. *Medicina*. 2017;77(2):117-120.
12. Paul RH, Cohen RA, Gilchrist JM, et al. Cognitive dysfunction in individuals with myasthenia gravis. *J Neurol Sci*. 2000;179(1-2):59-64. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00367-1.
13. Mao Z, Yin J, Lu Z, Hu X. Association between myasthenia gravis and cognitive function: A systematic review and meta-analysis. *Ann Indian Acad Neurol*. 2015;18(2):131-137. doi: 10.4103/0972-2327.156560.
14. Jordan B, Schweden TLK, Mehl T, et al. Cognitive fatigue in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2017;56(3):449-457. doi: 10.1002/mus.25540.
15. Соколова, М.Г., Лобзин С.В., Никишина О.А., и др. К вопросу о патогенезе когнитивных расстройств при мышечной дистрофии Дюшенна в клинико-лабораторном и молекулярно-генетическом исследовании // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2017. — Т. 117. — № 12. — С. 78–84. [Sokolova MG, Lobzin SV, Nikishina OA, et al. Pathogenesis of cognitive disorders in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2017;117(12):78-84. (In Russ.)]

16. Kurlowicz L, Wallace M. The Mini-Mental State Examination (MMSE). *J Gerontol Nurs.* 1999;25(5):8-9. doi: 10.3928/0098-9134-19990501-08.
17. Cunha PJ, Nicastrì S, de Andrade AG, Bolla KI. The frontal assessment battery (FAB) reveals neurocognitive dysfunction in substance-dependent individuals in distinct executive domains: Abstract reasoning, motor programming, and cognitive flexibility. *Addict Behav.* 2010;35(10):875-881. doi: 10.1016/j.addbeh.2010.05.005.
18. Manos PJ. 10-Point Clock Test Screens for Cognitive Impairment in Clinic and Hospital Settings. *Psychiatr Times.* 1998;15(10):18-21.
19. Вартанов А.В., Козловский С.А., Скворцова В.Б., и др. Память человека и анатомические особенности гиппокампа // Вестник Московского университета. Серия 14: Психология. — 2009. — № 4. — С. 3–16. [Vartanov AV, Kozlovskiy SA, Skvortsova VB, et al. Human memory and anatomic features of the hippocampus. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 14: Psikhologiya.* 2009;(4):3-16. (In Russ.)]
20. Ахметзянова А.И. Практикум по клинической психологии. Учебно-методическое пособие. — М.: Школьная пресса, 2013. [Akhmetzyanova AI. *Praktikum po klinicheskoy psikhologii. Uchebno-metodicheskoe posobie.* Moscow: Shkol'naya pressa; 2013. (In Russ.)]
21. Малкина-Пых И.Г. Психосоматика: Справочник практического психолога. — М.: Эксмо, 2005. [Malkina-Pykh IG. *Psikhosomatika: Spravochnik prakticheskogo psikhologa.* Moscow: Eksmo; 2005. (In Russ.)]

Поступила в редакцию: 10.07.2018

Контакт: Сергей Алексеевич Налькин; nerv-spb@ya.ru

Сведения об авторах:

Сергей Алексеевич Налькин — аспирант кафедры неврологии им. акад. С.Н. Давиденкова, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова». E-mail: nerv-spb@ya.ru.

Сергей Владимирович Лобзин — д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой неврологии им. акад. С.Н. Давиденкова, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова». E-mail: lobzin@szgmu.ru.

Мария Георгиевна Соколова — канд. мед. наук, доцент кафедры неврологии им. акад. С.Н. Давиденкова, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова». E-mail: sokolova.m08@mail.ru.

Sergei A. Nalkin — Postgraduate Student Department of Neurology named after acad. S.N. Davidenkov, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. E-mail: nerv-spb@ya.ru.

Sergey V. Lobzin — Doctor of Medical Science, Professor, Head of Department of Neurology named after acad. S.N. Davidenkov, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. E-mail: lobzin@szgmu.ru.

Maria G. Sokolova — Candidate of Medical Sciences, Associate Professor Department of Neurology named after acad. S.N. Davidenkov, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. E-mail: sokolova.m08@mail.ru.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 576.08

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ НЕЙРОНОВ И АСТРОЦИТОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫСЫ

Ю.А. Калинина^{1,2}, Д.А. Суфиева^{1,3}

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

²ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург;

³Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (ИЭФБ РАН), Санкт-Петербург

IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD OF SIMULTANEOUS DETECTION OF NEURONS AND ASTROCYTES IN THE RAT BRAIN

Yu.A. Kalinina^{1,2}, D.A. Sufieva^{1,3}

¹Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

²Trans-Technologies, Ltd, Saint Petersburg, Russia;

³Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences,
Saint Petersburg, Russia

© Ю.А. Калинина, Д.А. Суфиева, 2018

Цель настоящего исследования состояла в разработке метода одновременной иммуногистохимической детекции нейронов и астроцитов с использованием пероксидазной метки с последующим анализом при помощи микроскопии в проходящем свете. Для этого была выбрана пара антигенов, каждый из которых специфически выявляет либо только нейроны, либо астроциты (в качестве маркеров были использованы ядерный белок нервных клеток (NeuN) и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) соответственно). Данная методика дает возможность не только идентифицировать исследуемые клетки, но и оценивать их функциональное состояние как в норме, так и при патологических воздействиях. Предложенный протокол окраски позволяет значительно упростить и оптимизировать процесс обнаружения одновременно двух антигенов на препарате и способствует повышению качества получаемых препаратов.

Ключевые слова: ядерный белок нервных клеток (NeuN); глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP); иммуногистохимия; световая микроскопия.

This study aimed to develop a method of simultaneous immunohistochemical detection of neurons and astrocytes using peroxidase labeling with subsequent analysis by light microscopy. A pair of antigens, each of which specifically identifies either neurons or astrocytes, was chosen (as markers neuronal nuclear antigen and glial fibrillary acidic protein were used, respectively). This method not only identifies the studied cells, but it also assesses their functional state under normal and pathological conditions. The proposed staining protocol allows significant simplification and optimization to simultaneously detect two antigens and to improve the quality of the slices obtained.

Keywords: neuronal nuclear antigen (NeuN); glial fibrillary acidic protein (GFAP); immunohistochemistry; light microscopy.

Введение

В настоящее время нередко возникает необходимость в выявлении одновременно нескольких антигенов на одном препарате для визуализации различных популяций клеток в ткани или оценки колокализации двух антигенов. Как правило, для решения этих задач применяют методы флуоресцентной микроскопии [1, 2], однако они весьма дорогостоящие

и требуют обработки препаратов по длительному протоколу. Более быстрым и дешевым методом является метод иммуногистохимии (ИГХ) с применением ферментных меток с последующим анализом при помощи микроскопии в проходящем свете. В этом случае одновременная визуализация двух антигенов может осуществляться несколькими способами: с использованием первичных антител разной ви-

окраски. Во-вторых, повышается качество самих препаратов, так как при долгой обработке препаратов в первичных антителах возникает необходимость снижать температуру инкубации, и это способствует лучшему удержанию срезов на стеклах, в отличие от инкубации при более высоких температурах. Также необходимо учитывать, что в предложенном протоколе демаскирование антигенов происходит в щадящем режиме — варка препаратов занимает 20 минут, что тоже способствует сохранению срезов в процессе обработки.

Помимо этого в постановке ИГХ-реакции важным аспектом является фиксация материала и сохранность тканевых антигенов. В настоящем исследовании сравнивали две фиксирующие жидкости — 4 % параформальдегид (ПФА) и цинк-этанол-формальдегид (ЦЭФ). При анализе материала, фиксированного в 4 % ПФА и окрашенного иммуногистохимически на NeuN и GFAP, было установлено, что реакция на NeuN значительно слабее по сравнению с GFAP, в то время как материал, фиксированный в ЦЭФ, дает одинаково интенсивную реакцию на оба антигена, что говорит о большей эффективности данного фиксатора по сравнению с ПФА для ИГХ-исследования. Высокая сохранность антигенных детерминант была показана при сравнении ЦЭФ и с другими фиксаторами (10 % формалин, 96 % этанол, жидкость Буэна). Кроме того, было продемонстрировано, что использование ЦЭФ для определенных антигенов позволяет избежать процедуры теплового демаскирования антигенов, что

дает возможность упростить и сократить протокол обработки препаратов [9]. Таким образом, фиксация материала в ЦЭФ значительно повышает чувствительность и эффективность иммуногистохимического метода.

Заключение

В работе рассмотрен новый способ иммуногистохимического определения двух антигенов (NeuN и GFAP) при помощи пероксидазной метки, который позволяет одновременно выявлять нейроны, астроциты и кровеносные сосуды. Эта методика значительно упрощает процесс обнаружения одновременно двух антигенов на препарате и способствует оптимизации процесса окрашивания и повышению качества получаемых препаратов. Кроме того, данное окрашивание дает возможность оценивать функциональное состояние нейронов и астроцитов и степень повреждения нервной ткани в ответ на патологическое воздействие, что можно использовать в гистологической практике. При сравнении материала, фиксированного в двух разных фиксаторах (4 % ПФА и ЦЭФ), было показано, что ЦЭФ повышал чувствительность и эффективность реакции, в связи с чем данный фиксатор может быть рекомендован для проведения иммуногистохимического окрашивания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00134.

Список литературы

1. Romijn HJ, van Uum JF, Breedijk I, et al. Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(2):229-236. doi: 10.1177/002215549904700211.
2. Schulze W, Hayata-Takano A, Kamo T, et al. Simultaneous neuron- and astrocyte-specific fluorescent marking. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;459(1):81-86. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.073.
3. Гиляров А.В., Кирик О.В., Коржевский Д.Э. Сравнительный анализ методологических подходов, применяемых для одновременного выявления нескольких антигенов при иммуногистохимическом исследовании // Морфология. — 2010. — Т. 138. — № 5. — С. 59–64. [Gilyarov AV, Kirik OV, Korzhevskii DE. Comparative analysis of methodological approaches applied for the simultaneous demonstration of several antigens in immunohistochemical studies. *Morfologiya.* 2010;138(5):59-64. (In Russ.)]
4. Duan W, Zhang YP, Hou Z, et al. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol.* 2016;53(3):1637-1647. doi: 10.1007/s12035-015-9122-5.
5. Сухорукова Е.Г., Кирик О.В., Зеленкова Н.М., Коржевский Д.Э. Нейрональный ядерный антиген NeuN — показатель сохранности нервной ткани и пригодности ее для иммуногистохимического исследования // Медицинский академический журнал. — 2015. — Т. 15. — № 1. — С. 63–67. [Sukhorukova EG, Kirik OV, Zelenkova NM, Korzhevskii DE. Neuronal nuclear antigen NeuN as an indicator of the nervous tissue preservation and suitability for immunocytochemical study. *Medical academic journal.* 2015;15(1):63-67. (In Russ.)]
6. Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 2015;38(6):364-374. doi: 10.1016/j.tins.2015.04.003.

7. Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э., Алексеева О.С. Глиальный фибриллярный кислый белок — компонент промежуточных филаментов астроцитов мозга позвоночных // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2015. — Т. 51. — № 1. — С. 3–10. [Sukhorukova EG, Korzhevskii DE, Alekseeva OS. Glial fibrillary acidic protein: The component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes. *Zh Evol Biokhim Fiziol.* 2015;51(1):3-10. (In Russ.)]
8. Кирик О.В., Суфиева Д.А. GFAP-иммунопозитивные клетки в составе эпендимы III желудочка головного мозга крысы // Медицинский академический журнал. — 2017. — Т. 17. — № 3. — С. 32–37. [Kirik OV, Sufieva DA. GFAP-immunopositive cells among ependymocytes of the third ventricle of the rat brain. *Medical academic journal.* 2017;17(3):32-37. (In Russ.)]
9. Korzhevskii DE, Sukhorukova EG, Gilerovich EG, et al. Advantages and Disadvantages of Zinc-Ethanol-Formaldehyde as a Fixative for Immunocytochemical Studies and Confocal Laser Microscopy. *Neurosci Behav Physiol.* 2014;44(5):542-545. doi: 10.1007/s11055-014-9948-8.
10. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998.
11. Garcia-Cabezas MA, John YJ, Barbas H, Zikopoulos B. Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Front Neuroanat.* 2016;10:107. doi: 10.3389/fnana.2016.00107.
12. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В., и др. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии: руководство / Под ред. Д.Э. Коржевского. — СПб.: СпецЛит, 2013. [Korzhevskii DE, Gilerovich EG, Kirik OV, et al. Morfolo-gicheskaya diagnostika. Podgotovka materiala dlya gistologicheskogo issledovaniya i elektronnoy mikroskopii: rukovodstvo. Ed by D.E. Korzhevskii. Saint Petersburg: SpetsLit; 2013. (In Russ.)]
13. Гусельникова В.В., Коржевский Д.Э. NeuN — нейрональный ядерный антиген и маркер дифференцировки нервных клеток // Acta Naturae. — 2015. — Т. 7. — № 2. — С. 46–51. [Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN as neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae.* 2015;7(2):46-51. (In Russ.)]
14. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
15. Коржевский Д.Э., Ленцман М.В., Гиляров А.В., и др. Морфологические проявления локальной функциональной активации астроцитов, вызванной кратковременной общей ишемией головного мозга // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2007. — Т. 43. — № 5. — С. 423–426. [Korzhevskii DE, Gilyarov AV, Otellin VA, et al. Morphological manifestations of local functional activation of astrocytes induced by transient global cerebral ischemia. *Zh Evol Biokhim Fiziol.* 2007;43(5):423-426. (In Russ.)]
16. Panickar KS, Norenberg MD. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia.* 2005;50(4):287-298. doi: 10.1002/glia.20181.

Поступила в редакцию: 24.07.2018

Контакт: Юлия Александровна Калинина; taminkina.yulia@gmail.com

Сведения об авторах:

Юлия Александровна Калинина — аспирант лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; научный сотрудник научно-исследовательского отдела ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург. E-mail: taminkina.yulia@gmail.com.

Дина Азатовна Суфиева — аспирант, научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы Отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», ст. лаборант-исследователь Лаборатории сравнительной биохимии неорганических ионов ИЭФБ РАН, Санкт-Петербург. E-mail: dinobrione@gmail.com.

Yuliya A. Kalinina — Research Fellow, Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Specific Morphology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg; Research Associate, R&D Department, Trans-Technology, LLC, Saint Petersburg, Russia. E-mail: taminkina.yulia@gmail.com.

Dina A. Sufieva — Research Fellow, Research Associate, Laboratory of Functional Morphology of Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Specific Morphology, Institute of Experimental Medicine, Research Assistant, Laboratory of Comparative Biochemistry of Inorganic Ions IEPHB RAS, Saint Petersburg, Russia. E-mail: dinobrione@gmail.com.

УДК 616.34-006.6

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ АДЕНОКАРЦИНОМ: ОБЪЕКТИВИЗАЦИЯ КРИТЕРИЕВ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ

Д.П. Ковтун^{1,2}, Н.М. Аничков², О.Г. Полушин¹, Е.В. Пономарева¹,
А.И. Любимов³, Е.Ю. Калинина²

¹СПбГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер», Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»,
Санкт-Петербург;

³ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», Санкт-Петербург

PROLIFERATIVE ACTIVITY OF COLORECTAL ADENOCARCINOMA: OBJECTIFICATION OF CRITERIA OF MORPHOLOGICAL EVALUATION

D.P. Kovtun^{1,2}, N.M. Anichkov², O.G. Polushin¹, E.V. Ponomaryeva¹,
A.I. Lyubimov³, E.Yu. Kalinina²

¹City Clinical Oncology Center, Saint Petersburg, Russia;

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia;

³S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

© Коллектив авторов, 2018

Цель исследования: анализ корреляции пролиферативной активности, определенной на основе рутинной гистологической окраски и иммуногистохимической реакции на ядерный антиген Ki-67 при колоректальных аденокарциномах. **Материалы и методы.** Выполнена ретроспективная оценка 30 аденокарцином ободочной и прямой кишок. Оценка пролиферативной активности осуществлена на серийных гистологических препаратах, изготовленных после парафиновой проводки, окрашенных гематоксилином и эозином и обработанных антителами к Ki-67. Подсчет выполняли в предварительно выделенных при обзорной микроскопии «горячих точках», на четыре поля зрения при большом увеличении микроскопа ($\approx 1 \text{ мм}^2$). **Результаты.** Оценка по коэффициенту ранговой корреляции Кендалла продемонстрировала высокую степень прямой связи между числом митозов, подсчитанных при рутинной окраске, и пролиферативной активностью, оцененной иммуногистохимическим методом ($\tau = 0,708$, $p < 0,05$). Все наблюдения на диаграмме рассеяния удалось разделить на три кластера-«облака» с близкими значениями индекса меченных Ki-67 ядер при практически одинаковом числе митозов. **Заключение.** На основании рутинного гистологического исследования представляется возможным разделить колоректальные карциномы на опухоли с низкой ($1-2/\text{мм}^2$), умеренной ($3-5/\text{мм}^2$) и высокой ($\geq 6/\text{мм}^2$) митотической активностью, соответствующей значениям пролиферативного индекса по Ki-67 $< 30\%$, $30-50\%$ и $> 50\%$.

Ключевые слова: рак толстой и прямой кишок; митозы; окраска гематоксилином и эозином; иммуногистохимия; Ki-67; ранговая корреляция; диаграмма рассеяния; тест Краскела – Уоллиса.

Aim of the study. To analyze the correlation between proliferative activities determined on the basis of routine histological staining and immunohistochemical reaction to the nuclear antigen Ki-67 in colorectal adenocarcinomas. **Methods.** Thirty adenocarcinomas of the colon and rectum were retrospectively evaluated. Evaluation of proliferative activity was performed on serial histological preparations stained with hematoxylin and eosin and treated with antibodies to Ki-67. Calculation was carried out in the “hot spots” under four microscope high power fields ($\approx 1 \text{ mm}^2$). **Results.** An estimate of the Kendall rank correlation coefficient demonstrated a high degree of direct relationship between the number of mitoses counted by routine staining and proliferative activity estimated by the immunohistochemical method ($\tau = 0.708$, $p < 0.05$). All observations on the dispersion diagram could be divided into three “cloud”

чески одинаковом числе митозов. Так, 1–2 митоза на 1 мм² соответствовали менее чем 30 % пролиферативному индексу, определенному на основе иммуногистохимической реакции; 3–5 митозов на 1 мм² — 30–50 %; 6 и более митозов на 1 мм² — более 50 % (рис. 3). Тест Краскела – Уоллиса подтвердил значимость различий между описанными кластерами пролиферативной активности ($H = 20$, $df = 2$, $p < 0,001$).

Заключение

Оценка пролиферативной активности в колоректальных аденокарциномах на основе иммуногистохимической реакции с антителами к белку Ki-67 имеет ряд недостатков, к которым в первую очередь можно отнести увеличение общего числа меченых ядер за счет пери- и интратуморозной лейкоцитарной реакции, а также свойственных этим опухолям «мусорных некрозов», генерирующих ложноположительные (артифициальные) сигналы. Нельзя не учитывать и возможные аутолитические изменения операционного материала, возникающие при нарушении режима фиксации и резко снижающие эффективность иммуногистохимического исследования. Кроме того, иммуногистохимия доступна далеко не во всех патоморфологических лабораториях лечебно-профилактических учреждений России и постановка иммуногистохимических реакций увеличивает стоимость диагностического процесса.

На основании рутинного гистологического исследования представляется возможным разделить колоректальные карциномы на опухоли с низкой (1–2/мм²), умеренной (3–5/мм²) и высокой (≥ 6 /мм²) митотической активностью (соответствующей значениям индекса пролиферации по Ki-67 < 30 %, 30–50 % и > 50 %),

Список литературы

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Смертность населения России и стран СНГ от злокачественных новообразований в 2009 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — 2011. — Т. 22. — № 3 (прил. 1). — С. 93–123. [Davydov MI, Aksel EM. Smernost' naseleniya Rossii i stran SNG ot zlokachestvennykh novoobrazovaniy v 2009 g. *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS*. 2011;22(3S1):93-123. (In Russ.)]
2. Ковальский Г.Б., Юрин А.Г. Опухоли кишечника // Пальцев М.А., Аничков Н.М. Атлас патологии опухолей человека. — М.: Медицина, 2005. — С. 213–231. [Kovalskiy GB, Yurin AG. Opukholi kishechnika. In: Paltsev MA, Anichkov NM. Atlas patologii opukholey cheloveka. Moscow: Meditsina; 2005. P. 213-231. (In Russ.)]
3. Papapolychroniadis C. Environmental and other risk factors for colorectal carcinogenesis. *Tech Colorectol*. 2004;8 Suppl 1:s7-9. doi: 10.1007/s10151-004-0097-x.
4. Пророков В.В., Николаев А.В., Власов О.А. Хирургическое лечение рака ободочной кишки: анализ отдаленных результатов // Онкологическая колопроктология. — 2012. — № 1. — С. 24–27. [Prorokov VV, Nikolayev AV, Vlasov OA. Surgical treatment of colon cancer: analysis of long-term outcome. *Colorectal oncology*. 2012;(1):24-27. (In Russ.)]

Таблица

Итоговые показатели предсказательной способности модели

Показатель	Значение
Множественный R	0,85
Множественный R^2	0,73
Скорректированный R^2	0,72
$F(1,28)$	74,7
p	< 0,001
Стандартная ошибка оценки	8,87

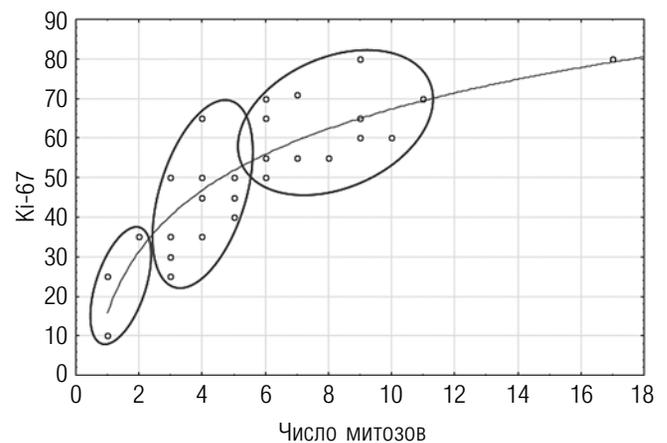


Рис. 3. Диаграмма рассеяния после логарифмического преобразования модели с тремя «облаками» близких значений пролиферативного индекса, рассчитанного по реакции на Ki-67, при практически одинаковом числе митозов

что поможет в клинике объективизировать критерии дифференцировки этих новообразований, уменьшить сроки патологоанатомического анализа биопсийного и операционного материала и снизить общую стоимость диагностических процедур.

5. Bartley AN, Hamilton SR, Alsabeh R, et al. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(2):166-170. doi: 10.5858/arpa.2013-0231-CP.

6. Раскин Г.А., Петров С.В. Низкий уровень пролиферации — неблагоприятный прогностический признак при аденокарциноме толстой кишки // Казанский медицинский журнал. — 2014. — Т. 95. — № 3. — С. 378–382. [Raskin GA, Petrov SV. Low proliferative level is a poor prognostic factor for colon adenocarcinoma. *Kazan Med Zh*. 2014;95(3):378-382. (In Russ.)]

7. Hayashi H, Beppu T, Sakamoto Y, et al. Prognostic value of Ki-67 expression in conversion therapy for colorectal liver-limited metastases. *Am J Cancer Res*. 2015;5(3):1225-1233.

8. Pap Z, Ilyes IA, Mocan SL, et al. Changes in immunoeexpression of p53, Ki-67, Ets-1, APAF-1 and PTEN in serrated and conventional colon adenomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2015;56(4):1389-1396.

9. Ковтун Д.П., Аничков Н.М., Полушин О.Г., и др. Особенности патологоанатомической диагностики колоректального рака в онкохирургической клинике (обзор литературы) // Поволжский онкологический вестник. — 2018. — № 1. — С. 59–67. [Kovtun DP, Anichkov NM, Polushin OG, et al. The features of pathological diagnosis of colorectal cancer in oncosurgical clinic (review). *Povolzhskii onkologicheskii vestnik*. 2018;(1):59-67. (In Russ.)]

10. Kriegsmann M, Warth A. What is better/reliable, mitosis counting or Ki67/MIB1 staining? *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(5):543-546. doi: 10.21037/tlcr.2016.10.11.

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Контакт: Демьян Павлович Ковтун, damian85@mail.ru

Сведения об авторах:

Демьян Павлович Ковтун — врач патологоанатомического отделения Городского клинического онкологического диспансера, Санкт-Петербург; заочный аспирант кафедры патологической анатомии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург. E-mail: damian85@mail.ru.

Николай Мильевич Аничков — д-р мед. наук, профессор, член-кор. РАН, заведующий кафедрой патологической анатомии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург. E-mail: patanatom@szgmu.ru.

Олег Геннадьевич Полушин — канд. мед. наук, врач патологоанатомического отделения Городского клинического онкологического диспансера, Санкт-Петербург. E-mail: polushinjob@gmail.com.

Елена Васильевна Пономарева — зав. патологоанатомическим отделением Городского клинического онкологического диспансера, Санкт-Петербург. E-mail: ponomareva.pao@yandex.ru.

Александр Иванович Любимов — канд. мед. наук, начальник отделения 1-й клиники (хирургии усовершенствования врачей) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург. E-mail: a-dr_lyubimov@mail.ru.

Елена Юрьевна Калинина — канд. мед. наук, заведующая учебной частью, доцент кафедры патологической анатомии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург. E-mail: drkalinina@yandex.ru.

Demian P. Kovtun — Physician, Department of Pathology, City Clinical Oncologic Dispensary, Saint Petersburg; Research Fellow, Department of Pathology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: damian85@mail.ru.

Nikolay M. Anichkov — MD, PhD, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Pathology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: patanatom@szgmu.ru.

Oleg G. Polushin — MD, PhD, Department of Pathology, City Clinical Oncologic Dispensary, Saint Petersburg, Russia. E-mail: polushinjob@gmail.com.

Elena V. Ponomareva — Head of the Department of Pathology, City Clinical Oncologic Dispensary, Saint Petersburg, Russia. E-mail: ponomareva.pao@yandex.ru.

Alexander I. Lyubimov — MD, PhD, Head of the Department of the First Clinic (Surgery for Advanced Medical Studies), Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia. E-mail: a-dr_lyubimov@mail.ru.

Elena Yu. Kalinina — MD, PhD, Curriculum Director, Associate Professor of the Department of Pathology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: drkalinina@yandex.ru.

УДК 617.713-007.17:085.385.3]-003.93-091.8-092.9

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИСТРОФИИ НА ФОНЕ ИНТРАСТРОМАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

М.С. Дениско, О.И. Кривошеина, Е.О. Филиппова, Л.Р. Мустафина

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

PATHOMORPHOLOGICAL FEATURES OF CORNEAL REGENERATION IN EXPERIMENTALLY INDUCED DYSTROPHY AGAINST THE BACKGROUND OF INTRASTROMAL ADMINISTRATION OF AUTOLOGOUS MONONUCLEAR LEUKOCYTES

M.S. Denisko, O.I. Krivosheina, E.O. Filippova, L.R. Mustafina

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

© Коллектив авторов, 2018

Цель исследования — в эксперименте *in vivo* изучить особенности течения репаративной регенерации роговицы при индуцированной эндотелиально-эпителиальной дистрофии (ЭЭД) после введения суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов в заднюю треть стромы роговой оболочки. **Материалы и методы.** Эксперимент выполнен на 27 кроликах породы Шиншилла (27 глаз). На первом этапе эксперимента всем животным воспроизвели модель ЭЭД роговицы путем механического повреждения и удаления ее эндотелиального слоя. На втором этапе через 2 нед. после развития заболевания животных разделяли в зависимости от планируемого лечения на две группы: основную, 12 животным которой однократно в заднюю треть стромы роговицы вводили суспензию аутологичных моноклеарных лейкоцитов; сравнения, 12 животным которой проводили консервативное лечение ЭЭД роговицы. **Результаты.** Воспроизведение *in vivo* ЭЭД роговицы путем механического повреждения и удаления ее эндотелиального слоя сопровождается быстрым (в течение 2 нед.) развитием заболевания с диффузной гидропической дистрофией переднего эпителия, выраженным отеком стромы с расслоением коллагеновых волокон. На экспериментальной модели ЭЭД роговой оболочки установлено, что введение суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов в заднюю треть стромы роговицы при лечении заболевания обеспечивает быструю (в 1,5 раза) дегидратацию стромы, уменьшает в 1,2 раза число дистрофических клеток в переднем эпителии по сравнению с консервативным лечением. Срок восстановления нормальной толщины среза роговицы у животных основной группы сокращается в 1,4 раза. **Заключение.** Введение суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов в заднюю треть стромы роговицы при лечении экспериментальной ЭЭД роговой оболочки индуцирует репаративную регенерацию, ускоряя восстановление поврежденных структур роговицы и препятствуя ее неоваскуляризации.

Ключевые слова: эндотелиально-эпителиальная дистрофия роговицы; клеточные технологии; аутологичные моноклеарные лейкоциты; цитокины; регенерация.

The purpose of research is study the features of the flow of reparative regeneration of the cornea in an experiment *in vivo* with induced bullous keratopathy after the introduction of a suspension of autologous mononuclear leukocytes in the posterior third of the corneal stroma. **Materials and methods.** The experiment was performed on 27 chinchilla rabbits (27 eyes). At the first stage of the experiment all animals were reproduced the model of corneal bullous keratopathy by mechanical damage and removal of its endothelial layer. At the second stage, 2 weeks after the development of the disease, the animals were divided, depending on the planned treatment, into 2 groups: the main, 12 animals once in the back third of the corneal stroma were administered a suspension of autologous mononuclear leukocytes;

структур роговицы и препятствуя ее неоваскуляризации. Полученные данные представляют интерес и заслуживают дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при поддержке гранта Фонда содействия инновациям УМНИК-2017.

Список литературы

1. Бикбов М.М., Шевчук Н.Е., Мальханов В.Б. Цитокины в клинической офтальмологии. — Уфа: Уфимский полиграфкомбинат, 2008. [Bikbov MM, Shevchuk NE, Mal'khanov VB. Tsitokiny v klinicheskoy oftal'mologii. Ufa: Ufimskiy poligrafkombinat; 2008. (In Russ.)]
2. Запускалов И.В., Кривошеина О.И. Современная фармакотерапия язвенных поражений роговицы: применение аутологичных мононуклеаров крови. — Саабрюкен: Lambert Academic Publishing, 2013. [Zapuskalov IV, Krivosheina OI. Sovremennaya farmakoterapiya yazvennykh porazheniy rogovitsy: primeneniye autologichnykh mononuklearov krovi. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing; 2013. (In Russ.)]
3. Каспарова Е.А., Суббот А.М., Антохин А.И., Павлюк А.С. Клиническая эффективность персонализированной клеточной терапии заболеваний эндотелия роговицы // Катарактальная и рефракционная хирургия. — 2011. — Т. 11. — № 2. — С. 45–49. [Kasparova EA, Subbot AM, Antokhin AI, Pavlyuk AS. Clinical efficacy of personalized cell therapy for endothelial keratitis. *Kataraktal'naya i refraktsionnaya khirurgiya*. 2011;11(2):45-49. (In Russ.)]
4. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — СПб.: Фолиант, 2008. [Ketlinskiy SA, Simbirtsev AS. Tsitokiny. Saint Petersburg: Foliant; 2008. (In Russ.)]
5. Никитин Н.А., Кузбеков Ш.Р. Роль TGFβ в офтальмологии // Цитокины и воспаление. — 2009. — Т. 8. — № 1. — С. 3–9. [Nikitin NA, Kuzbekov SR. The role of TGFβ in ophthalmology. *Cytokines & inflammation*. 2009;8(1):3-9. (In Russ.)]
6. Каспарова Е.А., Суббот А.М. Пролиферативный потенциал заднего эпителия роговицы человека // Вестник офтальмологии. — 2013. — Т. 129. — № 3. — С. 82–88. [Kasparova EA, Subbot AM. Proliferative potential of human corneal endothelium. *Annals of ophthalmology*. 2013;129(3):82-88. (In Russ.)]
7. Слепова О.С. Патогенетическая роль цитокинов при различных заболеваниях глаз как основа для прогнозирования и выбора тактики иммунокорректирующего лечения // Российский офтальмологический журнал. — 2008. — Т. 1. — № 3. — С. 36–42. [Slepova OS. The pathogenetic role of cytokines in various eye diseases as a basis for prognostication and the choice of immune correction tactics. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal*. 2008;1(3):36-42. (In Russ.)]
8. Jeon HS, Yi K, Chung TY, et al. Chemically injured keratocytes induce cytokine release by human peripheral mononuclear cells. *Cytokine*. 2012;59(2):280-285. doi: 10.1016/j.cyto.2012.04.006.

Поступила в редакцию: 12.03.2018

Контакт: *Марьяна Сергеевна Дениско; m.s.sharova@mail.ru*

Сведения об авторах:

Марьяна Сергеевна Дениско — аспирант кафедры офтальмологии, ФГБОУ ВО СибГМУ, Томск. E-mail: m.s.sharova@mail.ru.

Ольга Ивановна Кривошеина — д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой офтальмологии, ФГБОУ ВО СибГМУ, Томск. E-mail: kaf.ofthalmolog@ssmu.ru.

Екатерина Олеговна Филиппова — ассистент кафедры офтальмологии, ФГБОУ ВО СибГМУ, Томск. E-mail: katerinabosix@mail.ru.

Лилия Рамильевна Мустафина — д-р мед. наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ФГБОУ ВО СибГМУ, Томск. E-mail: mustafinalr@rambler.ru.

Maryana S. Denisko — graduate student, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. E-mail: m.s.sharova@mail.ru.

Olga I. Krivosheina — Doctor of Medical Science, Professor, Head of Department of Ophthalmology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. E-mail: kaf.ofthalmolog@ssmu.ru.

Ekaterina O. Filippova — assistant of Department of Ophthalmology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. E-mail: katerinabosix@mail.ru.

Liliya R. Mustafina — Doctor of Medical Science, Professor, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia. E-mail: mustafinalr@rambler.ru.

УДК 612.0-14.41-14.43

МЕТЕОФАКТОРЫ И ОБРАЩАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ ЗА НЕОТЛОЖНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩЬЮ

В.А. Беляева

Институт биомедицинских исследований — филиал ФГБУН Федерального научного центра
«Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ

METEOFATORS AND ADMITTANCE OF PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION FOR EMERGENCY MEDICAL CARE

V.A. Belyayeva

Institute of Biomedical Research of Vladikavkaz Scientific Center of The Russian Academy of Sciences
and the Government of the Republic of North Ossetia-Alania, Vladikavkaz, Russia

© В.А. Беляева, 2018

В статье представлены результаты ретроспективного анализа обращаемости пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП) за скорой медицинской помощью в зависимости от метеоусловий и сезона. **Цель исследования** — изучить влияние метеофакторов на обращаемость пациентов с ФП за скорой медицинской помощью в контексте сезонной динамики. **Материалом исследования** служили архивные карты вызовов скорой медицинской помощи в зимний, весенний и летний периоды 2012 г., а также соответствующие базы данных среднесуточных метеорологических параметров, их межсуточного изменения (Δ), индексов патогенности: температуры воздуха (it), атмосферного давления (ip), влажности (ih), скорости ветра (iv), облачности (in), общего индекса патогенности погоды (ИПП). В результате исследования было установлено, что в зимний период наиболее значимое негативное влияние оказывают флуктуации метеофакторов: среднесуточной температуры воздуха, атмосферного давления, it , Δp , ИПП; в весенний — среднесуточной температуры воздуха, атмосферного давления, it , $i\Delta t$; в летний период — $i\Delta t$. Обращаемость населения с ФП за медицинской помощью зимой ($6,7 \pm 0,5$ чел/сут) и весной ($6,9 \pm 0,4$ чел/сут) выше, чем летом ($5,2 \pm 0,5$ чел/сут). **Заключение.** Максимальное число корреляционных связей между частотой вызовов скорой медицинской помощи и метеофакторами, их межсуточными флуктуациями и индексами патогенности присутствует в зимне-весенний период и имеет гендерную и сезонную специфику. Фактор сезонности оказывает влияние на обращаемость пациентов с ФП за неотложной медицинской помощью.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий; скорая медицинская помощь; метеофакторы; сезонная динамика; индексы патогенности погоды.

This study presents the results of a retrospective analysis of the challenges of patients with atrial fibrillation (AF) for ambulance medical care depending on weather conditions and season. **Aim.** This study aimed to evaluate the effect of meteorological factors on addressing of patients with AF for emergency medical care in the context of seasonal dynamics. **Materials.** Archival cards of ambulance calls in the winter, spring, and summer 2012 and the corresponding databases of average daily meteorological parameters, day-to-day changes (Δ), and pathogenicity indices were used: air temperature (it), atmospheric pressure (ip), humidity (ih), wind speed (iv), cloudiness (in), and general weather pathogenicity index (IWP). **Results.** In winter, the most significant negative effect is caused by fluctuations in meteo-factors: average daily air temperature and atmospheric pressure, it , Δp , IWP; in spring were the average daily air temperature and atmospheric pressure, it , $i\Delta t$; in summer was $i\Delta t$. The response of the population to AF for medical care in the winter (6.7 ± 0.5 person/day) and spring (6.9 ± 0.4 person/day) is higher than that in summer (5.2 ± 0.5 person/day). **Conclusion.** The maximum number of correlation links between the frequency of ambulance medical care calls and meteorological factors is present in the winter and spring and has gender and season specifics. Seasonality factor affects the treatment of patients with AF for emergency medical care.

Keywords: atrial fibrillation; ambulance medical care; meteofactors; seasonal dynamics; indices of pathogenicity of weather.

их взаимодействия ($R_{\text{множ}} = 0,47$; $R^2_{\text{множ}} = 0,22$; $p = 0,044$). Ситуация усугубляется тем, что большинство пациентов с ФП — это лица пожилого возраста, анамнез которых отягощен сопутствующей сердечно-сосудистой патологией.

В летний и осенний периоды не обнаружено корреляционной взаимосвязи между среднесуточной температурой воздуха и частотой вызовов СМП к пациентам с ФП. Летом частота вызовов СМП в совокупной выборке коррелирует с индексом патогенности изменения температуры воздуха ($r = 0,33$; $p = 0,039$), по мере увеличения которого растет число вызовов.

Заключение

Возникающее вследствие абнормальных флуктуаций метеофакторов перенапряжение механизмов адаптации может провоцировать нарушения в деятельности сердечно-сосуди-

стой системы, которые проявляются нарушением ритма сердца у пожилых пациентов, как правило, имеющих сопутствующую патологию.

Обращаемость пациентов с ФП за скорой медицинской помощью коррелирует с метеофакторами, их межсуточными флуктуациями и индексами патогенности, специфичными в разные сезоны года. Наиболее значимыми метеофакторами являются среднесуточная температура, атмосферное давление и соответствующие индексы патогенности. Частота вызовов СМП к пациентам с данной патологией в зимний и весенний периоды выше, чем летом. Влияние метеофакторов на частоту вызовов СМП к пациентам с ФП имеет не только сезонную, но и гендерную специфику.

Полученные данные позволяют дифференцированно проводить своевременные профилактические мероприятия у лиц, находящихся в группе риска, в соответствии с сезонной динамикой.

Список литературы

1. Kastor JA. Arrhythmias. Philadelphia: W.B. Saunders; 1994.
2. Wyndham CR. Atrial fibrillation: the most common arrhythmia. *Tex Heart Inst J*. 2000;27(3):257-267.
3. Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJV. Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study. *Heart*. 2001;86(5):516-521. doi: 10.1136/heart.86.5.516.
4. Российское кардиологическое общество, Всероссийское научное общество специалистов по клинической электрофизиологии, аритмологии и кардиостимуляции, Ассоциация сердечно-сосудистых хирургов. Диагностика и лечение фибрилляции предсердий. Рекомендации РКО, ВНОА и АССХ. — М., 2012. [Rossiyskoe kardiologicheskoe obshchestvo, Vserossiyskoe nauchnoe obshchestvo spetsialistov po klinicheskoy elektrofiziologii, aritmologii i kardiostimulyatsii, Assotsiatsiya serdechno-sosudistyykh khirurgov. Diagnostika i lechenie fibrillyatsii predserdiy. Rekomendatsii RKO, VNOA i ASSKh. Moscow; 2012. (In Russ.)]
5. Бокша В.Г., Богущкий Б.В. Медицинская климатология и климатотерапия. — Киев, 1982. [Boksha VG, Bogutskiy BV. Meditsinskaya klimatologiya i klimatoterapiya. Kiev; 1982. (In Russ.)]
6. Frost L, Johnsen SP, Pedersen L, et al. Seasonal Variation in Hospital Discharge Diagnosis of Atrial Fibrillation: A Population-Based Study. *Epidemiology*. 2002;13(2):211-215. doi: 10.1097/00001648-200203000-00017.
7. Fustinoni O, Saposnik G, Esnaola y Rojas MM, et al. Higher frequency of atrial fibrillation linked to colder seasons and air temperature on the day of ischemic stroke onset. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013;22(4):476-481. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.03.009.
8. Murphy NF, Stewart S, MacIntyre K, et al. Seasonal variation in morbidity and mortality related to atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 2004;97(2):283-288. doi: 10.1016/j.ijcard.2004.03.041.
9. Christensen AL, Rasmussen LH, Baker MG, et al. Seasonality, incidence and prognosis in atrial fibrillation and stroke in Denmark and New Zealand. *BMJ Open*. 2012;2(4). doi: 10.1136/bmjopen-2012-001210.
10. Comelli I, Cervellin G, Ferro J, et al. Incidence of acute-onset atrial fibrillation correlates with air temperature. Results of a nine-years survey. *J Epidemiol Glob Health*. 2015;5(1):95-97. doi: 10.1016/j.jegh.2014.10.003.
11. Овчарова В.Ф., Бутьева И.В., Швейнова Т.Г., Алешина Т.П. Специализированный прогноз погоды для медицинских целей и профилактика метеопатических реакций // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. — 1974. — № 2. — С. 109—119. [Ovcharova VF, Butieva IV, Shveinova TG, Aleshina TP Spetsializirovannyy prognos pogody dlya meditsinskikh tseley i profilaktika meteorpaticheskikh reaktsiy. *Problems of balneology, physiotherapy and exercise therapy*. 1974;(2):109-119. (In Russ.)]
12. Huang BS, Leenen FH. Blockade of brain mineralocorticoid receptors or Na⁺ channels prevents sympathetic hyperactivity and improves cardiac function in rats post-MI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5):H2491-H2497. doi: 10.1152/ajpheart.00840.2004.

13. Sun Z, Bello-Roufai M, Wang X. RNAi inhibition of mineralocorticoid receptors prevents the development of cold-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(4):H1880-H1887. doi: 10.1152/ajpheart.01319.2007.
14. Беляева В.А. Влияние метеофакторов на частоту повышения артериального давления // Анализ риска здоровью. — 2016. — № 4. — С. 17–20. [Belyayeva VA. The impact of meteo-factors on increase of arterial blood pressure. *Health Risk Analysis*. 2016;(4):17-22. (In Russ.)]. doi: 10.21668/health.risk/2016.4.02.
15. Charach G. Seasonal changes in blood pressure: Cardiac and cerebrovascular morbidity and mortality. *World J Hypertens*. 2013;3(1):1-8. doi: 10.5494/wjh.v3.i1.1.
16. Kalifa J, Jalife J, Zaitsev AV, et al. Intra-atrial pressure increases rate and organization of waves emanating from the superior pulmonary veins during atrial fibrillation. *Circulation*. 2003;108(6):668-671. doi: 10.1161/01.CIR.0000086979.39843.7B.
17. Mayyas F, Niebauer M, Zurick A, et al. Association of left atrial endothelin-1 with atrial rhythm, size, and fibrosis in patients with structural heart disease. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010;3(4):369-379. doi: 10.1161/CIRCEP.109.924985.
18. Chen GF, Sun Z. Effects of chronic cold exposure on the endothelin system. *J Appl Physiol (1985)*. 2006;100(5):1719-1726. doi: 10.1152/jappphysiol.01407.2005.

Поступила в редакцию: 28.03.2018

Контакт: Виктория Александровна Беляева; pursh@inbox.ru

Сведения об авторах:

Виктория Александровна Беляева — канд. биол. наук, научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиала ФГБУН Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук». E-mail: pursh@inbox.ru.

Viktoriya A. Belyayeva — PhD in Biology, Research Associate, Institute of Biomedical Research — Branch of Federal Research Center Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. E-mail: pursh@inbox.ru.

УДК 579.61

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО СТРЕПТАВИДИНА В КЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ *ESCHERICHIA COLI*

Д.В. Зотова¹, Н.А. Грудина¹, О.И. Антимонова¹, М.М. Шавловский^{1,2}, Д.С. Поляков¹

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

²ФГБНУ «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»,
Санкт-Петербург

LOCALIZATION AND ACTIVITY OF RECOMBINANT STREPTAVIDIN IN CELL FRACTIONS OF *ESCHERICHIA COLI*

D.V. Zotova¹, N.A. Grudinina¹, O.I. Antimonova¹, M.M. Shavlovsky^{1,2}, D.S. Polyakov¹

¹Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

© Коллектив авторов, 2018

Предложена генетическая конструкция, позволяющая получать рекомбинантный стрептавидин (SA) дикого типа в биологически активной форме с высоким выходом. Показано, что путем введения в белок дополнительного лидерного пептида и олигогистидиновой последовательности можно выделить растворимый SA из культуральной среды и из клеточных фракций. Выявлено, что температура индукции синтеза белка оказывает существенное влияние на характер распределения SA по фракциям. Получаемый продукт не загрязнен эндогенным биотином (BT). Способ дает возможность избежать стадий денатурации и ренатурации, которые необходимы при технологии получения целевого продукта из телец включения и в значительной степени снижают выход. Таким образом, предлагаемый подход обеспечивает повышение выхода биологически высокоактивного стрептавидаина (способного связывать BT и биотинсодержащие соединения), который может быть использован для различных практических целей.

Ключевые слова: активность; биотин; выделение белка; культуральная среда; периплазматическая фракция; растворимая фракция; стрептавидин; тельца включения; *pelB*-лидерный пептид.

The authors provide a genetic construct for obtaining recombinant biologically active wild type streptavidin with high yield. Addition of leader peptide and oligohistidine sequence to the streptavidin sequence makes it possible to isolate soluble streptavidin from the culture medium and from the soluble fraction. Temperature conditions for inducing of protein synthesis were found to have a significant effect on the distribution profile of streptavidin between fractions. The obtained protein product is not contaminated with endogenous biotin. The provided method excludes denaturation and renaturation steps which are necessary for isolation of the desired product from inclusion bodies but substantially reduce the yield. Thus, the provided approach allows to increase the yield of biologically highly active streptavidin which is capable of binding biotin and biotin-containing compounds and can be used for various practical purposes.

Keywords: activity; biotin; protein isolation; culture medium; periplasmic fraction; soluble fraction; streptavidin; inclusion bodies; *pelB*-leader peptide.

Введение

Функциональный аналог авидина яичного белка стрептавидин (SA) был выделен из бактерий *Streptomyces avidinii*. Природный SA представляет собой тетрамер, способный прочно связывать четыре молекулы биотина (BT). В настоящее время описано множество рекомбинантных SA, различающихся по способности связывать BT.

Способность SA связывать BT с высоким средством нашла применение для решения

многих проблем фундаментальной биологии и медицины, а также широко используется в лабораторной диагностике. Комплекс SA с BT обладает высокой устойчивостью к воздействию органических растворителей, денатурирующих растворов, детергентов (например, додецилсульфат, тритон X-100), протеолитических ферментов, экстремальных температур и pH [2], что является весьма полезным свойством для решения ряда специальных задач. SA и BT часто служат необходимыми ком-

Список литературы

1. Zhang M, Shao J, Xiao J, et al. A novel approach to make homogeneous protease-stable monovalent streptavidin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;463(4):1059-1063. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.058.
2. Green NM. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol*. 1990;184:51-67. doi: 10.1016/0076-6879(90)84259-j.
3. Syrkina MS, Shirokov DA, Rubtsov MA, et al. Preparation and functional evaluation of RGD-modified streptavidin targeting to integrin-expressing melanoma cells. *Protein Eng Des Sel*. 2013;26(2):143-150. doi: 10.1093/protein/gzs076.
4. Hofmann K, Wood SW, Brinton CC, et al. Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(8):4666-4668. doi: 10.1073/pnas.77.8.4666.
5. Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Соловьев К.В., и др. Бета2-микроглобулиновый амилоидоз: фибриллогенез природного и рекомбинантных бета2-микроглобулинов человека // Медицинский академический журнал. — 2010. — Т. 10. — № 2. — С. 40–49. [Polyakov DS, Grudinina NA, Solov'ev KV, et al. Beta2-microglobuline amyloidosis: Fibrillogenesis of natural and recombinant human beta2-microglobulins. *Medical academic journal*. 2010;10(2):40-49 (In Russ.)]
6. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons; 1989.
7. Поляков Д.С., Грудинина Н.А., Соловьев К.В., и др. Получение рекомбинантного β 2-микроглобулина человека и его фибриллогенез при низких и нейтральных значениях pH // Молекулярная медицина. — 2011. — № 2. — С. 36–39. [Polyakov DS, Grudinina NA, Solov'ev KV, et al. Production of recombinant human β 2-microglobulin and its amyloid fibril formation at acidic and neutral pH. *Molekuliarnaia meditsina*. 2011;(2):36-39. (In Russ.)]
8. Solovyov KV, Polyakov DS, Grudinina NA, et al. Expression in *E. coli* and purification of the fibrillogenic fusion proteins TTR-sfGFP and beta2M-sfGFP. *Prep Biochem Biotechnol*. 2011;41(4):337-349. doi: 10.1080/10826068.2010.548433.
9. Поляков Д.С., Антимонова О.И., Сахабеев Р.Г., и др. Влияние наночастиц из полимолочной кислоты на иммуногенность связанного с ним белка // Инфекция и иммунитет. — 2017. — Т. 7. — № 2. — С. 123–129. [Polyakov DS, Antimonova OI, Sakhabeev RG, et al. Polylactic acid nanoparticles influence on immunogenicity of the protein bound with them. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017;7(2):123-129. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-123-129.
10. Solovyov KV, Kern AM, Grudinina NA, et al. Genetic structures and conditions of their expression, which allow receiving native recombinant proteins with high output. *International Journal of biomedicine*. 2012;2(1):45-49.
11. Антимонова О.И., Грудинина Н.А., Егоров В.В., и др. Взаимодействие красителя конго красный с фибриллами лизоцима, бета2-микроглобулина и транстиретина // Цитология. — 2016. — Т. 58. — № 2. — С. 156–163. [Antimonova OI, Grudinina NA, Egorov VV, et al. Interaction of the dye congo red with fibrils of lysozyme, beta2-microglobulin and transthyretin. *Cell and tissue biology*. 2016;58(2):156-163. (In Russ.)]
12. Поляков Д.С., Сахабеев Р.Г., Шавловский М.М. Частичная денатурация рекомбинантного белка для его аффинного выделения // Прикладная биохимия и микробиология. — 2016. — Т. 52. — № 1. — С. 122–127. [Polyakov DS, Sakhabeev RG, Shavlovskiy MM. Polylactic acid nanoparticles influence on immunogenicity of the protein bound with them. *Applied biochemistry and microbiology*. 2016;52(1):122-127. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0555109916010104.

Поступила в редакцию: 09.07.2018

Контакт: Дмитрий Степанович Поляков; ravendoctor@mail.ru

Сведения об авторах:

Дарья Викторовна Зотова — аспирант, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: dariazotti1994@yandex.ru.

Наталья Андреевна Грудинина — канд. биол. наук, старший научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: strangecatnap@gmail.com.

Ольга Игоревна Антимонова — младший научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: oa0584@mail.ru.

Darya V. Zotova — postgraduate, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: dariazotti1994@yandex.ru.

Natalia A. Grudinina — Ph.D, Biology, Higher Senior Officer, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: strangecatnap@gmail.com.

Olga I. Antimonova — junior research associate, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: oa0584@mail.ru.

Михаил Михайлович Шавловский — д-р мед. наук, профессор, заведующий лаборатории молекулярной генетики человека, отдела молекулярной генетики. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; ФГБНУ «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург. E-mail: mmsch@rambler.ru.

Дмитрий Степанович Поляков — д-р мед. наук, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: ravendoctor@mail.ru.

Mikhail M. Shavlovsky — Doctor of Medicine, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Human Genetics, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia, North-West State Medical University named after. I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: mmsch@rambler.ru.

Dmitry S. Polyakov — Candidate of Medicine, Research Officer, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: ravendoctor@mail.ru.

УДК 615.015: 57.084.1

ОЦЕНКА РАДИОЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ РАЗДЕЛЬНО ИЛИ В КОМБИНАЦИИ С ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-1 БЕТА

*Е.В. Мурзина¹, Г.А. Софронов^{1, 2}, А.С. Симбирцев^{2, 3}, Н.В. Аксенова¹,
О.М. Веселова¹, А.М. Ищенко³*

¹ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», Санкт-Петербург;

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

³ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»,
Санкт-Петербург

EVALUATION OF THE RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF RECOMBINANT FLAGELLIN WHEN USED ALONE OR IN COMBINATION WITH INTERLEUKIN-1 BETA

*E.V. Murzina¹, G.A. Sofronov^{1, 2}, A.S. Simbirtsev^{2, 3}, N.V. Aksenova¹,
O.M. Veselova¹, A.M. Ischenko³*

¹S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;

²Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

³Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia

© Коллектив авторов, 2018

Цель работы — экспериментальная оценка противолучевой эффективности рекомбинантного флагеллина при его раздельном применении или в комбинации с интерлейкином-1 бета в условиях профилактического и терапевтического введения животным. **Материалы и методы исследования.** В экспериментах на мышах-самцах изучено влияние гибридных флагеллина FliC *Salmonella typhimurium* (ФЛ) и интерлейкина-1 β человека (ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург) на параметры 30-суточной выживаемости животных, подвергнутых воздействию летальных доз рентгеновского излучения. Выживаемость облученных животных анализировали по методу Каплана – Мейера. **Результаты.** Показано, что максимальное протекторное действие на 30-суточную выживаемость мышей ФЛ оказывал в условиях профилактического введения. Применение ФЛ в дозах 1 и 2 мг/кг до облучения мышей в дозах 7,5; 8,0 и 8,5 Гр статистически значимо по сравнению с контрольными группами повышало выживаемость животных до 67–87 % ($p < 0,05$). Одновременное профилактическое введение ФЛ (1 мг/кг) и интерлейкина-1 β (50 мкг/кг) обеспечивало 100 % выживаемость облученных животных. При применении препаратов раздельно — ФЛ за 15–30 мин до воздействия и интерлейкина-1 β через 15–30 мин — выжило 92,8 % мышей. **Заключение.** Результаты исследования позволяют рассматривать рекомбинантный ФЛ в качестве перспективного кандидатного препарата для конструирования нового поколения отечественных средств фармакологической защиты от воздействия ионизирующего излучения, в том числе в композиции с интерлейкином-1 β .

Ключевые слова: флагеллин; рентгеновское излучение; выживаемость; мыши; комбинированное применение; интерлейкин-1 бета.

Research objective. To evaluate the radioprotective effectiveness of recombinant flagellin when used alone or in combination with interleukin-1 beta for prophylactic or therapeutic effect on animals. **Materials and methods.** The effect of hybrid flagellin FliC *Salmonella typhimurium* and human interleukin-1 β (Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia) on the 30-day survival of male mice exposed to lethal doses of X-ray radiation was studied. Survival of irradiated animals was analyzed by Kaplan–Meier method. **Results.** The preventive use of flagellin had a protective effect on the 30-day survival of mice irradiated with lethal doses of X-rays. Compared with the irradiated control, the administration of flagellin (1 mg/kg or 2 mg/kg) prior to X-ray exposure (7.5 Gy, 8.0 Gy or 8.5 Gy) increased the animal survival rate to 67–87%. Complex preventive administration

показана эффективность лигандов TLR2/6 (CBLB613), TLR9 (CpG-ODN), TLR3 (Poly (I:C)), TLR7/8 (IMQ). По мнению авторов, лучевая терапия в сочетании с агонистами TLR может сенсibilизировать раковые клетки к ионизирующему излучению, оказывая в то же время радиопротекторное действие на нормальную ткань. В этой связи хочется отметить, что ФЛ и его производные, как агонисты TLR5, обладают значительным потенциалом в противоопухолевой иммунотерапии, поскольку способны оказывать противометастатическое действие и стимулировать развитие опухолеспецифической иммунологической памяти. Так, показано, что примененный в качестве монотерапии энтолимод вызывал быструю индукцию хемокинов CXCL9 и CXCL10, которые обеспечивали хоуминг в печень циркулирующих в крови натуральных киллеров (НК), экспрессирующих CXCL3, что в конечном счете проявлялось в подавлении активности метастазов различных опухолей в печень. НК-зависимая активация дендритных клеток сопровождалась стимуляцией CD8⁺ Т-клеточного ответа [22]. Кроме того, введение энтолимода может уменьшать токсические эффекты лекарственных препаратов, применяемых в химиотерапии

опухолей, например, 5-фторурацила, не изменяя при этом их противоопухолевой эффективности [23]. На основании этих данных можно предположить, что в случае разработки нового радиозащитного средства на основе ФЛ положительные эффекты его применения не ограничатся противолучевым действием.

Заключение

Результаты исследования позволяют рассматривать рекомбинантный ФЛ, полученный в ГосНИИ ОЧБ, в качестве перспективного кандидатного препарата для конструирования отечественных средств фармакологической защиты от ионизирующего излучения нового поколения, которые могут использоваться в случае возникновения массовых радиационных поражений, а также для снижения радиационно индуцированных тканевых реакций при радиотерапии опухолей. Разработка композиции рекомбинантных ФЛ и ИЛ-1 β может способствовать усилению радиозащитного эффекта и, возможно, снижению эффективных доз препаратов, что в конечном счете приведет к минимизации риска развития негативных эффектов их применения.

Список литературы

1. Рождественский Л.М. Актуальные вопросы поиска и исследования противолучевых средств // Радиационная биология. Радиозэкология. — 2013. — Т. 53. — № 5. — С. 513–520. [Rozhdestvenskiy LM. Aktual'nye voprosy poiska i issledovaniya protivoluchevykh sredstv. *Radiats Biol Radioecol.* 2013;53(5):513-520. (In Russ.)]
2. Singh VK, Romaine PL, Seed TM. Medical Countermeasures for Radiation Exposure and Related Injuries: Characterization of Medicines, FDA-Approval Status and Inclusion into the Strategic National Stockpile. *Health Phys.* 2015;108(6):607-630. doi: 10.1097/HP.0000000000000279.
3. Kamran MZ, Ranjan A, Kaur N, et al. Radioprotective Agents: Strategies and Translational Advances. *Med Res Rev.* 2016;36(3):461-493. doi: 10.1002/med.21386.
4. Гребенюк А.Н., Аксенова Н.В., Петров А.В., и др. Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2013. — Т. 43. — № 3. — С. 75–80. [Grebennyuk AN, Aksenova NV, Petrov AV, et al. Expression of different variants of recombinant flagellin and study of their radioprotective efficacy. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoj akademii.* 2013;43(3):75-80. (In Russ.)]
5. Гребенюк А.Н., Легеза В.И. Противолучевые свойства интерлейкина-1. — СПб.: Фолиант, 2012. [Grebennyuk AN, Legeza VI. Protivoluchevye svoystva interleykina-1. Saint Petersburg: Foliand; 2012. (In Russ.)]
6. Боровиков В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе Statistica. — М.: Горячая линия—Телеком, 2013. [Borovikov VP. Populyarnoe vvedenie v sovremennyy analiz dannykh v sisteme STATISTICA. Moscow: Goryachaya liniya—Telekom; 2013. (In Russ.)]
7. Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Аксенова Н.В., и др. Экспериментальная оценка противолучевой эффективности рекомбинантного флагеллина // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2017. — Т. 59. — № 3. — С. 122–128. [Murzina EV, Sofronov GA, Aksenova NV, et al. Experimental estimation of the radioprotective efficiency of recombinant flagellin. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoj akademii.* 2017;59(3):122-128. (In Russ.)]
8. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология, патология, клиника. — СПб.: Фолиант, 2011. [Simbirtsev AS. Interleykin-1. Fiziologiya, patologiya, klinika. Saint Petersburg: Foliand; 2011. (In Russ.)]
9. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, et al. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol.* 2008;180(12):8280-8285. doi: 10.4049/jimmunol.180.12.8280.

10. Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, et al. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science*. 2008;320(5873):226-230. doi: 10.1126/science.1154986.
11. Krivokrysenko VI, Toshkov IA, Gleiberman AS, et al. The Toll-Like Receptor 5 Agonist Entolimod Mitigates Lethal Acute Radiation Syndrome in Non-Human Primates. *PLoS One*. 2015;10(9):e0135388. doi: 10.1371/journal.pone.0135388.
12. Singh VK, Garcia M, Seed TM. A review of radiation countermeasures focusing on injury-specific medicinals and regulatory approval status: part II. Countermeasures for limited indications, internalized radionuclides, emesis, late effects, and agents demonstrating efficacy in large animals with or without FDA IND status. *Int J Radiat Biol*. 2017;93(9):870-884. doi: 10.1080/09553002.2017.1338782.
13. Krivokrysenko VI, Shakhov AN, Singh VK, et al. Identification of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6 as candidate biomarkers of CBLB502 efficacy as a medical radiation countermeasure. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;343(2):497-508. doi: 10.1124/jpet.112.196071.
14. Lopez-Yglesias AH, Zhao X, Quarles EK, et al. Flagellin induces antibody responses through a TLR5- and inflammasome-independent pathway. *J Immunol*. 2014;192(4):1587-1596. doi: 10.4049/jimmunol.1301893.
15. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappa B signaling. *Immunol Rev*. 2006;210:171-186. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00375.x.
16. Chen H, Wang ZD, Chen MS, et al. Activation of Toll-like receptors by intestinal microflora reduces radiation-induced DNA damage in mice. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;774:22-28. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.09.001.
17. Li W, Ge C, Yang L, et al. CBLB502, an agonist of Toll-like receptor 5, has antioxidant and scavenging free radicals activities in vitro. *Int J Biol Macromol*. 2016;82:97-103. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.033.
18. Wang Z-D, Qiao Y-L, Tian X-F, et al. Toll-like Receptor 5 Agonism Protects Mice from Radiation Pneumonitis and Pulmonary Fibrosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(9):4763-4767. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.9.4763.
19. Zhou S-X, Li F-S, Qiao Y-L, et al. Toll-like Receptor 5 Agonist Inhibition of Growth of A549 Lung Cancer Cells *in Vivo* in a Myd88 Dependent Manner. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(6):2807-2812. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.6.2807.
20. Toshkov IA, Gleiberman AS, Mett VL, et al. Mitigation of Radiation-Induced Epithelial Damage by the TLR5 Agonist Entolimod in a Mouse Model of Fractionated Head and Neck Irradiation. *Radiat Res*. 2017;187(5):570-580. doi: 10.1667/RR14514.1.
21. Liu Z, Lei X, Li X, et al. Toll-like receptors and radiation protection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(1):31-39. doi: 10.26355/eurrev_201801_14097.
22. Brackett CM, Kojouharov B, Veith J, et al. Toll-like receptor-5 agonist, entolimod, suppresses metastasis and induces immunity by stimulating an NK-dendritic-CD8+ T-cell axis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(7):E874-883. doi: 10.1073/pnas.1521359113.
23. Kojouharov BM, Brackett CM, Veith JM, et al. Toll-like receptor-5 agonist Entolimod broadens the therapeutic window of 5-fluorouracil by reducing its toxicity to normal tissues in mice. *Oncotarget*. 2014;5(3):802-814. doi: 10.18632/oncotarget.1773.

Поступила в редакцию: 16.08.2018

Контакт: Генрих Александрович Софронов; gasofronov@mail.ru

Сведения об авторах:

Елена Викторовна Мурзина — канд. биол. наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории (лекарственной и экологической токсикологии) научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург.

Генрих Александрович Софронов — д-р мед. наук, профессор, академик РАН, начальник научно-исследовательской лаборатории (лекарственной и экологической токсикологии) научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург; научный руководитель ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: gasofronov@mail.ru.

Elena V. Murzina — PhD in Biology, Senior Research Associate, Research Laboratory of Medicinal and Environmental Toxicology, Research Center of the Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia.

Genrikh A. Sofronov — MD, PhD, Professor, Member of the RAS, Head of the Research Laboratory of Medicinal and Environmental Toxicology, Research Center of the Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg; Scientific Supervisor of the Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: gasofronov@mail.ru.

Андрей Семенович Симбирцев — д-р биол. наук, профессор, чл.-кор. РАН, заместитель директора по научной работе ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА РФ, Санкт-Петербург; заведующий отделом медицинской биотехнологии и иммунофармакологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: simbirtsev@hpb-spb.com.

Наталья Владимировна Аксенова — канд. мед. наук, научный сотрудник научно-исследовательского отдела (Всеармейский регистр МО РФ) научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург.

Ольга Михайловна Веселова — научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории (лекарственной и экологической токсикологии) научно-исследовательского центра ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург.

Александр Митрофанович Ищенко — канд. биол. наук, руководитель лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА РФ, Санкт-Петербург.

Andrei S. Simbirtsev — PhD in Biology, Professor, Corresponding Member RAS, Deputy Director for Science, State Scientific Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Saint Petersburg; Head of the Department of Medical Biotechnology and Immunopharmacology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: simbirtsev@hpb-spb.com.

Natalia V. Aksenova — MD, PhD, Research Associate, Research Department (All-Army Register of the Ministry of Defense of the Russian Federation) of the Research Center of the Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia.

Olga M. Veselova — Research Associate, Research Laboratory of Medicinal and Environmental Toxicology, Research Center of the Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia.

Alexander M. Ischenko — PhD in Biology, Head of the Laboratory of Protein Biochemistry, State Scientific Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia.

УДК 616.34:579.8

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* СЕРОГРУППЫ O26, ВЫЗЫВАЮЩИХ ДИАРЕЙНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ДЕТЕЙ

М.А. Макарова¹, А.В. Дмитриев², З.Н. Матвеева¹, Л.А. Кафтырева¹

¹ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург;

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF STRAIN *ESCHERICHIA COLI* SEROGROUP O26 CAUSING DIARRHEAL DISEASES IN CHILDREN

M.A. Makarova¹, A.V. Dmitriev², Z.N. Matveeva¹, K.A. Kaftyreva¹

¹Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia;

²Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

© Коллектив авторов, 2018

Цель исследования — определить серотиповую принадлежность и факторы вирулентности штаммов *E. coli* серогруппы O26, выделенных от детей с диарейным синдромом. **Материалы и методы.** Изучены 53 штамма *E. coli* O26, выделенные в 2014–2016 гг. из испражнений детей с клиническими проявлениями острой кишечной инфекции (ОКИ) в Санкт-Петербурге. Использовали фенотипические (определяли ферментативные и антигенные свойства, продукцию шига-токсинов) и молекулярно-генетические (ПЦР) методы: проводили детекцию генов вирулентности, характерных для энтеропатогенных (ЕПЕС) и энтерогемотоогических (ЕНЕС) *E. coli* (*eae*, *bfp*, *hlyA* и *eae*, *stx1*, *stx2*, *ehxA* соответственно), генов, кодирующих О- и Н-антигены (*rfb* и *fliC*), генов, определяющих филогенетическую группу (*chuA*, *yjaA* и *TspE*). Определяли филогенетическую группу и продукцию шига-токсинов. **Результаты исследований.** Все штаммы *E. coli* были идентичны по антигенной характеристике — относились к серотипу O26:H11 и принадлежали к филогенетической группе B1. По набору генов вирулентности относились к двум патогруппам: а-ЕПЕС (64,2 %) и ЕНЕС (35,8 %). Штаммы ЕНЕС продуцировали шига-токсин 1, кодируемый геном *stx1*. Различия в ферментативной активности между штаммами *E. coli* O26:H11 ЕПЕС и ЕНЕС выявлены не были. **Заключение.** В данной работе показано, что в популяции *E. coli* O26:H11, вызывавших ОКИ у детей в Санкт-Петербурге, более 30 % штаммов принадлежали к группе ЕНЕС. Молекулярно-генетические методы позволяют достоверно определять высоковирулентные штаммы возбудителей эшерихиозов.

Ключевые слова: диареогенные *E. coli* O26; факторы вирулентности; ЕПЕС; ЕНЕС.

Aim. To determine the serotype and virulence factors of the *E. coli* serogroup O26 isolated from children with diarrheal syndrome. **Materials and methods.** Fifty-three strains of *E. coli* O26 isolated in 2014–2016 from the stool of children with clinical manifestations of acute intestinal infection in Saint Petersburg were studied. Phenotypic (enzymatic and antigenic properties), molecular genetic [detection of virulence genes of enteropathogenic (EPEC — *eae*, *bfp*, *hlyA*), and enterohemorrhagic (EHEC — *eae*, *stx1*, *stx2*, *ehxA*), genes encoding O- and H-antigens (*rfb* and *fliC*), genes, defining phylogenetic group (*chuA*, *yjaA* and *TspE*)] methods were used. The phylogenetic group and the production Shiga toxins were determined. **Results.** All strains were identical to the antigen characteristics of serotype O26:H11 and phylogenetic group B1. Two pathogroups were created based on the set of virulence genes: a-EPEC (64.2%) and EHEC (35.8%). Strains EHEC produced Shiga-toxin 1, encoding gen *stx1*. No differences in enzymatic activities were found between the strains of *E. coli* O26:H11 for EPEC and EHEC strains. **Conclusion.** In the population of *E. coli* O26:H11, which caused acute intestinal infection in children in Saint Petersburg, more than 30% of the strains belonged to the highly virulent group EHEC. Molecular-genetic methods should be used for reliable detection of pathogens.

Keywords: diarrheagenic *E. coli* O26; virulence factors; EPEC; EHEC.

протекать как в тяжелой, так и в легкой форме. При спорадических случаях дети старшего возраста и взрослые переносили заболевание в легкой форме, и нередко отмечалось здоровое «носительство». По мнению отдельных клиницистов, «эшерихиоз O26» часто протекал очень тяжело. В 1958 г. были зарегистрированы две вспышки ОКИ, этиологически связанные с *E. coli* O26: одна — среди взрослых, протекавшая по типу пищевой интоксикации, и вторая — среди 43 новорожденных детей, 9 из которых умерли.

Наши исследования подтвердили серотиповую принадлежность штаммов, циркулирующих в настоящее время, к *E. coli* O26:H11 и показали, что современная популяция гетерогенна по наличию генов, контролирующих факторы вирулентности. Данные литературных источников свидетельствуют о том, что тяжелые формы ОКИ у детей и взрослых вызывают *E. coli* O26, продуцирующие шига-токсины (ЕНЕС). Заболевания, вызванные *E. coli* O26 (ЕРЕС), протекают чаще в легкой форме. Сравнительные исследования, проведенные в Санкт-Петербурге, продемонстрировали, что ПЦР-диагностика выявила широкую распространенность у детей с ОКИ патогенных

E. coli O26. По частоте обнаружения доминировали ЕРЕС — 64,2 %, доля ЕНЕС составляла 35,8 % [20]. Бактериологическим методом диареогенные *E. coli* O26 не могли быть разделены на ЕРЕС и ЕНЕС.

Выводы

Популяция *E. coli* O26:H11 включает штаммы с генотипами вирулентности ЕРЕС и ЕНЕС, которые не могут быть достоверно идентифицированы при классическом бактериологическом исследовании. Методы детекции шига-токсинов/генов, ответственных за их продукцию, необходимо внедрять в клиническую практику врачей-бактериологов для диагностики ЕНЕС-инфекции. При ранней диагностике ЕНЕС-ассоциированных гемоколитов возможна коррекция терапии пациентов (исключение/ограничение применения антибактериальных препаратов бактерицидного действия) для снижения риска развития ГУС и ОПН как инвалидизирующих осложнений. Молекулярно-генетические методы расширяют аналитические и диагностические возможности лабораторных исследований при диарейных заболеваниях эшерихиозной этиологии.

Список литературы

1. Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Макарова М.А., и др. Характеристика биологических свойств *E. coli* O104:H4 — возбудителя крупной пищевой вспышки, возникшей в Германии в мае 2011 г. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2012. — № 1. — С. 44–47. [Kaftyreva LA, Egorova SA, Makarova MA, et al. The characteristics of biological properties of *E. coli* O104:H4 — the causative agent of large-scale alimentary ictus in Germany May 2011. *Klin Lab Diagn.* 2012;(1):44-47. (In Russ.)]
2. Федеральная служба государственной статистики (Росстат). Здравоохранение в России — 2017. Статистический сборник. — М., 2017. [Federal'naya sluzhba gosudarstvennoy statistiki (Rosstat). Zdravookhranenie v Rossii — 2017. Statisticheskiy sbornik. Moscow; 2017. (In Russ.)]
3. Bell BP, Griffin PM, Lozano P, et al. Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics.* 1997;100(1):E12. doi: 10.1542/peds.100.1.e12.
4. Bielaszewska M, Zhang W, Tarr PI, et al. Molecular profiling and phenotype analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM: secular and geographic consistency of enterohemorrhagic and enteropathogenic isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4225-4228. doi: 10.1128/JCM.43.8.4225-4228.2005.
5. Онищенко Г.Г., Дятлов И.А., Светоч Э.А., и др. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году // Вестник Российской академии медицинских наук. — 2015. — Т. 70. — № 1. — С. 70–81. [Onishchenko GG, Dyatlov IA, Svetoch EA, et al. Molecular-genetic Characterization of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* Isolated During a Food-Borne Outbreak in Saint Petersburg in 2013. *Annals of the Russian academy of medical sciences.* 2015;70(1):70-81. (In Russ.)]. doi: 10.15690/vramn.v70i1.1234.
6. Bielaszewska M, Mellmann A, Bletz S, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin Infect Dis.* 2013;56(10):1373-1381. doi: 10.1093/cid/cit055.
7. Misselwitz J, Karch H, Bielaszewska M, et al. Cluster of hemolytic-uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(4):349-354. doi: 10.1097/01.inf.0000059338.38673.ae.
8. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):142-201. doi: 10.1128/CMR.11.1.142.

9. Kruger A, Lucchesi PM, Sanso AM, et al. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strains isolated from animal, food, and clinical samples. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:74. doi: 10.3389/fcimb.2015.00074.
10. Vygen-Bonnet S, Rosner B, Wilking H, et al. Ongoing haemolytic uraemic syndrome (HUS) outbreak caused by sorbitol-fermenting (SF) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157, Germany, December 2016 to May 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(21). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.21.30541.
11. Bonardi S, Alpigliani I, Tozzoli R, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157, O26 and O111 in cattle faeces and hides in Italy. *Vet Rec Open.* 2015;2(1):e000061. doi: 10.1136/vetreco-2014-000061.
12. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J Infect Dis.* 2005;192(8):1422–1429. doi: 10.1086/466536.
13. Durso LM, Bono JL, Keen JE. Molecular serotyping of *Escherichia coli* O26:H11. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(8):4941–4944. doi: 10.1128/AEM.71.8.4941-4944.2005.
14. Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46(5):1752–1757. doi: 10.1128/JCM.02341-07.
15. Tobias J, Vutukuru SR. Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic *Escherichia coli*. *Microbiol Res.* 2012;167(9):564–570. doi: 10.1016/j.micres.2011.11.006.
16. El-Rami FE, Rahal E, Sleiman FT, Abdelnoor AM. Identification of virulence genes among antibacterial-resistant *Escherichia coli*. *Adv Stud Biol.* 2012;4(8):385–396.
17. Slanec T, Fruth A, Creuzburg K, Schmidt H. Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(19):6187–6197. doi: 10.1128/AEM.00874-09.
18. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4555–4558. doi: 10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000.
19. Afset JE, Bergh K, Bevanger L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 11):1015–1019. doi: 10.1099/jmm.0.05287-0.
20. Соколова Е.Д., Галтаева А.М., Замурин О.Ю., и др. Полимеразно-цепная реакция в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном стационаре: возможности и проблемы // Инфекция и иммунитет. — 2016. — Т. 6. — № 3. — С. 225–231. [Sokolova ED, Galtaeva AM, Zamurin OY, et al. Acute enteric infections polymerase chain reaction assay in pediatric practice: opportunities and challenges. *Russian journal of infection and immunity.* 2016;6(3):225–231. (In Russ.).] doi: 10.15789/2220-7619-2016-3-225-231.

Поступила в редакцию: 16.07.2018

Контакт: Лидия Алексеевна Кафтырева; kaflidia@mail.ru

Сведения об авторах:

Мария Александровна Макарова — канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург. E-mail: makmaria@mail.ru.

Александр Валентинович Дмитриев — д-р биол. наук, профессор РАН, директор ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: admitriev10@yandex.ru.

Зоя Николаевна Матвеева — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Лидия Алексеевна Кафтырева — д-р мед. наук, заведующая лабораторией кишечных инфекций ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург. E-mail: kaflidia@mail.ru.

Maria A. Makarova — PhD (Medicine), Senior Researcher of the Laboratory of Enteric Infections, Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia. E-mail: makmaria@mail.ru.

Alexander V. Dmitriev — PhD (Biology), Doctor of Science (Biology), Professor of Russian Academy of Sciences, the Director of the Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. E-mail: admitriev10@yandex.ru.

Zoya N. Matveeva — PhD (Medicine), Leading Researcher of the Laboratory of Enteric Infections, Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Lidiia A. Kaftyreva — PhD (Medicine), Doctor of Science (Medicine), the Head of the Laboratory of Enteric Infections, Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia. E-mail: kaflidia@mail.ru.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

1. Статьи для публикации должны быть написаны на русском языке, иметь реферат (резюме), ключевые слова (3–4) на русском и английском языках.
2. Статьи представляются в редакцию на электронных и бумажных носителях. Если у автора есть затруднения с пересылкой статьи по почте, предоставление материала возможно в электронном виде. Все страницы должны быть пронумерованы от первой до последней страницы, без пропусков и литерных добавлений (например, 2а и т. п.).
3. Объем статьи не должен превышать:
 - 3.1. Передовая статья, обзор, лекция — 25 страниц;
 - 3.2. Оригинальная статья — 15 страниц;
 - 3.3. Рекомендации для врачей — 5 страниц;
 - 3.4. Рецензии, информация, хроника — 3 страницы.
4. Статья должна иметь следующие разделы.
 - 4.1. Титульный лист — указываются название статьи, инициалы и фамилии авторов, полное название учреждения, город на русском и английском языках. Титульный лист должен быть подписан всеми авторами.
 - 4.2. Резюме — до 1500 знаков, отражает цель, основные методы исследований, важнейшие результаты.
 - 4.3. Основной текст должен включать в себя следующие разделы, расположенные в установленном порядке:
 - 4.3.1. Введение;
 - 4.3.2. Материалы и методы исследования — обязательно указываются сведения о статистической обработке экспериментального или клинического материала;
 - 4.3.3. Результаты и их обсуждение;
 - 4.3.4. Выводы;
 - 4.3.5. Литература не более 25 источников для оригинальной статьи и 75 для обзора.
5. Каждая таблица должна иметь номер и название. Рисунки, графики, схемы должны быть черно-белыми с различимой штриховкой, выполнены в электронном (отдельными файлами с сохранением возможности редактирования) и бумажном вариантах отдельно от текста, а также иметь подрисовочные подписи без сокращений и дублироваться в тексте. При включении в публикацию растровой графики (сканированных, цифровых снимков, снимков с экрана мониторов и т. п.) предпочтение отдается рисункам с размером меньшей стороны не менее 5 см (640 пикселей), в форматах pdf, tiff, jpeg (максимальное качество).
6. Библиографический список.
 - 6.1. Библиографические описания источников располагают в порядке упоминания их в тексте статьи и нумеруют арабскими цифрами.
 - 6.2. В лекции можно давать список рекомендуемой литературы, и тогда в тексте ссылаться на источники не обязательно.
 - 6.3. Библиографический список оформляют в соответствии с действующим ГОСТом. Если у публикации более четырех авторов, то после третьего автора необходимо поставить сокращение «... и др.».
 - 6.4. Ссылки на цитируемые работы в тексте дают в виде порядковых номеров, заключенных в квадратные скобки. Не рекомендуется включать в список литературы диссертации.
 - 6.5. Примеры:
 1. Ткаченко Б.И. Физиология человека. — СПб.: Наука, 2000. — 400 с.
 2. Шабанов П.Д. Механизмы лекарственной зависимости // Мед. акад. вестн. — 2001. — Т. I. — № 1. — С. 27–35.
 3. Лебедев А.А. Поведенческие эффекты алаптида у крыс-изолянтов // Эмоциональное поведение / Под ред. Е. С. Петрова. — СПб.: Питер, 2000. — С. 56–78.
7. Данные об авторах статьи должны включать следующие сведения: фамилия, имя, отчество, место работы с указанием города и страны, адрес для переписки и номер телефона для связи, e-mail.
8. Все термины, употребляемые в статье, должны строго соответствовать действующим номенклатурам (анатомической, гистологической и др.), названия лекарственных средств — Государственной фармакопее, единицы физических величин — системе единиц СИ.
9. Статьи, поступившие в редакцию, обязательно рецензируются. Если у рецензента возникают вопросы, статья возвращается на доработку. Датой поступления статьи считается дата получения редакцией окончательного варианта статьи. Редакция оставляет за собой право внесения редакторских изменений в текст, не искажающих смысла статьи.

10. Авторское право на конкретную статью принадлежит авторам статьи, что отмечается знаком ©. За издательством остается право на оформление, издание, распространение и доведение до всеобщего сведения публикаций, а также включение журнала в различные базы данных и информационные системы. При перепечатке статьи или ее части ссылка на журнал обязательна.
11. Редакция высылает авторам 1 копию журнала, в котором опубликована статья.
12. Редакция не выплачивает гонорара за статьи и не взимает плату за опубликование рукописей.
13. Журнал публикует рекламу по профилю журнала в виде отдельных рекламных модулей, статей, содержащих коммерческую информацию по профилю журнала с указанием «Публикуется на правах рекламы». Размещение рекламы в журнале платное. Объем помещения рекламной информации в журнале ограничен.
14. Материалы следует направлять ответственному секретарю Алексею Викторовичу Соколову. Адрес: 197376, Санкт-Петербург, улица академика Павлова, 12, электронная почта: medicalacademicjournal@gmail.com, biochemsokolov@gmail.com.

**Мы рады всем Вашим статьям, представленным в наш журнал!
Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов
опубликованных материалов.**

**Редакция не несет ответственности за последствия,
связанные с неправильным использованием информации.**

Медицинский академический журнал

Свидетельство о регистрации: ПИ № 2-4952 от 17.01.2001 г.

Редакция:
Корректор *Т.А. Дич*
Верстка *А.Г. Хуторовской*

Оригинал-макет изготовлен ООО «Эко-Вектор».
<https://journals.eco-vector.com>

Формат 60×90¹/₈. Усл. печ. л. 11,5. Тираж 1000 экз. Цена свободная.
Подписано в печать 28.09.2018. Заказ

Изготовлено ООО «АЛЬГИЗ».
199106, Санкт-Петербург, Московское шоссе, 25.