RUSSIAN BIOMEDICAL RESEARCH

2017, VOLUME 2, N 2 SCIENTIFIC AND PRACTICAL JOURNAL FOR DOCTORS

Рецензируемый научно-практический журнал
RUSSIAN BIOMEDICAL RESEARCH
РОССИЙСКИЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основан в 2016 году в Санкт-Петербурге

Ежеквартальное издание
Журнал реферируется РЖ ВИНИТИ

Учредитель:
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России

Журнал зарегистрирован Управлением Федеральной службы по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций по Северо-Западному федеральному округу,
ПИ № ТУ78-01871 от 17 мая 2016 г.

Журнал индексируется в РИНЦ. Договор на включение журнала в базу РИНЦ: № 538-10/2016 от 06.10.2016, страница журнала в Российской научной электронной библиотеке http://elibrary.ru/title_about.asp?id=62014.

Проект-макет: Титова Л. А.

Распространяется по подписке.
Электронная версия —
http://RBMR.gpma.ru/, http://elibrary.ru

Издатель, учредитель:
ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России
Титова Л.А. (выпускающий редактор)
Варламова И.Н. (верстка)

Адрес редакции: Литовская ул., 2,
Санкт-Петербург, 194100;
тел/факс: (812) 295-31-55; e-mail: lt2007@inbox.ru
Статьи просьба направлять по адресу:
scrcenter@mail.ru

Address for correspondence:
2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia.
Tel/Fax: +7 (812) 295-31-55.
E-mail: **lt2007@inbox.ru**.

Формат 60 × 90/8. Усл.-печ. л. 6,5.
Тираж до 500 экз. Распространяется бесплатно.
Оригинал-макет изготовлен
ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России.
Отпечатано ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава
Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, 194100.
Заказ 73.
Подписано в печать 07.07.2017.

Полное или частичное воспроизведение материалов, содержащихся в настоящем издании, допускается только с письменного разрешения редакции.
Ссылка на журнал «Российские биомедицинские исследования/ Russian Biomedical Research » обязательна.

Редакционная коллегия:	*Editorial Board:*
Главный редактор	**Head Editor**
д. м. н., профессор **А.Г. Васильев**	Professor **A.G. Vasilev**, MD, PhD
Зам. гл. редактора	**Head Editor-in-Chief**
д. м. н., профессор **Н.Р. Карелина**	Professor **N.R. Karelina**, MD, PhD
Технический редактор	**Technical Editor**
М.А. Пахомова	**M.A. Pahomova**
д. м. н., профессор **Н.С. Абдукаева**	**N.S. Abdukaeva**, PhD
д. п. н., профессор **В.А. Аверин**	**V.A. Averin**, PhD
д. м. н., профессор **Э.И. Валькович**	**E.I. Valkovich**, MD, PhD
д. м. н., профессор **Л.А. Данилова**	**L.A. Danilova**, MD, PhD
д. м. н., профессор **Е.Н. Имянитов**	**E.N. Imianitov**, MD, PhD
д. м. н., профессор **А.М. Королюк**	**A.M. Koroljuk**, MD, PhD
д. м. н., профессор **С.А. Лытаев**	**S.A. Lytaev**, MD, PhD
д. м. н., профессор **Г.Л. Микиртичан**	**G.L. Mikirtichan**, MD, PhD
д. м. н., профессор **И.Б. Михайлов**	**I.B. Mihailov**, MD, PhD
д. м. н., профессор **В.И. Николаев**	**V.I. Nikolaev**, MD, PhD
д. м. н., профессор **С.Н. Прошин**	**S.N. Proshin**, MD, PhD
д. б. н. **М.Л. Фирсов**	**M.L. Firsov**, PhD
к. м. н., доцент **Л.П. Чурилов**	**L.P. Churilov**, MD, PhD
д. б. н. **А.О. Шпаков**	**A.O. Shpakov**, PhD

2017, ТОМ 2, № 2 НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ ДЛЯ ВРАЧЕЙ

РОССИЙСКИЕ БИОМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

СОДЕРЖАНИЕ CONTENT

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Питер Дж. Дж. Зауэр
Загрязнение окружающей среды — угроза для детей 3

И.В. Беляева, Л.П. Чурилов, Л.Р. Михайлова, А.В. Николаев, А.А. Старшинова, Ю.С. Зинченко, П.К. Яблонский
Цитокины при различных формах легочного туберкулеза..... 10

Е.Л. Назарова, И.А. Дятлов, Н.М. Поздеев, В.Т. Демьянова, И.В. Парамонов, А.В. Рылов, М.В. Храмов, А.И. Борзилов, А.Н. Сомов, В.Г. Абламуниц, А.П. Анисимов
Генетические маркеры иммунного ответа на антигены Yersinia pestis F1 и V микрокапсулированной чумной вакцины 19

Н.В. Хайцев, Л.Д. Балашов, А.А. Кравцова, М.А. Пахомова
Оценка потенциальных адаптивных возможностей организма детей и подростков для занятий физической культурой 29

Н. Р. Карелина, И. Д. Димов, К. И. Пелих, Г. В. Безнусенко, И. С. Сесорова, А. А. Миронов
Структурно-функциональные основы всасывания в кишечной ворсинке 34

ИНФОРМАЦИЯ

Правила для авторов 44

ORIGINAL PAPERS

P. J. J. Sauer
Environmental Pollutants, a Threat for Children 4

I. V. Belyaeva, L. P. Churilov, L. R. Mikhailova, A. V. Nicolaev, A. A. Starshinova, U. S. Zinchenko, P. K. Yablonskiy
Cytokines in Different Forms of Pulmonary Tuberculosis 10

E. L. Nazarova, I. A. Dyatlov, N. M. Pozdeev, V. T. Demyanova, I. V. Paramonov, A. V. Rylov, M. V. Khramov, A. I. Borzilov, A. N. Somov, V. G. Ablamunits, A. P. Anisimov
Genetic Markers of Immune Response to Yersinia pestis F1 and V Antigens-loaded Microspheres Vaccine Against Plague 19

N. V. Khaitsev, L. D. Balashov, A. A. Kravtsova, M. A. Pakhomova
Assessment of Potential Adaptive Capability in Children's And Teenagers' Organism for Going in for Sport and Physical Training 29

Natalia R. Karelina, Ivan D. Dimov, K.I. Pelih, G.V. Beznusenko, I.S. Sesorova, A.A. Mironov
Structural and functional basis of absorption in an intestinal villus..... 34

INFORMATION

Rules for authors 44

УДК 574.24+ 616-053.2

ЗАГРЯЗНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ — УГРОЗА ДЛЯ ДЕТЕЙ

© Питер Дж. Дж. Зауэр

Университетский медицинский центр в Детском госпитале Беатрисы, Нидерланды, 9700 RB, Гронинген, п/я 30001, Ханзельплейн 1

Контактная информация: Питер Дж. Дж. Зауэр — доктор медицины, почетный профессор, отделение неонатологии Университетского медицинского центра в Детском госпитале Беатрисы. E-mail: p.j.j.sauer@umcg.nl

РЕЗЮМЕ: Фетальный и ранний постнатальный периоды относятся к наиболее уязвимым периодам жизни человека, когда даже относительно незначительные воздействия оказываются достаточными для возникновения стойких повреждений. Влияние поллютантов в окружающей среде на плод и новорожденного остается в настоящее время малоизученными. Исследования показали, что загрязняющие вещества могут оказывать негативный эффект на массу тела новорожденного, на психомоторное и половое развитие, на функционирование эндокринных органов, в частности щитовидной железы, на формирование иммунного ответа и формирование клинической картины заболеваний в дальнейшей жизни. Различают несколько источников поллютантов: 1) промышленность, производящая и использующая загрязняющие вещества, 2) вещества, используемые в домашнем хозяйстве и личной гигиене, 3) пестициды используемые в сельском хозяйстве, 4) добыча полезных ископаемых, 5) транспорт, 6) курение родителей. Среди опасных веществ, сопутствующих промышленному производству, необходимо отметить полихлорбифенилы (ПХБ) и бромированные субстанции (БС), среди веществ, используемых в домашнем хозяйстве и личной гигиене — бисфенол А, фталаты, свинец, метилртуть. Пестициды — ДДТ и фосфорорганические вещества — представляют особый интерес. Несмотря на то, что ДДТ, активно используемый в 50–60-х годах прошлого века, запрещен уже 50 лет тому назад, он и сейчас входит в список опасных субстанций. Транспортные потоки, производящие большое количество газов — таких как NO_2, CO_2, мелкие пылевые частицы (PM 10, PM 2,5) и элементарный углерод, также являются источником поллютантов. Курение — в основном курение родителей — еще один очень важный источник угрозы. Исследования показали, что добыча и плавка никеля сопровождаются продукцией большого количества сернистого газа. Кроме того, это производство приводит к появлению в воздухе большого количества очень маленьких пылевых частиц — наиболее вредного компонента загрязнения воздуха. Хотя теоретически жизнь вблизи предприятий никелевого производства представляется небезопасной, в настоящее время практически не проводится научных работ, направленных на изучение влияния факторов, сопровождающих добычу и выплавку никеля, на здоровье детей. Известно, что практически все поллютанты влияют на деятельность мозга, эндокринной, иммунной и сердечно-сосудистой систем, механизм их влияния может быть различным. Механизм влияния многих веществ остается неизученным. ПХБ и многие другие поллютанты являются разрушителями эндокринной системы, изменяя активность гормонов щитовидной железы и половых гормонов. При этом остается неизвестным, является ли повреждение мозга вторичным по отношению к нарушению деятельности щитовидной железы. Возможен также прямой эффект ПХБ и других поллютантов на развитие органов. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов могут быть еще одним фактором повреждающего влияния поллютантов. Изменение активности генов может быть причиной негативных изменений в последующих поколениях. В экспериментах на животных экспериментально доказано наличие эпигенетических механизмов повреждения в структуре токсического влияния пестицидов, причем их эффект был выявлен в четвертом поколении. Такие механизмы, возможно, имеют место при курении.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: плод; новорожденный; поллютанты в окружающей среде; эндокринная система; эпигенетические механизмы.

ENVIRONMENTAL POLLUTANTS, A THREAT FOR CHILDREN

© Pieter J. J. Sauer

Beatrix Children's Hospital, University Medical Center, Hanzeplein 1, P.O. Box 30001, 9700 RB Groningen, The Netherlands

Contact information: Pieter J. J. Sauer — MD, PhD, Emetitus Professor of Pediatrics, Division of Neonatology at the Beatrix Children's Hospital, University Medical Center. E-mail: p.j.j.sauer@umcg.nl

ABSTRACT: The fetal and early postnatal are the most vulnerable periods of life, when even relatively small disturbances can lead to permanent damage. Relatively unknown risks for the fetus and young infant are environmental pollutants — compounds, present in the environment that can affect human health. Studies have shown that these compounds may have negative effects on birth weight, psychomotor and sexual development, endocrine organs like the thyroid gland, immune responses and the development of diseases in later life. Different sources of environmental pollutants and different products can be distinguished: 1. compounds produced and used шт industrial processes, 2. compounds used in household and personal care, 3. pesticides used in agriculture, 4. pollution caused by mining, 5. air pollution caused by traffic, 6. smoking by parents. Among dangerous compounds produced and used in industrial processes are Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Brominated compounds (BCs), among products which are used in households and personal care — bisphenol A, phthalates, lead, methyl mercury. Pesticides — DDT and organophosphates — are the compounds of special interest. DDT despite it had been used extensively in the 1950s and 1960s and was banned 50 years ago is known to be harmful even now. Traffic, producing gases like NO2, Co2 as well as very small particles (PM 10, PM 2.5) and elemental carbon, is an important source of environmental pollutants. Smoking, mainly by parents, is another very important thread to children. Studies have shown that nickel mining and smelting result in the production of high concentrations of sulferdioxide gas. The air is also polluted by very small particles, the most dangerous part of air pollution. Though theoretically living besides nickel mining and melting plants is dangerous, nowadays studies on the effects of nickel mining on children seem to be lacking. While almost all compounds have effect on the brain, the endocrine system, the immune system and the cardiovascular system, mode of their action might be different. The mode of action of many substances is not well known. PCBs and many other compounds are endocrine disruptors, affecting the thyroid and sexual hormones. It is unclear however if effects on the thyroid hormones are the cause of brain damage. There might also be a direct effect of PCBs and other substances on the development of organs. Another mechanism of action of these pollutants might be to influence gene expression by epigenetics. The activity of genes might be affected, what can have results in next generations. This epigenetic effect has been shown for pesticides in animal studies, effects were seen till the fourth generation. Epigenetics might also been involved in the effects of smoking.

KEYWORDS: fetus; newborn; environmental pollutants; endocrine system; epigenetic mechanism.

Pediatricians are trained to protect, and when needed and possible, to restore the health of children. The most vulnerable period of life, when even relatively small disturbances can lead to permanent damage, lasting till adulthood, is the fetal and early postnatal period. Non-optimal circumstances during fetal life and the first period after birth may cause permanent damage in the infant. Medication given to the pregnant mother might have a permanent effect on the fetus or infant, while no side effects are seen in the mother. Fetal malnutrition is related to an increased risk for cardiovascular diseases, stroke, hypertension and lung diseases in later life. Relatively unknown risks for the fetus and young infant are environmental pollutants. Environmental pollutants are compounds, present in the environment that can affect human health [16]. Studies have shown that these compounds may have negative effects on birth weight, psychomotor and sexual development, endocrine organs like the thyroid gland, immune responses and the development of diseases in later life. Pediatricians have to be aware of these problems and, whenever possible, stimulate efforts to reduce these risks.

Different sources of environmental pollutants and different products can be distinguished:

1. compounds produced and used industrial processes
2. compounds used in household and personal care
3. pesticides used in agriculture
4. pollution caused by mining
5. air pollution caused by traffic
6. smoking by parents

In this paper we will briefly review the existing knowledge about the most well-known pollutants.

COMPOUNDS PRODUCED AND USED IN INDUSTRIAL PROCESSES

PCB's. Polychlorinated Biphenyls or PCBs are compounds that were widely used in industrial processes. These compounds are lipophilic and are hardly degraded, neither by humans nor in the environment. Although the use of these compounds have been banned decades ago in many countries, they are still widely present in the environment and also in humans, due to the resistance to degradation [4]. Levels are especially high in young children. PCBs are transported over the placenta from the mother to the fetus, studies showed almost equal levels in the fetus and the mother [15]. Breast milk is an important source of these compounds, due to the high fat content of breast milk. Many studies have shown that PCB's can have negative health effects, mainly in the fetus and newborn infant. Higher levels of PCBs result in a lower birth weight [11]. Postnatally these infants are more hypotonic. There is a delay in psychomotor development [9]. Levels of thyroid hormones are lower, as well as sex hormones in boys [12]. A higher exposure to prenatal PCB levels is related to a less responsive immune system [12]. The effects on psychomotor development are still present at adolescence [18].

Brominated compounds. When PCBs were banned, they were replaced by brominated compounds. These products are widely used, especially to make clothes, computers, furniture and carpets more flame retardant. Recent studies show that these compounds also have a negative effect on the psychomotor development [18]. More studies are needed to investigate if these compounds also have endocrine disrupting effects.

PRODUCTS USED IN HOUSEHOLDS AND PERSONAL CARE

Bisphenol A. Bisphenol A (BPA) is a compound used to make plastics more flexible. It is used in many different products, including children's toys, bottles for formula feeding and dummies. It was also used in infusion lines for patients, including newborn infants. Plasma levels of these compounds are especially high in newborn infants. Children are exposed to these compounds through contaminated food and bottles in which formula is given. Another route is the ingestion of contaminated dust and soil. Also, BPA can leak from toys. BPA is readily absorbed by the gastrointestinal tract. Children admitted to a NICU are exposed to these compounds through the use of intravenous and other lines. Higher levels of BPA are related to a lower birth weight, sexual development in boys, increased anxiety and depression and poorer emotional control at three years of age [13]. BPA may also have endocrine disrupting activities, on hormones like thyroid and sexual. This might cause a delay in neurodevelopment. Chronic exposure might cause ischemic heart disease, diabetes and obesity. Finally, concerns have been expressed over that past years that Bisphenol A might induce cancer. Given the risk of BPA, especially for small children, has the use of BPA has been restricted for materials used for small children.

Phthalates. Phthalates consist of a group of compounds also used to make plastics like toys more flexible. They are also used in products for personal care like cosmetics end deodorants. A frequently used product is DEHP. This compound is found to be endocrine disrupting, it is related to affect male and perhaps also female genital development [10]. Also an association was found with a decrease in birth weight. Phthalates are, like all environmental pollutants, transported over the placenta. Levels found in cord blood are almost equal, or slightly lower, compared to maternal levels. High levels of these compounds in the pregnant mother, for instance for DEHP caused by extensive use of cosmetics, therefore is very harmful to the unborn and newborn infant.

Lead. One of the eldest and most studied environmental pollutant is lead. Humans can be exposed to lead via food, drinking water and inhalation. An important source of lead in the environment was the addition of lead to gasoline used by cars. Children living close to a road with heavy traffic showed high plasma lead levels. Food can be contaminated due to lead containing farmland and dairy products from cows consuming polluted food. Smoke from cigarettes also contain lead. The fetus is exposed to lead by the transfer from the mother via the placenta. Many studies have shown that prenatal and early postnatal exposure to lead causes a marked reduction in intellectual development in infants [1]. The addition of lead to gasoline has been banned in most countries, however the land used for agriculture still contains relatively high concentrations of lead. Also, water pipes made of lead are still in use. These pipes are an important source of lead. Infants therefore continues to be exposed with all negative effects on mental development. Recently an accident occurred in the USA where drinking water was heavily contaminated with lead.

Methyl mercury. Studies have shown that methyl mercury has negative effects on the neurodevelopment of the fetus and young infant [20]. Humans are mainly exposed by eating polluted fish. Fish is contaminated through the presence of this compound in water. Levels in fish are high enough to cause damage in infants of mothers with regular fish consumption. On the other hand, is fish consumption very important for the pregnant mother because of the presence of poly unsaturated fatty acids, a-linolenic acid and its derivative DHA in fish. The psychomotor development is higher in off spring of mothers who have taken supplemental DHA during pregnancy as well as in children fed with sufficient DHA [20].

PESTICIDES

DDT. One of the eldest and well known pesticide is DDT and the degradation product DDE. DDT was used quite extensively in the 1950s and 1960s. Then, it became clear that not only weeds and parasites were killed by DDT, but also animals eating these weeds. It caused a dramatic mortality in birds, causing the well-known "silent spring". DDT was banned 50 years ago, but due to its persistence against degradation, it still can be found in the environment, but also in humans. DDT is not only harmful for animal, but also for infants. DDT causes a decrease in cognitive and motor delay in infants, a delay that persist in adulthood [8].

Organophosphates. Organophosphates are a group of pesticides that are quite extensively used in agriculture. These compounds have negative effects on human health. They do not only negatively influence the neuromotor development in children, they might also be able to induce cancer in adulthood [6]. Despite the risk are these compounds still widely used in agriculture due to their high efficacy to protect crops.

Traffic. Traffic is an important source of environmental pollutants. Traffic produces gasses like NO2, Co2, very small particles (PM 10, PM 2.5) and elemental carbon. Studies have shown that these compounds cause cardiovascular diseases like hypertension and cardiac infarction. It also causes severe lung damage in adults [17]. The life expectancy of an adult living close to a busy road is at least one year less then controls. Unborn and newborn children at especially at risk for negative effects of compounds produced by traffic. Birth weight of children born to mothers living close to a busy road is lower compared to controls. Children exposed to this air pollution show more lung infections and more -severe- asthma. This will likely result in severe COPD at later life. The World Health Organization (WHO) has published upper limits for air pollution. Unfortunately, is the air pollution in many cities in the world, including Russia, much higher than these limits. This results in permanent lung damage in young children and earlier death in adults. Heavy traffic must be banned from cities and schools and other buildings for children must not be built in the vicinity of a busy road. At this moment is air pollution due to traffic one of the main threads to children. That air pollution might be a problem in Russia, is shown in fig 1.

И Smoking, mainly by parents, is another very important thread to children. Maternal smoking during pregnancy results in a lower birth weight. It also leads to a permanent, life long, reduction in lung volume. Smoking by mother and father at home results in more and more severe asthma and also permanent changes in lung growth. Smoking is one of the most serious environmental pollutants for children [7].

Nickel mining. Studies have shown that nickel mining and smelting results in the production of high concentrations of sulferdioxide gas. The air is also polluted by very small particles, the most dangerous part of air pollution. People living close to nickel mining and smelting reported higher incidence of headache, pulmonary infections, palpitations, lower abdominal pain, shortness of breath, constant chest pains, unusual spitting, coughing regularly, loss of body weight, regular constipation, diarrhoea, nausea, vomiting, urinary pain, and unusual genital discharge [3]. Studies on the effects of nickel mining on children seem to be lacking. A study in Russia showed the effect of nickel mining on the environment (fig. 2).

How do these environmental pollutants have effect on the unborn and newborn infant? While almost all compounds have effect on the brain, the endocrine system, the immune system and the cardiovascular system, might mode of action be different. The mode of action of many substances is not well known. PCBs and many other compounds are endocrine disruptors, affecting the thyroid and sexual hormones. It is unclear however if effects on the thyroid hormones are the cause of brain damage. There might also be a direct effect of PCBs and other substances on

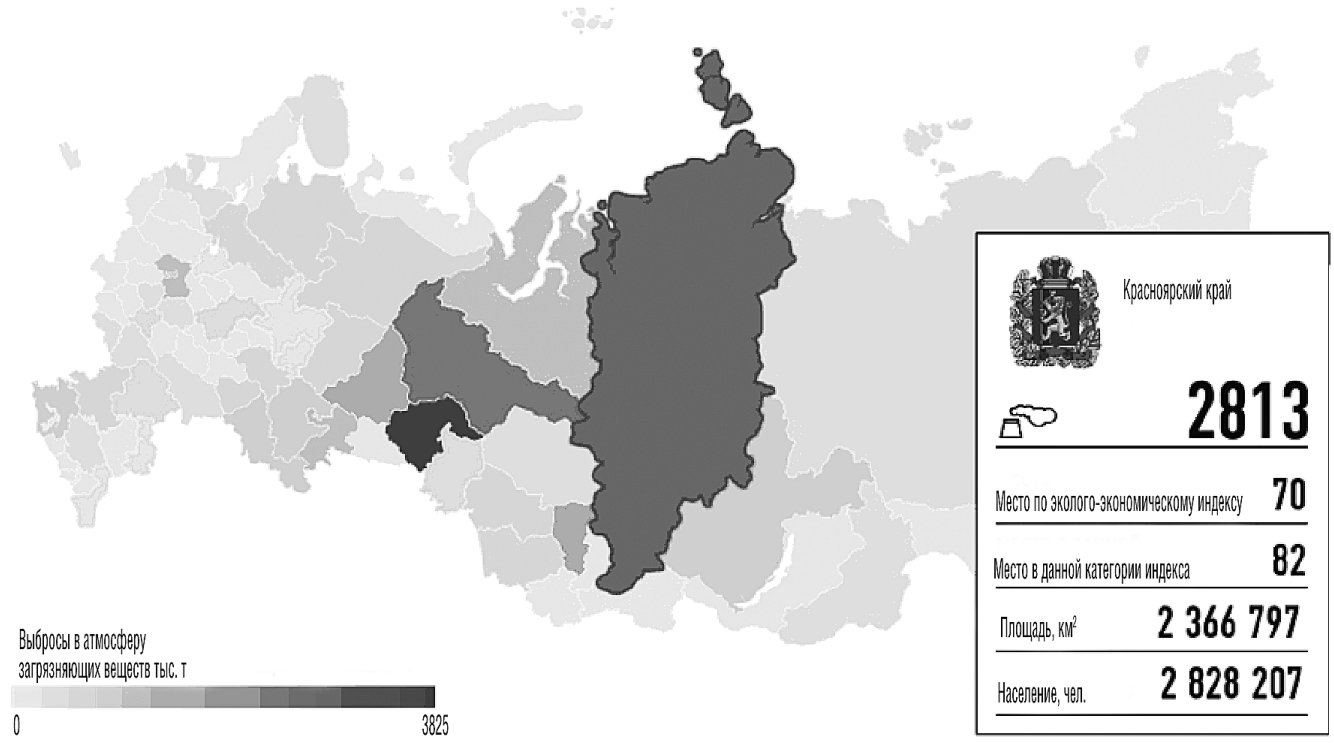


Fig.1. Air pollution in Russia: Krasnoyarsky krai [14]

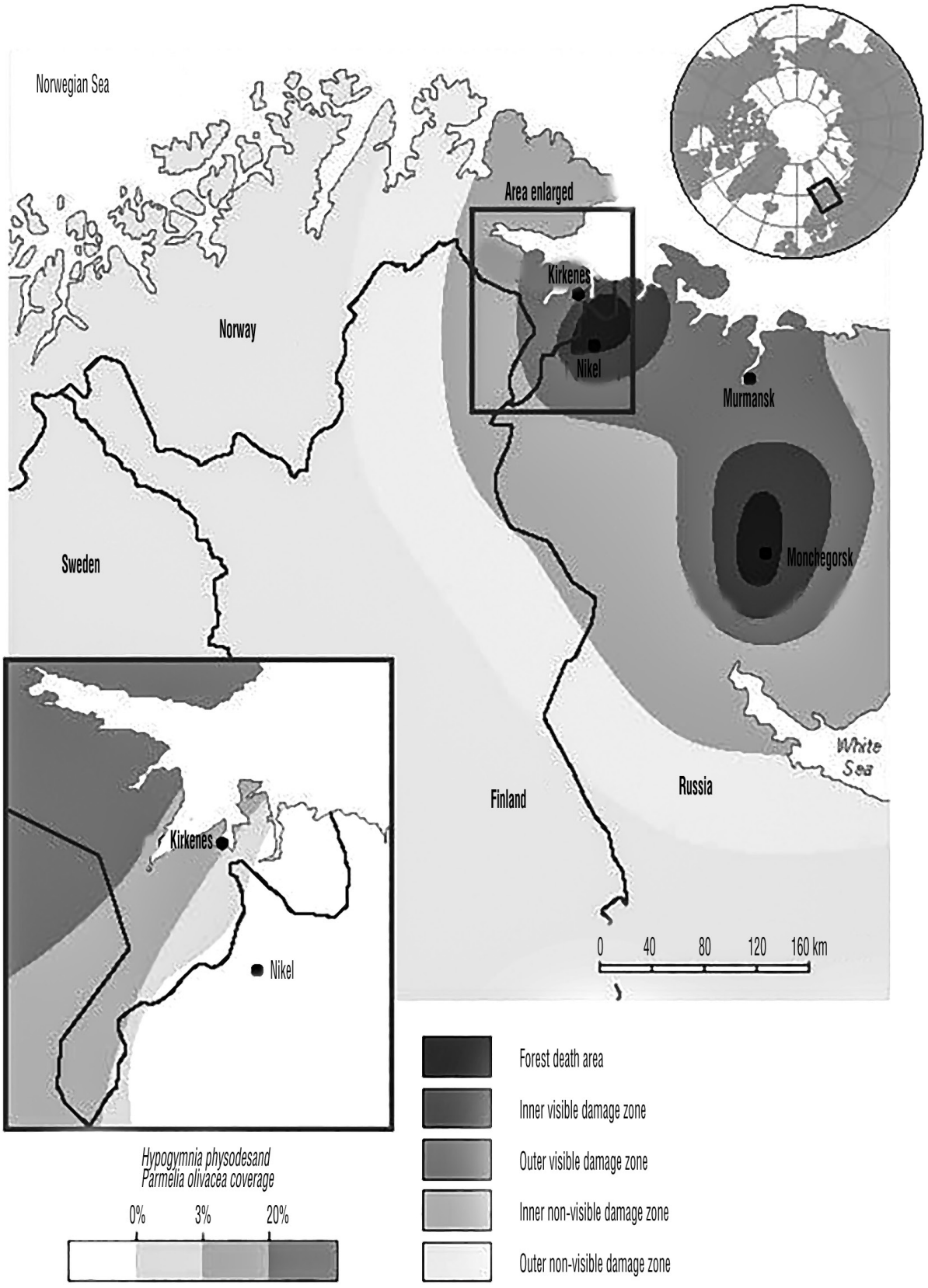


Fig. 2. Effects of Nickel mining and melting (AMAP, 2007) [2]

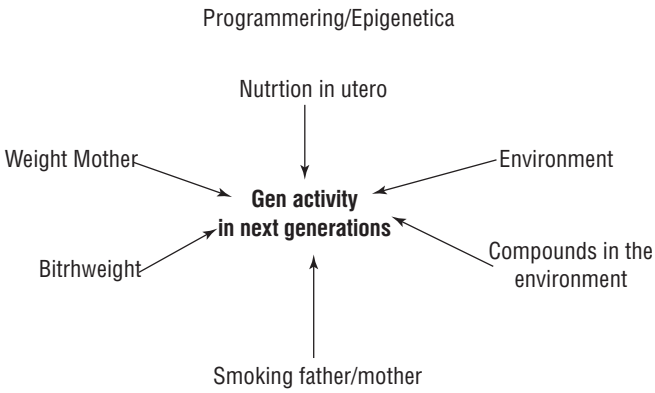


Fig.3. Ways to affect the activity of genes in next generations

the development of organs. Another mechanism of action of these pollutants might be to influence gene expression by epigenetics. The activity of genes might be affected, what can have results in next generations (fig 3). This epigenetic effect has been shown for pesticides in animal studies, effects were seen till the fourth generation [5]. Epigenetics might also been involved in the effects of smoking.

Environmental pollution in Russia. What is known about the environmental pollution in Russia and the effects on children? Not many studies have been published regarding the potential effects of environmental pollution on children in Russia. As far as I could find there were 13 studies on environmental pollution in Russia published in 2014–2015, all in Russian journals. One study showed that he places of work of the parents (wood chemical manufacturing, aluminum plant, petrochemical and chemical plant) influenced the incidence of upper respiratory tract infections in children [19]. There are no indications that the environmental pollution in Russia is very different from other industrialized countries. One study showed the air pollution in Moscow to be at least comparable to other big cities in the world. Another study indicated that the mortality due to air pollution in Russia is higher compares to other countries (fig 4).

Why are these studies important for pediatricians? All pollutants mentioned in this review cross the placenta, so the fetus is exposed to these compounds. The fetal and early postnatal period is the most critical period for the development of organs. Exposure to compounds, also at a low dose, can result in permanent damage in the newborn infant, causing life long effects. Breast milk contains many of the pollutants and is therefore another important source of these compounds in newborn children. Environmental pollutants therefore are more harmful for newborn infants than for adults. It is important that pediatricians realize that the occurrence of diseases in children might be related to the exposure to environmental pollutants.

In conclusion, we must assume that:

- Environmental pollution is widespread in the world
- This is very dangerous for humans, especially for children
- As pediatricians, we must ask our politicians to take care of our environment
- Pollution is costing lives and money
- We are polluting our planet, detrimental for our children and grand children



Fig.4. Deaths from air pollution [21]

- It is possible to prevent this to happen when we all are aware of the problem

REFERENCES

1. Allen K.A. Is Prenatal Lead Exposure a Concern in Infancy? What Is the Evidence? Adv Neonatal Care. 2015; 15 (6): 416–20. doi: 10.1097/ANC.
2. Arctic monitoring and assessment programme. AMAP assessment report. Arctic pollution issues, 2007. Available at: https://www.amap.no/documents/doc/approximate-forest-damage-zones-in-the-vicinity-of-monchegorsk-and-nikel-and-the-visible-damage-and-non-visible-damage-zones-on-the-kola-peninsula-and-finnish-lapland-the-inset-shows-coverage-of-lichens-hypogymnia-physodes-and-parmelia-olivacea-on/488 (accessed 16.05.2017).
3. Ekosse G.I. Health status within the precincts of a nickel-copper mining and smelting environment. Afr Health Sci. 2011; 11 (1): 90–6.
4. Grimm F.A., Hu D., Kania-Korwel I., Lehmler H.J., Ludewig G., Hornbuckle K.C., Duffel M.W., Bergman Å., Robertson L.W. Metabolism and metabolites of polychlorinated biphenyls. Crit Rev Toxicol. 2015; 45 (3): 245–72. doi: 10.3109/10408444.2014.999365.
5. Guerrero-Bosagna C., Covert T.R., Haque M.M., Settles M., Nilsson E.E., Anway M.D., Skinner M.K. Epigenetic transgenerational inheritance of vinclozolin induced mouse adult onset disease and associated sperm epigenome biomarkers. Reprod Toxicol. 2012; 34 (4): 694–707. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.09.005.
6. Gunier R.B., Bradman A., Harley K.G., Kogut K., Eskenazi B. Prenatal Residential Proximity to Agricultural Pesticide Use and IQ in 7-Year-Old Children. Environ Health Perspect. doi: 10.1289/EHP504. Available at: https://ehp.niehs.nih.gov/EHP504 (accessed 15.05.2017).
7. Herrmann M., King K., Weitzman M. Prenatal tobacco smoke and postnatal secondhand smoke exposure and child neurodevelopment. Curr Opin Pediatr. 2008; 20 (2): 184–90. doi: 10.1097/MOP.0b013e3282f56165.
8. Huisman M., Koopman-Esseboom C., Lanting C.I., van der Paauw C.G., Tuinstra L.G., Fidler V., Weisglas-Kuperus N., Sauer P.J., Boersma E.R., Touwen B.C. Neurological condition in 18-month-old children perinatally exposed to polychlorinated biphenyls and dioxins. Early Hum Dev. 1995; 43 (2): 165–76.
9. Koopman-Esseboom C., Huisman M., Touwen B.C., Boersma E.R., Brouwer A., Sauer P.J., Weisglas-Kuperus N. Newborn infants diagnosed as neurologically abnormal with relation to PCB and dioxin exposure and their thyroid-hormone status. Dev Med Child Neurol. 1997; 39 (11): 785.
10. Meeker J.D. Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. Arch Pediatr Adolesc Med. 2012; 166 (10): 952–8.
11. Meijer L., Weiss J., Van Velzen M., Brouwer A., Bergman A., Sauer P.J. Serum concentrations of neutral and phenolic organohalogens in pregnant women and some of their infants in The Netherlands. Environ Sci Technol. 2008; 42 (9): 3428–33.
12. Meijer L., Martijn A., Melessen J., Brouwer A., Weiss J., de Jong F.H., Sauer P.J. Influence of prenatal organohalogen levels on infant male sexual development: sex hormone levels, testes volume and penile length. Hum Reprod. 2012; 27 (3): 867–72. doi: 10.1093/humrep/der426.
13. Mikołajewska K., Stragierowicz J., Gromadzińska J. Bisphenol A — Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. Int J Occup Med Environ Health. 2015; 28 (2): 209–41. doi: 10.13075/ijomeh.1896.00343.
14. NetProphet. Interactive map charts Russia's environmental problem areas, 2012. Available at: http://netprophet.tol.org/2012/11/26/interactive-map-charts-russias-environmental-problem-areas (accessed 16.05.2017).
15. Patandin S., Koopman-Esseboom C., de Ridder M.A,. Weisglas-Kuperus N., Sauer P.J. Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children. Pediatr Res. 1998; 44 (4): 538–45.
16. Environmental Pollution. Climate Change: In Context. Encyclopedia.com, 2008. Available at: http://www.encyclopedia.com/environment/energy-government-and-defense-magazines/environmental-pollution (accessed 16.05.2017).
17. Rice M.B., Rifas-Shiman S.L., Litonjua A.A,. Oken E, Gillman M.W., Kloog I., Luttmann-Gibson H., Zanobetti A., Coull B.A., Schwartz J., Koutrakis P., Mittleman M.A., Gold D.R. Lifetime Exposure to Ambient Pollution and Lung Function in Children. Am J Respir Crit Care Med. 2016; 193 (8): 881–8. doi:10.1164/rccm.201506–1058OC.
18. Roze E., Meijer L., Bakker A., Van Braeckel K.N., Sauer P.J., Bos A.F. Prenatal exposure to organohalogens, including brominated flame retardants, influences motor, cognitive, and behavioral performance at school age. Environ Health Perspect. 2009; 117 (12): 1953–8. doi: 10.1289/ehp.0901015.
19. Stamova L.G., Chesnokova E.A. Ambient air pollution and its impact on the incidence of respiratory diseases in children. Gig Sanit. 2005; (5): 28–31.
20. Strain J.J., Yeates A.J., van Wijngaarden E., Thurston S.W., Mulhern M.S., McSorley E.M., Watson G.E., Love T.M,. Smith T.H., Yost K., Harrington D., Shamlaye C.F., Henderson J., Myers G.J., Davidson P.W. Prenatal exposure to methyl mercury from fish consumption and polyunsaturated fatty acids: associations with child development at 20 months of age in an observational study in the Republic of Seychelles. Am J Clin Nutr. 2015; 101 (3): 530–7. doi: 10.3945/ajcn.114.100503.
21. Deaths from urban Air Pollution. World Health Organization, 2005. Available at: http://www.allcountries.org/maps/urban_air_pollution_maps.html (accessed 16.05.2017).

УДК 616-002.5-021.1

ЦИТОКИНЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ЛЕГОЧНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

© Ирина Васильевна Беляева[1,3], Леонид Павлович Чурилов[1,2], Лия Робертовна Михайлова[2], Алексей Владимирович Николаев[1], Анна Андреевна Старшинова[1,2], Юлия Сергеевна Зинченко[2], Петр Казимирович Яблонский[1,2]

[1] Санкт-Петербургский государственный университет, 199106, Санкт-Петербург, 21-я линия В.О., д. 8а
[2] Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2-4
[3] Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2

Контактная информация: Ирина Васильевна Беляева — к.м.н., доцент, кафедра патологии Санкт-Петербургского государственного университета и кафедра патологической физиологии с курсом иммунопатологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета. E-mail: irivaba@mail.ru

РЕЗЮМЕ: Цитокины Т-клеток эффекторов существенны в защите хозяина против *Mycobacterium tuberculosis*, однако механизмы их действия остаются неясными. Противоречивые результаты демонстрируются уже многие годы, возможно, вследствие того, что не учитываются различные формы туберкулеза (ТБ), уровни витамина Д больных и методы оценки продукции цитокинов. Целью работы было исследование спонтанной и стимулированной туберкулином (PPD) продукции 9 цитокинов мононуклеарами периферической крови у больных с инфильтративным туберкулезом (ИТ), фиброзно-кавернозным туберкулезом (ФКТ) и у здоровых доноров. Пробы были получены в апреле-июне в Санкт-Петербурге (59° северной широты). Уровень 25(OH)D был низким даже у здоровых взрослых доноров — 19,3±1,4 нг/мл; однако у всех больных он был существенно ниже. Индуцированная продукция IFN-γ, IL-2, IL-17 и IL-8 мононуклеарными клетками периферической крови была значительно повышена у больных обеих групп по сравнению с контролем, но уровни спонтанной продукции TNF-α, IL-1β и IL-6 были ниже у больных ТБ, чем у здоровых доноров. Мы нашли значительные различия между двумя группами больных ТБ в уровнях стимулированной продукции IFN-γ и IL-6 и спонтанной продукции TNF-α. Более тяжелое и продолжительное течение ТБ и более глубокий дефицит витамина Д у больных ФКТ, чем у ИТ, сопровождались более высокими уровнями IFN-γ, TNF-α, IL-17 и IL-8, и их избыточное и отрицательное действие не блокировал ИЛ-10, продукция которого не возрастала.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитокины; инфильтративный туберкулез; фиброзно-кавернозный туберкулез; витамин Д.

CYTOKINES IN DIFFERENT FORMS OF PULMONARY TUBERCULOSIS

© Irina V. Belyaeva[1,3], Leonid P. Churilov[1,2], Liya R. Mikhailova[2], Aleksey V. Nicolaev[1], Anna A. Starshinova[1,2], Yuliya S. Zinchenko[2], Petr K. Yablonskiy[1,2]

[1] Saint Petersburg State University, 21st line of Vasilyevsky Island, Bldg. 8a, Saint Petersburg, 199106, Russia
[2] Saint Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, 2–4 Ligovskiy prospekt, Saint Petersburg, 191036, Russia
[3] Saint Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya st., Saint Petersburg, 194100, Russia

Contact information: Irina V. Belyaeva — Candidate of medical sciences, docent, Pathology dept. of the Saint Petersburg State University, Pathophysiology dept. of the Saint Petersburg State Pediatric Medical University. E-mail: irivaba@mail.ru

ABSTRACT: The acquired T cell responses are critical for the host defense against Mycobacterium tuberculosis, yet their mechanisms of action remain unclear. Conflicting results have been demonstrated over the years, possibly due to the disregarded vitamin D levels, different forms of tuberculosis (TB), and methods used. The objective of the study was to investigate the production of 9 cytokines by the peripheral blood mononuclear cells, both PPD-stimulated and spontaneous, in patients with infiltrative (IT), fibrous cavernous tuberculosis (FCT), and in healthy donors. Blood samples were obtained in April-June in the Saint Petersburg region (59° north latitude). The level of 25 (OH) D was very

low even in healthy adult donors — 19.3±1.4 ng/ml; however in all patients it was yet significantly lower. The induced production of IFN-γ, IL-2, IL-17, and IL-8 by the peripheral blood mononuclear cells was significantly increased in the patients of both tuberculosis groups, but the levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 production, not stimulated by PPD, were lower in the tuberculosis patients than in healthy donors. We found a significant difference between the two groups of TB patients in the levels of the induced production of IFN-γ and IL-6, and the spontaneous production of TNF-α. The more severe course of TB and the lower vitamin D level in the FCT patients than in the IT patients was accompanied by higher levels of IFN-γ, TNF-α, IL-17, and IL-8 whose detrimental action was not restrained by IL-10 that failed to respond by the increase of its production.

KEYWORDS: cytokines; infiltrative tuberculosis; fibrous cavernous tuberculosis; vitamin D.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB), a global public health menace, is in 90–95 % of cases clinically asymptotic [23]. The disease course is determined by the balance between the *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and the host innate and adaptive immunity mechanisms.

The innate immune cells primarily infected by Mtb are the alveolar macrophages. In the macrophage phagosome Mtb find favorable niche for surviving and replication [20]. Human alveolar macrophages activate signaling pathways to combat bacterial replication and attract other immune cells into the site of infection. In the progress of cellular immunity against Mtb, macrophages also function as antigen presenting cells.

Th1, Th2, Th17, and regulatory T cells are involved in the response to Mtb, but the Th1 and their cytokines are recognized as the main cell subset associated with macrophage microbicidal mechanisms [8].

The T-cell cytokines have been demonstrated to regulate the vitamin D metabolism [10]. Conversely vitamin D acting as modulator of the immune system inhibits T cell cytokines such as IL2 and IL17 [4, 13].

Recent investigations attracted worldwide attention to vitamin D which besides its classical effect, is involved in pathogenesis of chronic diseases including tuberculosis and autoimmune diseases. Vitamin D insufficiency is widely spread and is associated with increased tuberculosis risk in different populations [18, 19]. We found significant deficiency of vitamin D in our TB patients [3].

Conversion of 25-hydroxyvitamin D to active 1,25-dihydroxyvitamin D in the immune cells is essential for their antibacterial activity [12]. The most important effect of the localized activation of vitamin D in response to Mtb is the induction of cathelicidin (LL-37), a potent antimicrobial peptide necessary for the bacterial killing in a variety of cell types [15]. Cathelicidin can fulfill antimicrobial, antifungal and antiviral properties through different ways [2]; it plays a particular part in defense against intracellular Mtb inducing autophagy in monocytes/macrophages [22].

Interferon-γ (IFN-γ), the main cytokine of the Th1 profile, induces autophagy, phagosomal maturation, the production of antimicrobial peptides such as cathelicidin, and antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages via a vitamin D–dependent pathway [11]. TNF-α acts synergistically with IFN-γ to stimulate the production of NO by macrophages and influences the expression of chemokines [8]. The involvement of IL-17 and IL-23 as well as IL-10 in mediating the immunopathology of TB has also been demonstrated [5].

Acquired T cell responses are critical for host defense against microbial pathogens, yet their mechanisms of action remain unclear. Conflicting results have been demonstrated over the years, possibly due to disregarded vitamin D level, different forms of TB, and methods used.

Objectives: to study the production of 9 cytokines by peripheral blood mononuclear cells (PBMC), both PPD-stimulated and spontaneous, in patients with two form of TB and healthy donors.

Distinction was made in our investigations between TB patients with short-time and long-time duration of disease.

MATERIAL AND METHODS

A total of 41 participants were enrolled in the study with informed consent: 10 patients with infiltrative tuberculosis (IT), 10 patients with fibrous cavernous tuberculosis (FCT), and 21 healthy donors. Blood samples obtained in April-June from the in-patients of the Saint Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology (SPbRIP) and those of TB sanatorium near Saint Petersburg (59° north latitude). The institutional review board of the SPbRIP approved all studies involving humans. All processing of information obtained from the participants has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

The mean age of patients was 35.4 years (range 17–65), 73 % were males. The mean age of healthy donors was 31.5 years (range 17–56), 44 % were males. The chest X-ray findings, direct smear microscopy, mycobacterial culture results, and clinical data were abstracted from the medical records. TB manifests in many forms. In our study two groups of TB patients had different clinical and X-ray characteristics, but all TB patients were in active phase of the disease.

The IT is the most common type of the secondary TB. In our investigation the IT patients (mean age 22.9 years, range 17–33) had 1–3 segments of the lung affected (81.4 %), and more benign course of disease compared to FCT group. 38 % of IT patients excreted Mtb. Physical signs of TB were absent in 49.1 % of patients.

The FCT patients had progressive disease lasting from 4 to 19 years, with average 11.2 years of duration. The multiple in-

volvement of lung segments and signs of lung destruction were observed in all of them. Mtb excretion was found in 91 %. 89 % had some manifestations of TB on physical examination. All FCT patients had multi-drug Mtb resistance and some degree of respiratory insufficiency. The mean age of FCT patients group was 47.9 (range 29–65). Overwhelming majority of population in Russia is BCG-vaccinated, which was the case for all donors involved.

The cytokine production by PBMCs was measured using the whole-blood ELISA (Vector Best Baltica, Russia). We determined cytokine concentrations in the supernatants of PPD-stimulated PBMCs (induced) and in the unstimulated (spontaneous) duplicates from patients and healthy donors. The sensitivity and range of the cytokine detection was different for various cytokines as reported by the manufacturer, namely, IFN-γ, IL-18: sensitivity 2pg/mL, range 0–1000pg/mL; IL-2, IL-10: 1pg/mL, 0–500 pg/mL; IL-1β, IL-6 0.5pg/mL, 0–300pg/mL; IL-8: 2pg/mL, 0–250pg/mL; TNF-α: 1pg/mL, 0–250.

Statistical analysis was carried out using the Statistical Package for Social Sciences software. The Mann-Whitney test was used. Statistical significance was set at $p<0.05$.

RESULTS

The peripheral blood characteristics of the two TB groups studied were different. Both groups displayed monocytosis, thrombocytosis, and increased erythrocyte sedimentation rate (ESR), but changes in the FCT group were much more significant. Monocytosis was present in 76.5 % of FCT patients, thrombocytosis — in 85.7 %, increased ESR — in 82.4 %.

CYTOKINE PRODUCTION BY PBMC

IT patients (Fig.1) The production of **IFN-γ** by the cultured PBMC stimulated by PPD was significantly greater than in healthy donors; the mean was 125pg/mL, versus 47.7pg/mL; according to Mann-Whitney U test U=35, p=0.013 (Fig.1A). There was no difference between IT patients and healthy donors in the spontaneous production of IFN-γ (Fig.1B).

The stimulated production of **TNF-α** in the IT patients did not differ from that of healthy donors, whereas the production of TNF-α by the non-stimulated PBMC was lower in IT (the mean was 0.6pg/mL) than in healthy individuals (the mean was 11.2pg/mL), U=19, p=0.0003 (Fig.1B).

The stimulated production of **IL-2** was found significantly increased in IT patients, (mean 37.8pg/mL), compared to healthy donors (4.8pg/mL), U=21, p=0.0014 (Fig.1A).

The induced production of **IL-17** was much higher in IT patients (14.9pg/mL) than in controls (2.7pg/mL), U=10, p=0.00004 (Fig.1A).

The stimulated production of **IL-8** was significantly enhanced in IT patients (the mean was 72000pg/mL) compared to healthy donors (19300pg/mL), U=31, p=0.002 (Fig.1A). The spontaneous production of **IL-1β** was significantly lower in IT patients (0.55pg/mL), than in controls (5.86pg/mL), U=34, p=0.004 (Fig.1). In addition, the spontaneous production of IL-6 was lower in IT patients (3.7pg/mL) than in the healthy individuals (80.2pg/mL), U=32, p=0.004 (Fig.1B).

FCT patients (Fig.2) The mean **IFN-γ** level in stimulated cultures was significantly higher compared to both healthy donors (the mean was 2212pg/mL vs 48pg/mL, U=16, p=0.0003) (Fig.2A) and to patients with IT (125 pg/mL, U=20, p=0.045) (Fig3A). Half of the FCT patients had many-fold increased level compared to any other patient studied.

The concentration of the **TNF-α** stimulated by PPD in FCT patients was significantly increased compared to healthy donors (1359pg/mL vs. 371pg/mL, U=35, p=0.018) (Fig.2A) and was insignificantly higher than in the IT patients. The spontaneous production of **TNF-α** was significantly lower in FCT than in controls (4.4 vs 11.2, U=54, p=0.045) (Fig.2B).

The induced production of **IL-2, IL-17,** and **IL-8** (pg/mL) was also increased in FCT, and more significantly than in IT: **IL-2** (107 vs. 4.8, U=10, p=0.0001); **IL-17** (35.5 vs. 2.7, U=14 p=0.0001); **IL-8** (102500 vs. 19300, U=14, p=0.0002) (Fig. 2A).

The spontaneous production of **IL-2**, **IL-1β** and **IL-6** (pg/mL) was decreased in FCT patients compared to healthy donors (Fig. 2B); **IL-2** (0.0 vs 2.2, U=50, p=0.007), **IL-1β** (0.7 vs 5.7, U=41, p=0.012), **IL-6** (16.6 vs 80.2, U=35, p=0.0052)

No difference was revealed between patients of both groups and healthy donors regarding the levels of IL-10 and IL-18, both in stimulated and not stimulated cultures. We saw no difference also in the spontaneous production of IFN-γ, and IL-8 in the FCT patients against that of controls (not shown).

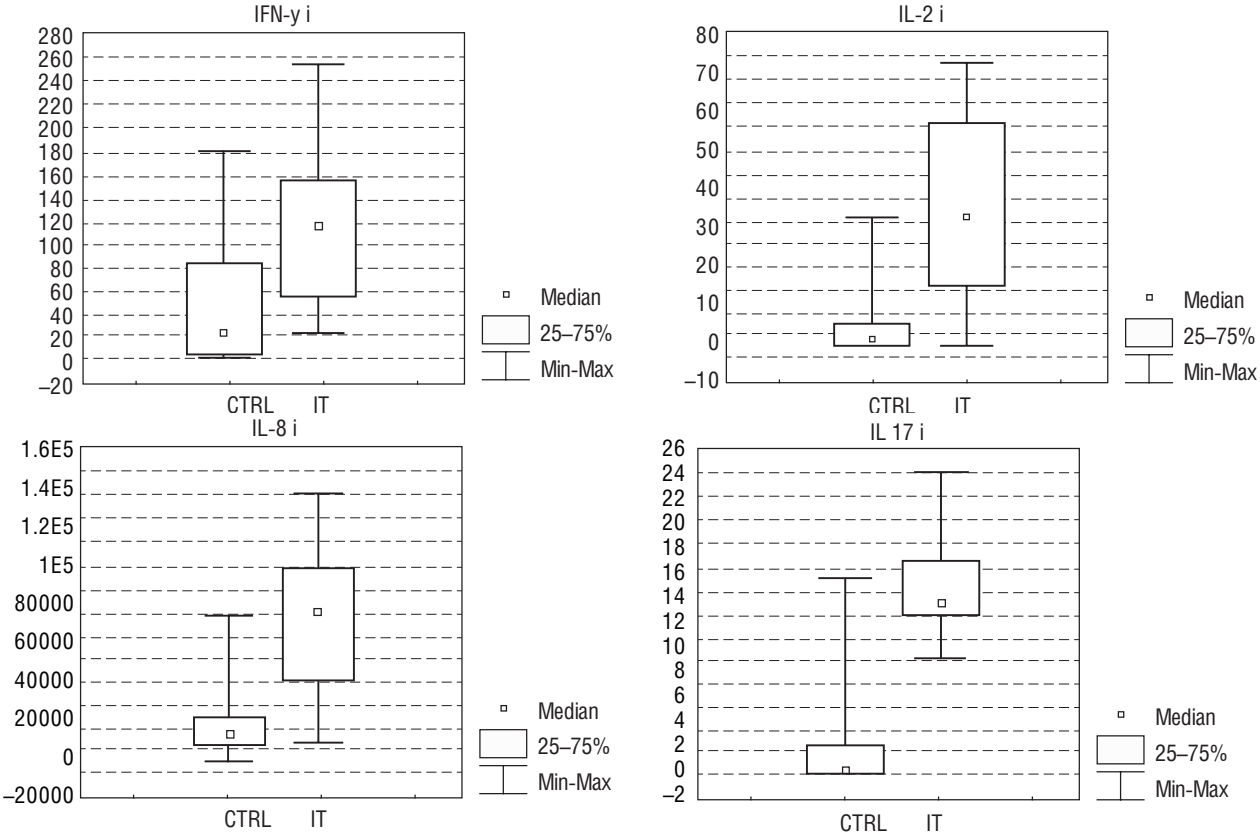
Two studied groups of patients differed in the production of cytokines. Significantly higher stimulated level of IFN-γ occurred in FCT patients (Mann-Whitney U Test: U=20.5, p=0.045). The same was registered for stimulated IL-6 level (U=21.5, p=0.031) (Fig.3A). The spontaneous production of TNF-α was lower in IT than in FCT (U=22.5, p=0.038).

DISCUSSION

In our investigation the production of **IFN-*γ*** stimulated by PPD was enhanced in patients of both groups compared to healthy donors, but highest level was in FCT patients. Half of our patients had a many-fold increased level compared even to other patients in this group. We saw no association of this high level with clinical data. The essential role for IFN-*γ* in the resistance to Mtb has been confirmed by many researchers [8]. IFN-*γ,* the main cytokine of the Th1 subset, enhances the macrophage defense mechanisms via a vitamin D-dependent pathway, but also is known for enhancement of autoimmunity [10, 11].

In the current study we found increased stimulated level of **TNF-α** in FCT but not in IT patients. This observation can be important since TNF-α is known to be critical in the control of Mtb infection [8]. The induced production of one more Th1 cell cytokine, namely **IL-2**, was significantly increased in our TB patients, while spontaneous production did not change.

A — the induced production of cytokines



B — the spontaneous production of cytokines

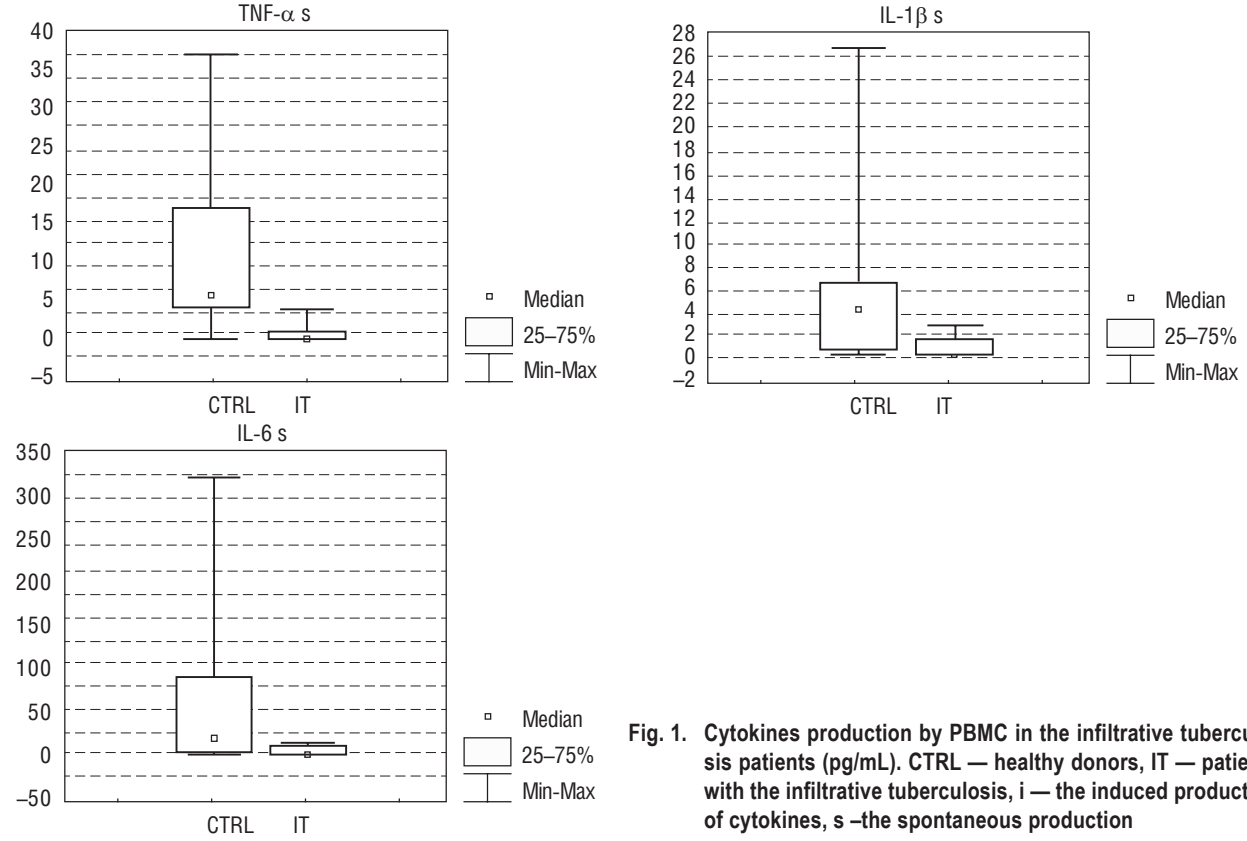


Fig. 1. Cytokines production by PBMC in the infiltrative tuberculosis patients (pg/mL). CTRL — healthy donors, IT — patients with the infiltrative tuberculosis, i — the induced production of cytokines, s –the spontaneous production

A — the induced production of cytokines

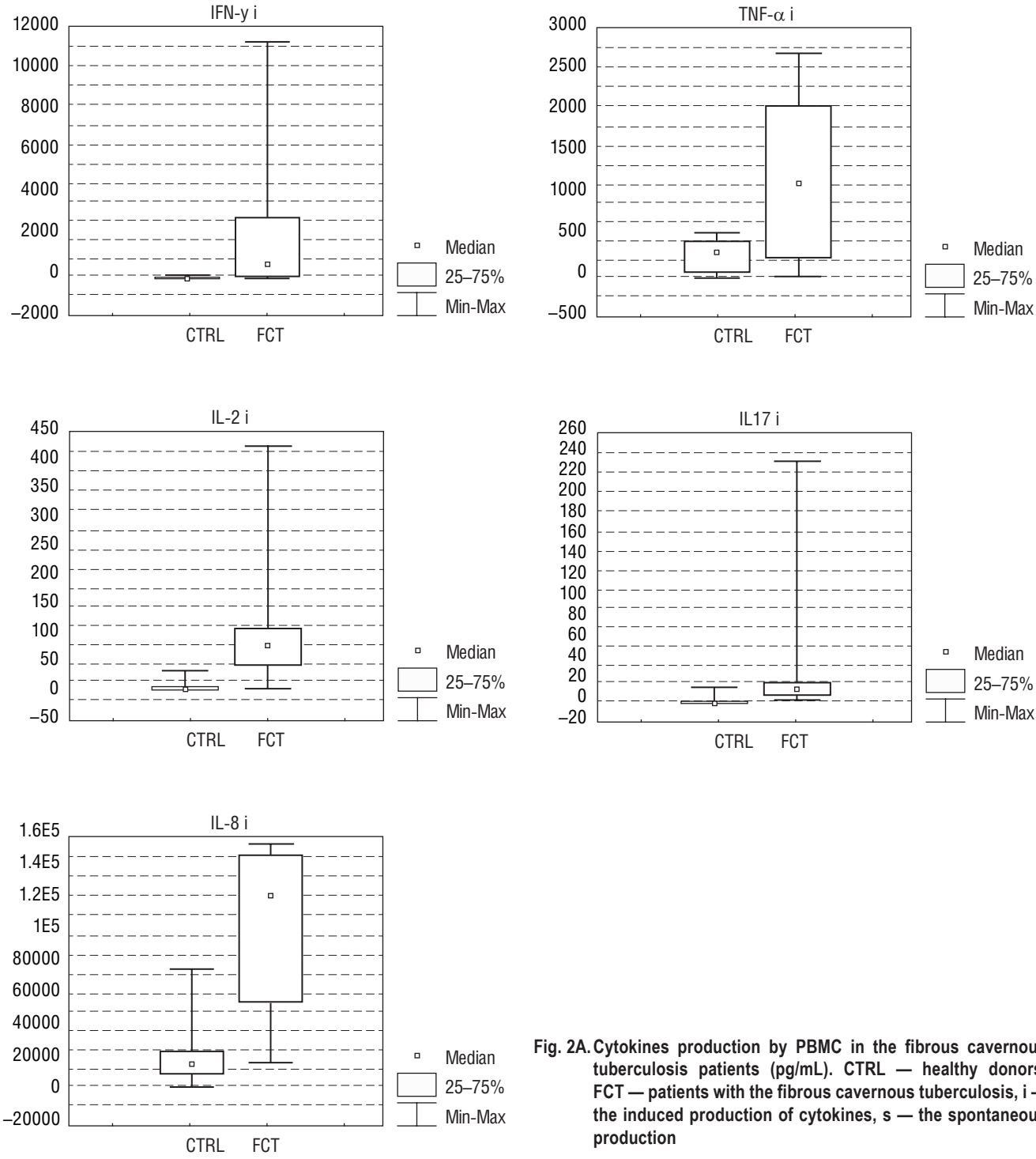


Fig. 2A. Cytokines production by PBMC in the fibrous cavernous tuberculosis patients (pg/mL). CTRL — healthy donors, FCT — patients with the fibrous cavernous tuberculosis, i — the induced production of cytokines, s — the spontaneous production

In our study induced production of **IL-17** was greatly increased in patients of both TB groups, but especially in FCT. Th17 cells are known to be crucial for control of Mtb [7, 21]. The major cytokine of Th17 cell, IL-17, has the dual capacity, both defensive and pathogenic [17, 6]. It plays important part in pathogenesis of the autoimmune inflammation [21]. Earlier we have shown the autoantibodies presence to many antigens in both groups of patients [1]. It is possible that in our study IL-17 was responsible for the autoimmune components revealed in TB.

B — the spontaneous production of cytokines

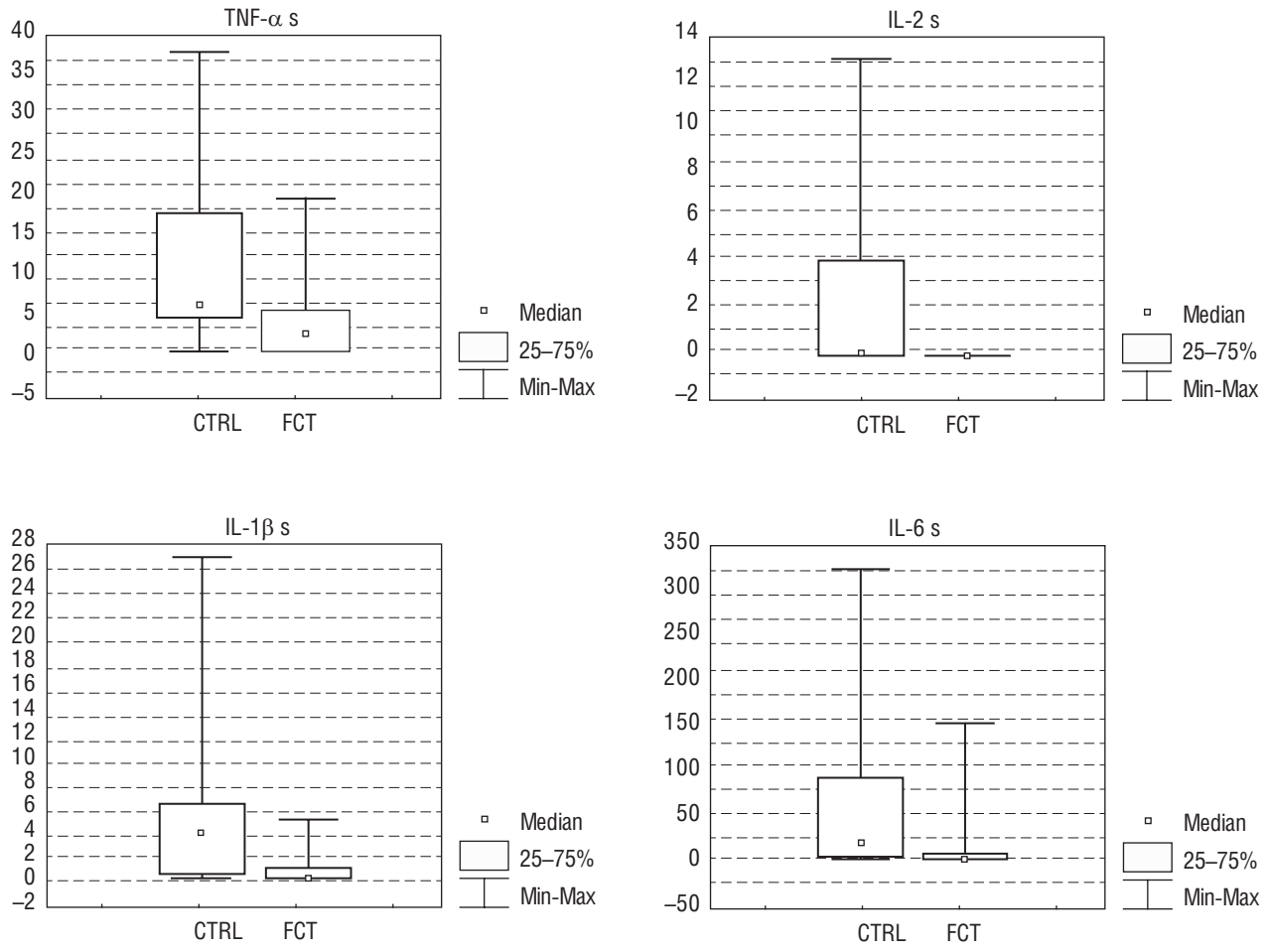


Fig. 2B. Cytokines production by PBMC in the fibrous cavernous tuberculosis patients (pg/mL). CTRL — healthy donors, FCT — patients with the fibrous cavernous tuberculosis, i — the induced production of cytokines, s — the spontaneous production

The excessive activity of TNF-α and IFN-γ can be harmful to the host. In the early stage of TB the IL-17 production facilitates the granuloma formation and control of bacterial growth. During the chronic phase of TB, balance between Th1 and Th17 responses is vital because an excessive IL-17 production may cause extensive neutrophil accumulation and tissue damage [21]. We found greatly increased production of those cytokines in the long course of disease, fibrous cavernous tuberculosis.

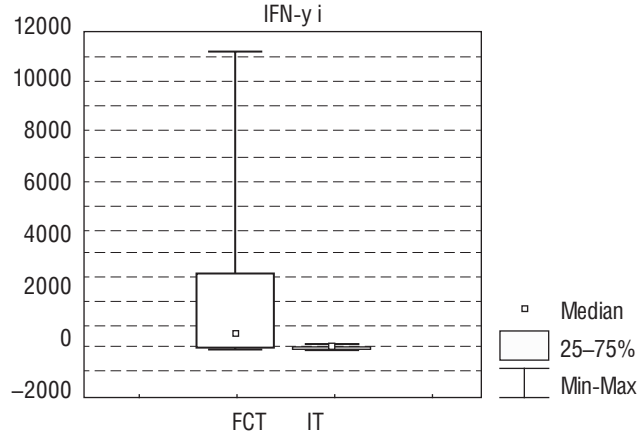
Our results showed a marked increase in the stimulated production of IL-8 by patients of both TB groups, maybe partially due to the capacity of TNF-α to up-regulate the IL-8 secretion [9]. IL-8 has a central role in the neutrophil chemo-taxis to areas of TB granulomata formation however extensive accumulation of neutrophils in TB lesions is associated with a high pathogen load [16].

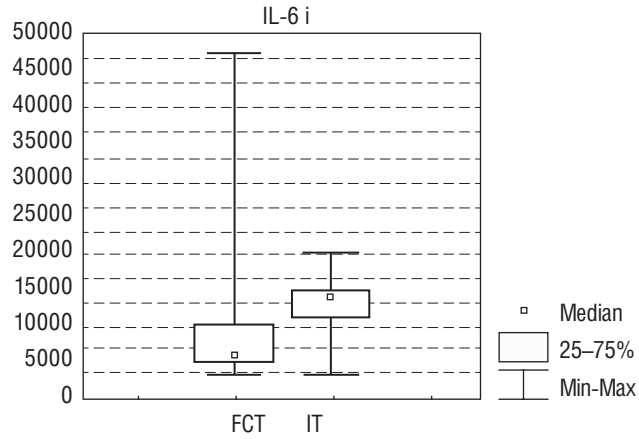
We found a significant difference between the two groups of TB patients in the levels of induced production of IFN-γ and IL-6, and spontaneous production of TNF-α. Spontaneous production of TNF-α, IL-2, IL-1β, and IL-6 was significantly lower in the patients of both groups compared to controls. Low and even undetectable levels of IL-2 in TB were reported also by others [14]. The cause of that is not clear. One possible explanation is that the blood samples were taken from the TB patients after beginning of the treatment, and the serum cytokine levels decrease during the anti-TB therapy. Another explanation is that in TB most active cells are recruited into granulomata, so those staying in blood may have relatively low spontaneous cytokine-producing activities, although stimulation reveals their potential; similar consideration coined in [14].

CONCLUSION

TB in We registered significant changes in cytokines production in pulmonary TB as well as some difference between the studied forms of TB. The more severe course of the FCT patients than in IT patients was accompanied by the higher levels

B — the spontaneous production





A — the induced production

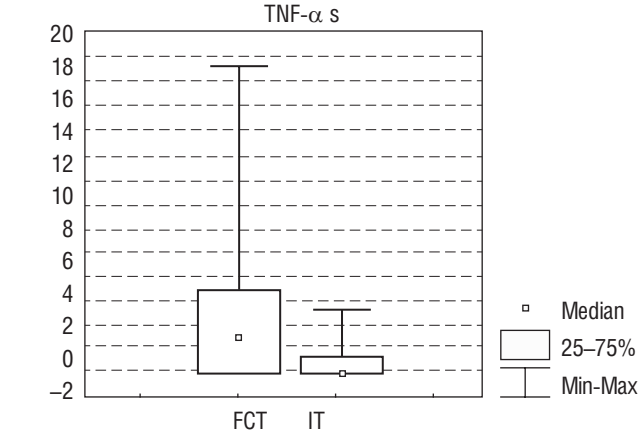


Fig. 3. Comparison of the cytokines production by PBMC in the fibrous cavernous and infiltrative tuberculosis patients. FCT — patients with the fibrous cavernous tuberculosis, IT — patients with the infiltrative tuberculosis, i — the induced production of cytokines, s –the spontaneous production

of IFN-γ, TNF-α, IL-17, and IL-8 whose detrimental action was not restrained by IL-10 that failed to respond by increase of its production.

There was a difference between the two groups of TB patients in the levels of induced production of IFN-γ and IL-6, and spontaneous production of TNF-α.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research is supported by SPbSU grant 7.38.81.2012

The authors declare that they have no conflict of interests.

REFERENCES

1. Belyaeva I. V., Mikhaylova L. R., Nikolaev A. V., Churilov L. P., Yablonskiy P. K. Rannee vyyavlenie patologicheskikh izmeneniy pri progressiruyushchem tuberkuleze i sarkoidoze: novye podkhody [Early diagnostic of pathological alterations in progressive tuberculosis and sarcoidosis]. Meditsinskiy al'yans. 2015; N 1: 91–92 (in Russian).
2. Belyaeva I. V., Nikolaev A. V., Churilov L. P., Yablonskiy P. K. Katelitsidiny, vitamin D i tuberkulez [Cathelicidins, vitamin D and tuberculosis]. Vestnik Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 11, Meditsina. 2013; № 3: 3–18 (in Russian).
3. Belyaeva I. V., Mikhailova L. R., Nikolaev A. V., Starshinova A. A., Churilov L. P., Yablonskiy P. K. Vitamin d-dependent mechanisms of innate immunity and autoimmunity in tuberculosis and sarcoidosis. V Internat. Sympos. Interaction of the nervous and immune systems in Health and Disease Russia: abstracts. Saint-Petersburg; June 8th–9th, 2015: 9–10.
4. Baeke F., Takiishi T., Korf H., Gysemans C., Mathieu C. Vitamin D: Modulator of the immune system. Curr. Opin. Pharmacol. 2010; 10: 482–496. doi: 10.1016/j.coph.2010.04.001.
5. Cruz A., Khader S. A., Torrado E. et al. Cutting edge: IFN-γ regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. J. Immunol. 2006; 177 (3): 1416–1420.
6. Cruz A., Fraga A. G., Fountain J. J. et al. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis. J. Exp. Med. 2010; 207 (8): 1609–1616.
7. Curtis M. M., Way S. S. Interleukin-17 in host defense against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. Immunology. 2009; 126: 177–185.
8. Da Silva M. V., Tiburcio M. G. S., Machado J. R., et al. Complexity and controversies over the cytokine profiles of T helper cell sub-

populations in tuberculosis [review]. J. Immunol. Res. 2015; 2015: 639107.
9. De Forge L. E., Kenney J. S., Jones M. L., Warren J. S., Remick D. G. Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood. Separation of LPS-and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. J. Immunol. 1992; 148: 2133–2141.
10. Edfeldt K., Liu P. T., Chun R. et al. T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010; 107: 22593–22598. doi: 10.1073/pnas.1011624108.
11. Fabri M., Stenger S., Shin D.-M. et al. Vitamin D is required for IFN-γ–mediated antimicrobial activity of human macrophages. Sci. Transl. Med. 2011; 3 (104): 104ra102. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003045.
12. Gombart A. F., Borregaard N., Koeffler H. P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. FASEB J. 2005; 19: 1067–1077. doi: 10.1096/fj.04–3284com.
13. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science. 2010; 327: 291–295.
14. Katti M. K. Assessment of serum IL-1, IL-2 and IFN-γ levels in untreated pulmonary tuberculosis patients: Role in pathogenesis. Arch. Med. Res. 2011; 42: 199–201.
15. Liu P. T., Stenger S., Tang D. H., Modlin R. L. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin. J. Immunol. 2007; 179 (4): 2060–2063. doi: 10.4049/jimmunol.179.4.2060.
16. Lowe D. M., Redford P. S., Wilkinson R. J., Garra A., Martineau A. R. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? [review]. Trends Immunol. 2012; 33 (1): 1–58. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.10.003.
17. McGeachy M. J. and McSorley S. J. Microbial-induced Th17: Superhero or Supervillain? J. Immunol. 2012; 189 (7): 3285–3291. doi: 10.4049/jimmunol.1201834.
18. Nnoaham K. E., Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. Int. J. Epidemiol. 2008; 37: 113–119.
19. Shapira Y., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. Mycobacterium tuberculosis, autoimmunity, and vitamin D [review]. Clin. Rev. Allergy Immunol. 2010; 38 (2–3): 169–77. doi: 10.1007/s12016–009–8150–1.
20. Sia J. K., Georgieva M., and Rengarajan J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An overview of the interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and innate immune cells. J. Immunol. Res. 2015; 2015: 747543. Published online 2015 Jul 14. doi: 10.1155/2015/747543.
21. Torrado E., Cooper A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis [review]. Cytokine Growth Factor Rev. 2010; 21: 455–462.
22. Yuk J. M., Shin D. M., Lee H. M., et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. Cell Host Microbe. 2009; 6: 231–243. doi: 10.1016/j.chom.2009.08.004.
23. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva: World Health Organization; 2013.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляева И. В., Михайлова Л. Р., Николаев А. В., Чурилов Л. П., Яблонский П. К. Раннее выявление патологических изменений при прогрессирующем туберкулезе и саркоидозе: новые подходы. Медицинский альянс. 2015; N 1: 91–92.
2. Беляева И. В., Николаев А. В., Чурилов Л. П., Яблонский П. К. Кателицидины, витамин Д и туберкулез. Вестник Санкт-Петербургского государственного университета. Серия 11, Медицина. 2013; N 3: 3–18.
3. Belyaeva I. V., Mikhailova L. R., Nikolaev A. V., Starshinova A. A., Churilov L. P., Yablonskiy P. K. Vitamin d-dependent mechanisms of innate immunity and autoimmunity in tuberculosis and sarcoidosis. V Internat. Sympos. Interaction of the nervous and immune systems in Health and Disease Russia: abstracts. Saint-Petersburg; June 8th–9th, 2015: 9–10.
4. Baeke F., Takiishi T., Korf H., Gysemans C., Mathieu C. Vitamin D: Modulator of the immune system. Curr. Opin. Pharmacol. 2010; 10: 482–496. doi: 10.1016/j.coph.2010.04.001.
5. Cruz A., Khader S. A., Torrado E. et al. Cutting edge: IFN-γ regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. J. Immunol. 2006; 177 (3): 1416–1420.
6. Cruz A., Fraga A. G., Fountain J. J. et al. Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis. J. Exp. Med. 2010; 207 (8): 1609–1616.
7. Curtis M. M., Way S. S. Interleukin-17 in host defense against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. Immunology. 2009; 126: 177–185.
8. Da Silva M. V., Tiburcio M. G. S., Machado J. R. et al. Complexity and controversies over the cytokine profiles of T helper cell subpopulations in tuberculosis [review]. J. Immunol. Res. 2015; 2015: 639107.
9. De Forge L. E., Kenney J. S., Jones M. L., Warren J. S., Remick D. G. Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood. Separation of LPS-and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. J. Immunol. 1992; 148: 2133–2141.
10. Edfeldt K., Liu P. T., Chun R. et al. T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010; 107:22593–22598. doi: 10.1073/pnas.1011624108.
11. Fabri M., Stenger S., Shin D.-M. et al. Vitamin D is required for IFN-γ–mediated antimicrobial activity of human macrophages. Sci. Transl. Med. 2011; 3 (104): 104ra102. doi: 10.1126/scitranslmed.3003045.
12. Gombart A. F., Borregaard N., Koeffler H. P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. FASEB J. 2005; 19: 1067–1077. doi: 10.1096/fj.04–3284com.
13. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science. 2010; 327: 291–295.
14. Katti M. K. Assessment of serum IL-1, IL-2 and IFN-γ levels in untreated pulmonary tuberculosis patients: Role in pathogenesis. Arch. Med. Res. 2011; 42: 199–201.

15. Liu P. T., Stenger S., Tang D. H., Modlin R. L. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin. J. Immunol. 2007; 179 (4): 2060–2063. doi: 10.4049/jimmunol.179.4.2060.
16. Lowe D. M., Redford P. S., Wilkinson R. J., Garra A., Martineau A. R. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? [review]. Trends Immunol. 2012; 33 (1): 1–58. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.10.003.
17. McGeachy M. J. and McSorley S. J. Microbial-induced Th17: Superhero or Supervillain? J. Immunol. 2012; 189 (7): 3285–3291. doi: 10.4049/jimmunol.1201834.
18. Nnoaham K. E., Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. Int. J. Epidemiol. 2008; 37: 113–119.
19. Shapira Y., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. Mycobacterium tuberculosis, autoimmunity, and vitamin D [review]. Clin. Rev. Allergy Immunol. 2010; 38 (2–3): 169–77. doi: 10.1007/s12016–009–8150–1.
20. Sia J. K., Georgieva M., and Rengarajan J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An overview of the interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and innate immune cells. J. Immunol. Res. 2015; 2015: 747543. Published online 2015 Jul 14. doi: 10.1155/2015/747543.
21. Torrado E., Cooper A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis [review]. Cytokine Growth Factor Rev. 2010; 21: 455–462.
22. Yuk J. M., Shin D. M., Lee H. M. et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. Cell Host Microbe. 2009; 6: 231–243. doi: 10.1016/j.chom.2009.08.004.
23. World Health Organization. Global Tuberculosis Report. Geneva: World Health Organization; 2013.

УДК 616-056.7+575.1+612.017.11

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИММУННОГО ОТВЕТА НА АНТИГЕНЫ YERSINIA PESTIS F1 И V МИКРОКАПСУЛИРОВАННОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНЫ

© Елена Львовна Назарова[1], Иван Алексеевич Дятлов[2], Николай Маркович Поздеев[1], Валентина Тимофеевна Демьянова[1], Игорь Владимирович Парамонов[1], Андрей Валентинович Рылов[1], Михаил Владимирович Храмов[2], Александр Иосифович Борзилов[2], Алексей Николаевич Сомов[2], Виталий Григорьевич Абламуниц[3], Андрей Павлович Анисимов[2]

[1] Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови, 610027, г. Киров, Красноармейская ул., д. 72
[2] Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск
[3] Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2

Контактная информация: Андрей Павлович Анисимов — д. м. н., профессор, заместитель директора по научной работе Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии. E-mail: anisimov@obolensk.org

РЕЗЮМЕ: Эффективность иммунного ответа на вакцину зависит от активации антиген-презентирующих клеток и антиген-специфических Т- и В-лимфоцитов, индукции клеток памяти, регуляторных клеток и секретирующих антитела плазматических клеток, а также от длительности пребывания антигена в организме. Сила иммунного ответа главным образом зависит от генов, задействованных в этом процессе. Настоящая работа была посвящена изучению полиморфизма генов, который у части людей может быть причиной неудовлетворительного иммунного ответа на молекулярную микрокапсулированную чумную вакцину (ММЧВ). После двух последовательных вакцинаций среди 9 добровольцев у 67 % зафиксированы титры специфических антител не меньше порогового уровня. Однако у 33 % добровольцев не найдено специфических антител ни к V, ни к F1 (Caf1) антигену по истечении 90 суток после последней вакцинации. Мы исследовали 20 одиночных нуклеотидных полиморфизмов (ОНП) для 14 генов, ответственных за иммунный ответ, с целью найти связь между конкретным аллелем и способностью формировать антитела к антигенам ММЧВ. Гомозиготность гена IL1β по варианту дикого типа C-3953, либо гомозиготность по мутантному аллелю T-3953 делали возможной продукцию анти-F1 IgG, в то время как гетерозиготы оставались серонегативными. Гетерозиготы по гену TLR9 в положении 2848 (A2848G) также реагировали на F1. Среди реагировавших на антиген V (LcrV), продукция IgG наблюдалась лишь у носителей мутантного аллеля IL4 C-589T, у носителей мутантного аллеля C-174G гена IL6, как гомо- так и гетерозиготных, и не наблюдалась у гомозигот по дикому типу аллеля. Отсутствие мутантного аллеля C-819T гена IL10 также было связано с нереагирующим фенотипом. Наши результаты позволяют предположить, что потенциально нереагирующие на ММЧВ могут быть опознаны по ОНП в генах IL1β (C-3953 T), IL4 (C-589T), IL6 (C-174G), IL10 (C-819T) и TLR9 (A2848G). Индивидов с нереагирующим генотипом следует включить в программу клинических испытаний новых универсально эффективных чумных вакцин.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: чумная вакцина; иммунный ответ; полиморфизм генов; цитокины; Толл-подобные рецепторы.

GENETIC MARKERS OF IMMUNE RESPONSE TO *YERSINIA PESTIS* F1 AND V ANTIGENS-LOADED MICROSPHERES VACCINE AGAINST PLAGUE

© Elena L. Nazarova[1], Ivan A. Dyatlov[2], Nikolai M. Pozdeev[1], Valentina T. Demyanova[1], Igor V. Paramonov[1], Andrey V. Rylov[1], Mikhail V. Khramov[2], Aleksandr I. Borzilov[2], Aleksey N. Somov[2], Vitaly G. Ablamunits[3], Andrey P. Anisimov[2]

[1] Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, 72 Krasnoarmejskaja st., Kirov, 610027, Russia
[2] State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Serpukhov district, Moscow Oblast, 142279, Russia
[3] Saint Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya st., Saint Petersburg, 194100, Russia

Contact information: Andrey P. Anisimov — MD, professor, deputy director for scientific research of the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology. E-mail: anisimov@obolensk.org

ABSTRACT: An efficient immune response to a vaccine depends on activation of antigen-presenting cells and antigen-specific T and B lymphocytes, induction of memory cells, regulatory cells and antibody-secreting plasma cells, as well as on the persistence of the antigen in the body. The strength of immune response largely depends on the genes participating in this process. This study was focused on the gene polymorphism that could be responsible for insufficient immune response to a plague vaccine (molecular microencapsulated plague vaccine, MMPV) in a proportion of humans. After two subsequent vaccinations of the nine human volunteers, 67 % of them developed specific antibody titers equal to or exceeding the threshold level. However, 33 % of the subjects did not develop specific antibodies to either V, or F1 (Caf1) antigen during 90 days of observation post vaccination. We have investigated 20 single nucleotide polymorphisms (SNP) in 14 of immune response genes in an attempt to find an association between a particular allele and the ability to develop antibodies to MMPV antigens. Homozygosity for the IL1β gene wild type allele variant C-3953, or homozygosity for a mutated allele T-3953 allowed to produce anti-F1 IgG, whereas heterozygotes remained seronegative. Heterozygotes for the TLR9 gene at position 2848 (A2848G) were also responders to F1. Among responders to the V (LcrV) antigen, IgG production was observed only in carriers of mutant IL4 allele C-589T and in carriers of mutant allele of IL6 gene C-174G, either homozygotes or heterozygotes, and was not observed in homozygotes of the wild type allele. The lack of a mutant allele of IL10 gene C-819T was also associated with a non-responder phenotype. Our data suggest that potential non-responders to the MMPV may be identified by SNP in the IL1β (C-3953 T), IL4 (C-589T), IL6 (C-174G), IL10 (C-819T), and TLR9 (A2848G) genes. Individuals with non-responder genotype should be included in the clinical trials assessing novel, universally effective plague vaccines.

KEYWORDS: plague vaccine; immune response; gene polymorphism; cytokines; toll-like receptors.

INTRODUCTION

The causative agent of plague, *Yersinia pestis*, was the cause of three pandemics, which claimed millions of human lives. Plague is an infection affecting annually more than 3000 people [3]. The live plague vaccine used in the former Soviet Union stimulates intense immunity and protects from lethality caused by infection with *Y. pestis* [14], but it is associated with local and systemic adverse reactions of various severity in 5–29 % of persons with a normal immune status [44, 45, 53]. Therefore, a search for a better live plague vaccine superior to the existing one in immunogenicity, yet having less side effects, is very important [20–23, 41, 43, 55]. Another approach is to design a subunit (molecular) vaccine based on a few known protective antigens: such vaccines are aimed to minimize immune responses to non-specific components.

An example of such an antigen is a capsular protein F1 (Caf1) — a multifunctional factor of pathogenicity of *Y. pestis*. Serologic diagnosis of plague is based on detection of anti-F1 antibodies, and this antigen is the most important component of plague vaccines. Its important role in induction of a robust immune response in humans has been demonstrated [2]. The V antigen (LcrV) is another multifunctional factor of pathogenicity and an important protective antigen of *Y. pestis* [49]. It inhibits chemotaxis of neutrophils and production of pro-inflammatory cytokines [35, 52].

A vaccine is supposed to activate many different mechanisms of immune response [7, 19]. However, although vaccines induce an immune response in the majority of individuals, a proportion of them may respond weakly or remain non-responsive [4, 5, 10, 33]. For instance, induction of a protective antibody response to HIV vaccine depends on particular alleles of HLA class II. The immune response is controlled by various other genes, among which — genes of pattern recognition receptors (PRRs) and genes of cytokines. PRRs are represented by several families which recognize macromolecules characteristic for bacteria and viruses, as well as endogenous molecules that become visible to the immune system as a result of tissue damage. Toll-like receptors (TLR) are most well studied PRRs. Binding of TLRs by their ligands results in activation of nuclear factor-κB (NF-κB) with subsequent transcription of genes of pro-inflammatory cytokines [16].

Genes for PPRs and cytokines have a notable polymorphism in their regulatory loci that influences on expression of the encoded protein and may affect its function. The most common type of mutation of these genes is a single nucleotide polymorphism (SNP) which often leads to amino acid substitution that may influence the immune response [8, 9].

The aim of this pilot study was to investigate a possible role of SNP in heterogeneity of specific humoral immune response to the molecular microencapsulated plague vaccine (MMPV) in normal human volunteers.

MATERIALS AND METHODS

Human subjects

All volunteers signed an informed content to participate in this study. The protocol of the study PKI-00–01/2014 was approved

by the local Ethical Committee and was in agreement with Helsinki Declaration (2013). The Protocol was in compliance with the requirements of Good Clinical Practice (GCP) and with the regulations of the State Committee on Sanitary and Epidemiology Surveillance of the Russian Federation of 31.10.1996 No. 33) on the basis of permission No. 190 of the Ministry of Health of the Russian Federation regarding clinical trials of MMPV (16.04.2015). A total of 9 individuals at the age of 38–54 years (median — 44 years), six males and three females participated in the vaccination protocol. Control placebo-treated group consisted of 20 age- and sex-matched healthy volunteers. Immunologic reactivity to the antigens was estimated at the time of screening (three days before the first vaccination) and up to 90 days (or 69 days after the second administration of MMPV).

Vaccine

This study was performed as a part of clinical trial for medical application of MMPV, a lyophilized preparation consisting of two recombinant antigens: F1 (17.7 kDa), and V (37 kDa) both at the dose 25–30 μg per injection dose. The vaccine was given subcutaneously twice at an interval of 21 days. The vaccine was manufactured according to the requirements for Good manufacturing Practice (GMP).

Laboratory tests

Genetic studies were based on the DNA obtained from peripheral blood leukocytes as described [24]. The single nucleotide polymorphism of immune response genes was carried out using allele — specific primers (NPF LyTech, Moscow) and electrophoretic detection of PCR products in agarose gel. Twenty polymorphic sites of 14 genes were amplified: interleukin (*IL*) *–1β* ((T-31C), (T-511C), (G-1473C), (C-3953T); *IL2* (T-330G); *IL4* (C-589T); *IL6* (C-174G); *IL10* (C-819T, G-1082A); *IL17* (G-197A); *TNF* (G-308A); receptors *CD14* (C-159T), *FCGR2A* (G-166A), *TLR2* (G-753A), *TLR3* (G-421A), *TLR4* (G-299A), *TLR4* (C-399T), *TLR6* (C-249 E), *TLR9* (T-1237C, A2848G). The respective SNP are recorded in the NCBI dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html) and have the frequency of minor alleles from 1.0 to 47 %.

For serological analysis, blood was taken from the cubital vein in the morning and serum separated. Levels of specific IgG antibodies to the F1 and the V antigens of *Y. pestis* were determined by ELISA. For that, microtiter plates (Greiner Bio-One, Austria) were coated with 100 ng/well of Caf1 or V protein in 0.1 M sodium bicarbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4 °C. Non-specific binding was blocked with 3 % gelatin from cold water fish skin (Sigma) in 0.01 M PBS, pH 7.2. Test sera were added using 2.5-fold serial dilutions in 0.01 M PBS buffer containing 0.05 % Tween-20 (PBST) and incubated for 2 h at 37 °C. After four washes with 0.01M PBST, 100 μl of sheep anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (GE Healthcare) at the dilution of 1:4000 was added for 1.5 h at 37 °C. The plates were washed with PBST, and 100 μl of 0.01 % o-phenylendiamine-H_2O_2 was added to each well. The reaction was stopped by the addition of 100 μl of 1 M H_2SO_4 per well, and OD was read at 450 nm using EVOLIS Twin Plus System (BIO-RAD, USA). The titer of antibodies was estimated as the maximum dilution of serum giving an OD reading that exceeded the background by 0.1. Titer 1:100 was considered as the diagnostic threshold, that is, all individuals who demonstrated positive signal in serum diluted up to 1:100 were considered negative.

Statistical analysis

Titers of specific antibodies were compared between genotype groups for each SNP studied and the differences were analyzed by non-parametric analysis of variance (ANOVA) using GraphPad Prism V software. $P<0.05$ was considered significant. Correlation between the antibody titer and the number of alleles associated with a responder phenotype was performed using linear regression analysis.

RESULTS

Six of nine vaccinated individuals (67 %) developed IgG antibodies to F1 and/or to V antigen (IgG-F1 and IgG-V respectively), and three (33 %) remained seronegative. Five volunteers (55 %) responded to F1 with diagnostic titers > 1:100 (group 1), while 4 others (44 %) remained non-responders. Analysis of SNP showed that serological responders were among individuals with heterozygosity in *TLR9* (AG), *IL6* (CT), and *IL10* (CG) genes. On the other hand, the responders were homozygous for the wild type *IL1β* allele (CC), and for the wild type *IL4* allele (CC). Carriers of the mutant allele of *TLR9* gene (GG) and heterozygotes for the *IL1β* gene (CT) appear to be potential non-responders (Figure 1 A-E). Linear regression analysis revealed a positive correlation between the number of responder alleles in an individual and the IgG titer to F1 (Fig. 1F).

Four of nine vaccinated individuals (44 %) developed antibodies to the V antigen, whereas five remained seronegative (55 %). Analysis of SNP revealed that heterozygosity in all the genes studied does not make individuals non-responsive to the antigen. Homozygosity for mutant alleles in *IL1β* and *IL4* genes (TT), and *IL6* gene (GG) was found in responders. On the other hand, homozygosity for a wild type *IL4* allele (CC) was associated with non-responsiveness to the V antigen (Fig. 2 A-E). Again, linear regression analysis revealed a positive correlation between the number of responder alleles in an individual and the IgG titer to F1 (Fig. 2F).

The analysis of genotypes of *IL1β* (T-31C, G-1473C, T-511C), *IL2* (T-330G), *IL10* (G-1082A), *IL17* (G-197A), *TNF* (G-308A), *CD14* (C-159T), *FCGR2A* (His166Arg), *TLR2* (G-753A), *TLR3* (G-421A), *TLR4* (G-299A), *TLR4* (C-399T), *TLR6* (C-249 E), *TLR9* (T-1237C) did not reveal an association of polymorphism with antibody responses to MMPV (data not shown).

DISCUSSION

Efficiency of novel plague vaccines is a matter of an outmost importance, since the disease is associated with high mortality rates. However, a proportion of vaccinated individuals does

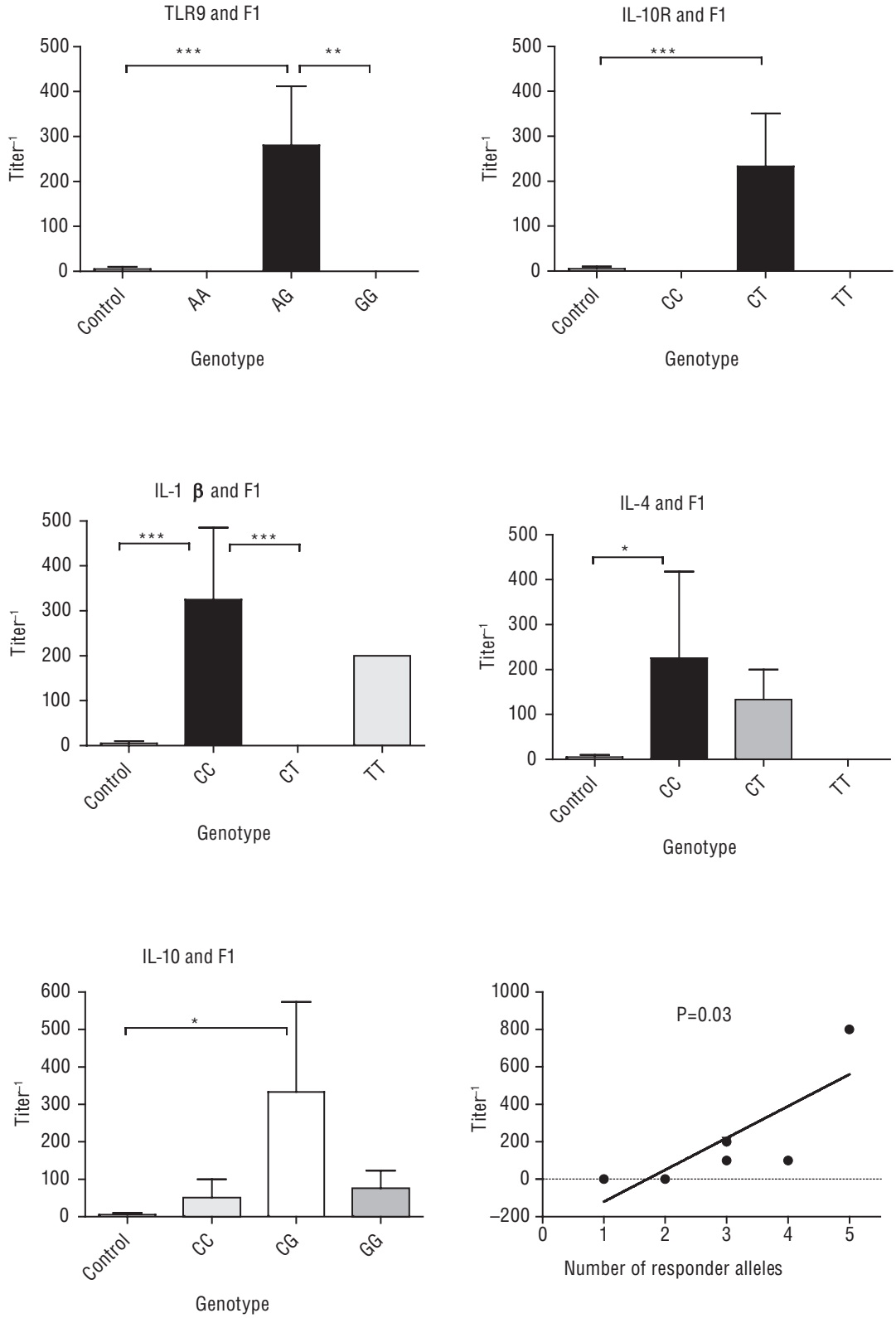


Fig. 1. Effect of SNP on antibody titers to F1 antigen 6 weeks after the second vaccination. (A) *TLR9*; (B) *IL10*; (C) *IL1β* (D) *IL4*; (E) *IL6*. IgG titers were compared by ANOVA. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. (F) Correlation of the anti-F1 IgG titer with the number of permissive alleles (alleles that permit IgG response) in individual subjects (P=0.03)

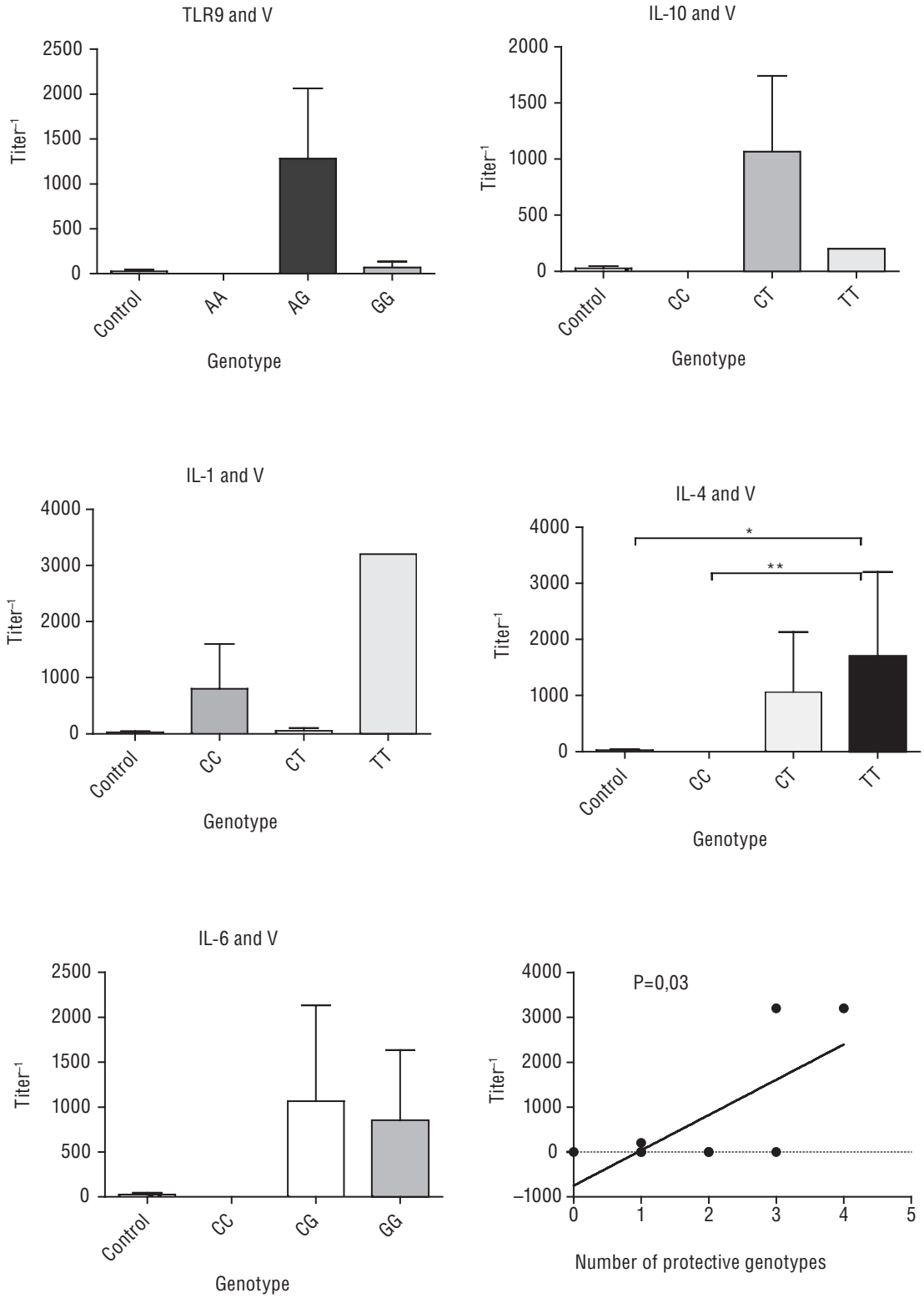


Fig. 2. Effect of SNP on antibody titers to V antigen 6 weeks after the second vaccination. (A) *TLR9*; (B) *IL10*; (C) *IL1β* (D) *IL4*; (E) *IL6*. IgG titers were compared by ANOVA. *P<0.05; **P<0.01. (F) Correlation of the anti-V IgG titer with the number of permissive alleles (alleles that permit IgG response) in individual subjects (P=0.03)

not respond to one or both F1 and V antigens, therefore, identification of such non-responders on the basis of genetic or other markers could help to avoid unnecessary vaccination, or could promote creation of an alternative vaccine. In this small pilot study we investigated SNP of a number of genes that are known for their role in immune responses. We found that five genes are involved in the strength of specific humoral immune response to MMPV, namely *IL1β, IL4, IL6, IL10*, and *TLR9*, and this involvement was associated with SNP at specific positions.

Cytokines are involved in intercellular cooperation and regulation of the immune response. They are produced mostly by activated leukocytes [1, 6, 42]. Some of them play a key role in maintaining of balance between cellular (Th1) and humoral (Th2) immune responses, where Th1 cells provide defense against intracellular pathogens, while Th2 cells — protection against extracellular agents [28]. Genes encoding cytokines and their receptors are characterized by allelic polymorphism, which may have an impact on the function of their respective products [12]. There are more than seven million SNP with a frequency of the minor allele within 5–10 %. Some of these SNP are synonymous, but others affect expression or function of the gene product. Therefore, functionally different alleles can define the risk of a poor immune response [42].

IL-1β is a pro-inflammatory cytokine synthesized mostly by the activated macrophages, keratinocytes, fibroblasts, and stimulated B-lymphocytes. The *IL1β* gene is a part of the cluster of genes located on the long arm of chromosome 2. It consists of 22 exons and nine introns. SNP of the *IL1β* gene at positions –511, —31 and +3953 are well documented [11]. *IL1β* gene wild type allele has C at the position +3953, and a mutant allele has T [30]. This mutation is associated with an excess in IL-1β production [12]. According to our data, the presence of both normal and mutant alleles in homozygosity correlates with humoral immune response to both F1 and V antigens (Fig. 1C and 2C). On the contrary, the heterozygous state was associated with a low or no response to both vaccine components. It has been shown that the structure of highly polymorphic regions of *IL1β* gene affects specific immune response to malaria [26]. A disadvantage of heterozygotes observed in our study is difficult to explain and requires further elucidation.

TLR9 is a receptor capable of prokaryotic DNA recognition due to the presence of non-methylated CpG motifs [13]. TLR9 expressing germinal center plasma cells participate in differentiation of T lymphocytes towards Th1 or Th2 subpopulations [40, 50]. Polymorphism of *TLR9* gene may influence immune response [34, 46]. Some haplotypes of *TLR9* gene are associated with a decreased level of the gene expression [48], which may result in a reduced production of immunoglobulins [29]. In our work, the heterozygotes for *TLR9* gene at the position-2848 were responders to the vaccine, whereas homozygotes for either wild type, or mutant allele were non-responders.

The *IL4* gene is located in a cluster of genes (together with *IL3, IL5, IL13* and *CSF2*) on the long arm of chromosome 5 and contains several polymorphic sites, some of which participate in regulation of IL-4 production. This locus controls Th2 responses [27]. There is evidence that certain haplotypes of *IL4* gene in the position — 590C/T up-regulate its transcription and result in hyper-production of IL-4 [17, 47]. It has been reported that SNP at this gene position influences production of antibodies to malaria [47]. Thus, *IL4* haplotype may be important for subsequent generation of Th2 cells producing various amounts of IL-4 [36]. Bartova et al. [15] have shown that *IL4* polymorphism may be important for IL-6 production.

The *IL6* gene is located on the short arm of chromosome 7 and consists of five exons and four introns. The polymorphic locus of C-174G the regulatory area of the gene is the most studied one [11]. Our data demonstrate that the presence of mutant allele (C-174G) is associated with a responder phenotype, whereas the wild type allele is not. Effect of *IL6* polymorphism on antibody response has been demonstrated. Patel *et al.* demonstrated that SNP at position 174 modulates IL-6 production in response to RCV so that in carriers of the wild type allele IL-6 secretion is inhibited. Authors concluded that RSV, perhaps, has the ability to suppress *IL6* gene transcription and the mutant allele provides an escape mechanism from this inhibition, but this phenomenon requires further studies [38]. Poland et al. showed that *IL6* polymorphism were associated with a more efficient synthesis of antibodies to hemagglutinin in response to inactivated vaccine against seasonal influenza [39].

IL-6 inhibits production of TNF and IL-1 and stimulates secretion of IL-10 [17]. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine which inhibits synthesis of Th1 of cytokines, expression of HLA class II antigens on macrophages, increases the number of IL-4 producing T-cells and enhances survival and proliferation of B cells, and hence — antibody production. The *IL10* gene is located on the long arm of chromosome 1 and contains five exons. The most studied SNPs of this gene are G-1082A, C-819T and C-592A [29]. We found that the absence of the mutant allele at gene position 819 was associated with the responder phenotype to both antigens. Polymorphism of *IL10* gene acts at the level of gene transcription and subsequent protein biosynthesis [11]. It has been reported that polymorphism at the position 1082 of *IL10* gene was associated with variability of humoral immune response to EBV [25].

The strategy of creating anti-plague vaccines was focused mostly on induction of protective antibodies specific to *Y. pestis* targets [3, 44, 45, 49]. The important role of humoral immune response has been demonstrated by passive transfer of immunity with sera from recovered or vaccinated animals, and also by monoclonal antibodies, specific to F1 and V [51]. Unfortunately, the majority of these and relevant studies have an experimental character and their conclusions are based on mouse models [32, 37, 51, 54].

Anti-plague immunity in humans also depends on both humoral and cellular immune responses to other antigens (for example, Yop) which are not a part of these subunit vaccines [31, 54]. Participation of specific CD4+ and CD8 + T-lymphocytes [25, 38], and subpopulations of Th17 and Th1 cells that may attenuate

or enhance vaccines [32] should be taken into consideration for creation of better vaccine in the future.

Our study pores light on the possibility that genetic pre-screening may allow for selection of human individuals that would likely respond to the F1/V subunit MMPV vaccination by mounting a specific humoral protective immunity. Humans that fall into the group of non-responders would benefit from an alternative method of protection, including an alternative vaccine, to be designed yet. If our findings hold true in a study of a larger cohort, we could recommend genotyping candidate individuals for SNP in genes of *IL1β* (C-3953T), *IL4* (C-589T), *IL6* (C-174G), *IL10* (C-819T), and *TLR9* (A2848G). In addition, we would suggest that individuals with non-responder genotype should be included in the future clinical trials assessing novel, universally effective plague vaccines.

This work was performed as a part of Governmental Contract # 334/OK/2013/DRGZ of 06.05.2013 (State Registration # 01201366243).

REFERENCES

1. Avdeeva Zh. I., Alpatova N. A., Akol'zina S. E., Medunitsyn N. V. Immunoad'yuvantnyy effekt tsitokinov [Immunoadjuvant effect of cytokines]. Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal. 2009; 3: 22–27. (in Russian).
2. Anisimov A. P. Molekulyarno-geneticheskie mekhanizmy obrazovaniya i funktsional'naya znachimost' kapsuly Yersinia pestis [Molecular genetic mechanisms of formation and functional significance of Yersinia pestis capsule]. DMed thesis. Saratov; 2000. (in Russian).
3. Bryukhanova G. D. Aktual'nye aspekty epidemiologii i mikrobiologii chumy v sovremennykh usloviyakh [Relevant aspects of epidemiology and microbiology of the plague in modern conditions]. DMed thesis. Saratov; 2004. (in Russian).
4. Lipnitskiy A. V., Barkova I. A., Antonov V. A., Barkov A. M. Vliyanie polimorfizmov genov cheloveka na immunnyy otvet posle vaktsinatsii. [Effect of polymorphisms in human genes on the immune response after vaccination]. Infektsionnye bolezni. 2015; 13 (4): 37–42. (in Russian).
5. Mironova L. V., Balakhonov S. V. Polnogenomnyy analiz odnonukleotidnykh polimorfizmov v izuchenii molekulyarnoy epidemiologii kholery i evolyutsionnoy istorii vozbuditelya [Genome-wide SNP analysis in the study of the molecular epidemiology of cholera and the evolutionary history of the causative agent]. Epidemiologija i vakcinoprofilaktika. 2014; 77 (4): 10–16. (in Russian).
6. Nazarova E. L., Shardakov V. I., Dem'yanova V. T. et al. Ob otsenke polimorfizma genov tsitokinov pri V-kletochnykh opukholyakh limfaticheskoy sistemy [About assessment of cytokines gene polymorphism in B-cell tumors of the lymphatic system]. Meditsinskaya immunologiya. 2014; 16 (5): 431–436. (in Russian).
7. Naumov A. V., Ledvanov M. Yu., Drozdov I. G. Immunologiya chumy [Plague Immunology]. Saratov: RosNIIPChI «Mikrob»; 1992. (in Russian).
8. Rizvanova F. F., Pikuza O. I., Fayzullina R. A. et al. Geneticheskaya diagnostika: polimorfizm genov tsitokinov [Genetic diagnosis: cytokine gene polymorphism]. Prakticheskaja medicina. 2010; 6 (45): 41–43. (in Russian).
9. Simbirtsev A. S., Gromova A. Yu. Funktsional'nyy polimorfizm genov regulyatornykh molekul vospaleniya [Functional polymorphism gene regulatory molecules inflammation]. Tsitokiny i vospalenie. 2005; 4 (1): 3–10. (in Russian).
10. Supotnitskiy M. V. Geneticheskie ogranicheniya effektivnosti i bezopasnosti massovykh vaktsinatsiy naseleniya [Genetic limitations the effectiveness and safety of mass vaccination of the population]. Aktual'naya infektologiya. 2015; 6 (1): 100–115. (in Russian).
11. Teplyakov A. T., Berezikova E. N., Shilov S. N. Serdechnaya nedostatochnost': kliniko-geneticheskie aspekty ishemicheskogo remodelirovaniya i apoptoza miokarda v razvitii serdechnoy nedostatochnosti. [Heart failure: clinical and genetic aspects of ischemic myocardial remodeling and apoptosis in heart failure]. Tomsk: STT Publishing; 2015. (in Russian).
12. Tsarev V. N., Nikolaeva E. N. Polimorfizm genov IL1α i IL1β i bakterial'naya invaziya u bol'nykh khronicheskim generalizovannym parodontitom [Polymorphism of IL1α and IL1β genes and bacterial invasion in patients with chronic generalized periodontitis]. Stomatologiya. 2010; 6: 19–23. (in Russian).
13. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol. 2001; 2 (8): 675–80.
14. Anisimov A. P., Lindler L. E., Pier G. B. Intraspecific diversity of Yersinia pestis. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17 (2): 434–64.
15. Bartova J., Borilova Linhartova P., Podzimek S. et al. The effect of IL-4 gene polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and in healthy controls. Mediators Inflamm. 2014; Article ID 185757: 11 pages. Available at: http://dx.doi.org/10.1155/2014/185757 (Accessed 09.02.2016). doi: 10.1155/2014/185757.
16. Bauer S., Muller T., Hamm S. Pattern recognition by Toll-like receptors. Adv. Exp. Med. Biol. 2009; 653: 15–34.
17. Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lescoulie P. et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1999; 42 (6): 1093–1100.
18. Corey L., Gilbert P. B., Tomaras G. D. et al. Immune correlates of vaccine protection against HIV-1 acquisition. Sci. Transl. Med. 2015; 7 (310): 310–317. doi: 10.1126/scitranslmed.aac7732.
19. Dentovskaya S. V., Ivanov S. A., Kopylov P. Kh. et al. Selective protective potency of Yersinia pestis ΔnlpD mutants. Acta Naturae. 2015; 7 (1): 102–108.
20. Derbise A., Cerdà Marín A., Ave P. et al. An encapsulated Yersinia pseudotuberculosis is a highly efficient vaccine against pneumonic plague. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6 (2): e1528. 11 pages. doi: 10.1371/journal.pntd.0001528.
21. Feodorova V. A., Pan'kina L. N., Savostina E. P. et al. A Yersinia pestis lpxM-mutant live vaccine induces enhanced immunity against

bubonic plague in mice and guinea pigs. Vaccine. 2006; 25 (44): 7620–28.
22. Flashner Y., Mamroud E., Tidhar A. et al. Generation of Yersinia pestis attenuated strains by signature-tagged mutagenesis in search of novel vaccine candidates. Infect. Immun. 2004; 72 (2): 908–15.
23. Garbom S., Forsberg A., Wolf-Watz H., Kihlberg B.-M. Identification of novel virulence-associated genes via genome analysis of hypothetical genes. Infect. Immun. 2004; 72 (3): 1333–40.
24. Graham D. E. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. Anal. Biochem. 1978; 85 (2): 609–613.
25. Helminen M., Lahdenpohja N., Hurme M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. J. Infect. Dis. 1999; 180 (2): 496–99.
26. Israelsson E. Host genetic factors and antibody responses with potential involvement in the susceptibility to malaria. Stockholm; 2008.
27. Kaslow R. A., McNicholl J., Hill A. V. S., eds. Genetic Susceptibility to Infectious Diseases. Oxford: Oxford University Press; 2008.
28. Keen L. J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. Transpl. Immunol. 2002; 10 (2–3): 143–146.
29. Kikuchi K., Lian Z. X., Kimura Y. et al. Genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 influence the immune response to CpG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. J. Autoimmun. 2005; 24 (4): 347–52.
30. Kornman K. S., di Giovine F. S. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. Ann. Periodontol. 1998; 3 (1): 327–38.
31. Li B., Du C., Zhou L. et al. Humoral and cellular immune responses to Yersinia pestis infection in long-term recovered plague patients. Clin. Vaccine Immunol. 2012; 19 (2): 228–34. doi: 10.1128/CVI.05559–11.
32. Lin J.-S., Kummer L. W., Szaba F. M., Smiley S. T. IL-17 contributes to cell-mediated defense against pulmonary Yersinia pestis infection. J. Immunol. 2011; 186 (3): 1675–84. doi: 10.4049/jimmunol.1003303.
33. McMichael A. Prospects for an AIDS vaccine. Clin. Med. 2003; 3 (3): 269–72.
34. Misch E. A., Hawn T. R. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. Clinical Science. 2008; 114 (5): 347–60. doi: 10.1042/CS20070214.
35. Nakajima R., Brubaker R. R. Association between virulence of Yersinia pestis and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. Infect. Immun. 1993; 61 (1): 23–31.
36. Nakashima H., Miyake K., Inoue Y. et al. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. Genes Immun. 2002; 3 (2): 107–9.
37. Parent M. A., Berggren K. N., Kummer L. W. et al. Cell-mediated protection against pulmonary Yersinia pestis infection. Infect. Immun. 2005; 11: 7304–10.
38. Patel J. A., Nair S., Ochoa E. E. et al. Interleukin-6^{-174} and tumor necrosis factor α^{-308} polymorphisms enhance cytokine production by human macrophages exposed to respiratory viruses. J. Interferon Cytokine Res. 2010; 30 (12): 917–21. doi: 10.1089/jir.2010.0033.
39. Poland G. A., Ovsyannikova I. G., Jacobson R. M. Immunogenetics of seasonal influenza vaccine response. Vaccine. 2008; 26 (Suppl. 4): D35–D40.
40. Rissoan M. C., Soumelis V., Kadowaki N. et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science. 1999; 283 (5405): 1183–86.
41. Rosenzweig J. A., Chopra A. K. The future of plague vaccines: hopes raised by a surrogate, live-attenuated recombinant vaccine candidate. Expert. Rev. Vaccines. 2012; 11 (6): 659–61. doi: 10.1586/erv.12.34.
42. Senda T. Structure and function of cytokines and their receptors. Protein Nucl. Acid and Enzyme. 1999; 44 (4): 318–24.
43. Sha J., Agar S. L., Baze W. B. et al. Braun lipoprotein (Lpp) contributes to virulence of yersiniae: potential role of Lpp in inducing bubonic and pneumonic plague. Infect. Immun. 2008; 76 (4): 1390–1409. doi: 10.1128/IAI.01529–07.
44. Smiley S. T. Immune defense against pneumonic plague. Immunol. Rev. 2008; 225 (1): 256–71. doi: 10.1111/j.1600–065X.2008.00674.x.
45. Sun W., Roland K. L., Curtiss R. 3rd. Developing live vaccines against plague. J. Infect. Dev. Countries. 2011; 5 (9): 614–27.
46. Suzuki H., Suzuki Y., Narita I. et al. Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy. Am. Soc. Nephrol. 2008; 19 (12): 2384–95. doi: 10.1681/ASN.2007121311.
47. Tangteerawatana P., Perlmann H., Hayano M. et al. IL4 gene polymorphism and previous malaria experiences manipulate anti-Plasmodium falciparum antibody isotype profiles in complicated and uncomplicated malaria. Malar. J. 2009; 8 (286): 10 pages. doi: 10.1186/1475–2875–8-286.
48. Tao K., Fujii M., Tsukumo S. et al. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. Ann. Rheum. Dis. 2007; 66 (7): 905–09.
49. Une T., Brubaker R. R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in yersiniae. J. Immunol. 1984; 133 (4): 2226–30.
50. Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. Trends Immunol. 2004; 25 (7): 381–86.
51. Wang S., Goguen J. D., Li F., Lu S. Involvement of CD8+ T cell-mediated immune responses in LcrV DNA vaccine induced protection against lethal Yersinia pestis challenge. Vaccine. 2011. 29 (39): 6802–09. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.062.
52. Welkos S., Friedlander A., McDowell D. et al. V antigen of Yersinia pestis inhibits neutrophil chemotaxis. Microb. Pathol. 1998; 24 (3): 185–96.
53. Welkos S., Pitt M. L. M., Martinez M. et al. Determination of the virulence of the pigmentation-deficient and pigmentation-/plasminogen activator-deficient strains of Yersinia pestis in non-human primate and mouse models of pneumonic plague. Vaccine. 2002; 20 (17–18): 2206–14.
54. Williamson E. D. The role of immune correlates and surrogate markers in the development of vaccines and immunotherapies for plague. Adv. Prev. Med. 2012; Article ID 365980: 7 pages (Accessed 17.02.2016). doi: 10.1155/2012/365980.

55. Zhang X., Qi Z., Du Z. et al. A live attenuated strain of Yersinia pestis ΔyscB provides protection against bubonic and pneumonic plagues in mouse model. Vaccine. 2013; 31 (22): 2539–42. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.03.054.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Ж. И., Алпатова Н. А., Акользина С. Е., Медуницын Н. В. Иммуноадъювантный эффект цитокинов. Тихоокеанский медицинский журнал. 2009; 3: 22–27.
2. Анисимов А. П. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Саратов; 2000.
3. Брюханова Г. Д. Актуальные аспекты эпидемиологии и микробиологии чумы в современных условиях. Дис. ... докт. мед. наук. Саратов; 2004.
4. Липницкий А. В., Баркова И. А., Антонов В. А., Барков А. М. Влияние полиморфизмов генов человека на иммунный ответ после вакцинации. Инфекционные болезни. 2015; 13 (4): 37–42.
5. Миронова Л. В., Балахонов С. В. Полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов в изучении молекулярной эпидемиологии холеры и эволюционной истории возбудителя. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014; 77 (4): 10–16.
6. Назарова Е. Л., Шардаков В. И., Демьянова В. Т., и соавт. Об оценке полиморфизма генов цитокинов при В-клеточных опухолях лимфатической системы. Медицинская иммунология. 2014; 16 (5): 431–436. Доступен по: http://dx.doi.org/10.15789/1563–0625–2014–5–431–436 (дата обращения 02.02.2016).
7. Наумов А. В., Ледванов М. Ю., Дроздов И. Г. Иммунология чумы. Саратов; 1992.
8. Ризванова Ф. Ф., Пикуза О. И., Файзуллина Р. А. и соавт. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов. Практическая медицина. 2010; 6 (45): 41–43.
9. Симбирцев А. С., Громова А. Ю. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления. Цитокины и воспаление. 2005; 4 (1): 3–10.
10. Супотницкий М. В. Генетические ограничения эффективности и безопасности массовых вакцинаций населения. Актуальная инфектология. 2015; 6 (1): 100–115.
11. Тепляков А. Т., Березикова Е. Н., Шилов С. Н. Сердечная недостаточность: клинико-генетические аспекты ишемического ремоделирования и апоптоза миокарда в развитии сердечной недостаточности. Томск; 2015.
12. Царев В. Н., Николаева Е. Н. Полиморфизм генов ИЛ1α и ИЛ1β и бактериальная инвазия у больных хроническим генерализованным пародонтитом. Стоматология. 2010; 6: 19–23.
13. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol. 2001; 2 (8): 675–80.
14. Anisimov A. P., Lindler L. E., Pier G. B. Intraspecific diversity of Yersinia pestis. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17 (2): 434–64.
15. Bartova J., Borilova Linhartova P., Podzimek S. et al. The effect of IL-4 gene polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and in healthy controls. Mediators Inflamm. 2014; Article ID 185757: 11 pages. Available at: http://dx.doi.org/10.1155/2014/185757 (Accessed 09.02.2016). doi: 10.1155/2014/185757.
16. Bauer S., Muller T., Hamm S. Pattern recognition by Toll-like receptors. Adv. Exp. Med. Biol. 2009; 653: 15–34.
17. Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lescoulie P. et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1999; 42 (6): 1093–1100.
18. Corey L., Gilbert P. B., Tomaras G. D. et al. Immune correlates of vaccine protection against HIV-1 acquisition. Sci. Transl. Med. 2015; 7 (310): 310–317. doi: 10.1126/scitranslmed.aac7732.
19. Dentovskaya S. V., Ivanov S. A., Kopylov P. Kh. et al. Selective protective potency of Yersinia pestis ΔnlpD mutants. Acta Naturae. 2015; 7 (1): 102–108.
20. Derbise A., Cerdà Marín A., Ave P. et al. An encapsulated Yersinia pseudotuberculosis is a highly efficient vaccine against pneumonic plague. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6 (2): e1528. 11 pages. doi: 10.1371/journal.pntd.0001528.
21. Feodorova V. A., Pan'kina L. N., Savostina E. P. et al. A Yersinia pestis lpxM-mutant live vaccine induces enhanced immunity against bubonic plague in mice and guinea pigs. Vaccine. 2006; 25 (44): 7620–28.
22. Flashner Y., Mamroud E., Tidhar A. et al. Generation of Yersinia pestis attenuated strains by signature-tagged mutagenesis in search of novel vaccine candidates. Infect. Immun. 2004; 72 (2): 908–15.
23. Garbom S., Forsberg A., Wolf-Watz H., Kihlberg B.-M. Identification of novel virulence-associated genes via genome analysis of hypothetical genes. Infect. Immun. 2004; 72 (3): 1333–40.
24. Graham D. E. The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. Anal. Biochem. 1978; 85 (2): 609–613.
25. Helminen M., Lahdenpohja N., Hurme M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. J. Infect. Dis. 1999; 180 (2): 496–99.
26. Israelsson E. Host genetic factors and antibody responses with potential involvement in the susceptibility to malaria. Stockholm; 2008.
27. Kaslow R. A., McNicholl J., Hill A. V. S., eds. Genetic Susceptibility to Infectious Diseases. Oxford: Oxford University Press; 2008.
28. Keen L. J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. Transpl. Immunol. 2002; 10 (2–3): 143–146.
29. Kikuchi K., Lian Z. X., Kimura Y. et al. Genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 influence the immune response to CpG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. J. Autoimmun. 2005; 24 (4): 347–52.
30. Kornman K. S., di Giovine F. S. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. Ann. Periodontol. 1998; 3 (1): 327–38.
31. Li B., Du C., Zhou L. et al. Humoral and cellular immune responses to Yersinia pestis infection in long-term recovered plague

patients. Clin. Vaccine Immunol. 2012; 19 (2): 228–34. doi: 10.1128/CVI.05559–11.
32. Lin J.-S., Kummer L. W., Szaba F. M., Smiley S. T. IL-17 contributes to cell-mediated defense against pulmonary Yersinia pestis infection. J. Immunol. 2011; 186 (3): 1675–84. doi: 10.4049/jimmunol.1003303.
33. McMichael A. Prospects for an AIDS vaccine. Clin. Med. 2003; 3 (3): 269–72.
34. Misch E. A., Hawn T. R. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. Clinical Science. 2008; 114 (5): 347–60. doi: 10.1042/CS20070214.
35. Nakajima R., Brubaker R. R. Association between virulence of Yersinia pestis and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. Infect. Immun. 1993; 61 (1): 23–31.
36. Nakashima H., Miyake K., Inoue Y. et al. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. Genes Immun. 2002; 3 (2): 107–9.
37. Parent M. A., Berggren K. N., Kummer L. W. et al. Cell-mediated protection against pulmonary Yersinia pestis infection. Infect. Immun. 2005; 11: 7304–10.
38. Patel J. A., Nair S., Ochoa E. E. et al. Interleukin-6^{-174} and tumor necrosis factor α^{-308} polymorphisms enhance cytokine production by human macrophages exposed to respiratory viruses. J. Interferon Cytokine Res. 2010; 30 (12): 917–21. doi: 10.1089/jir.2010.0033.
39. Poland G. A., Ovsyannikova I. G., Jacobson R. M. Immunogenetics of seasonal influenza vaccine response. Vaccine. 2008; 26 (Suppl. 4): D35–D40.
40. Rissoan M. C., Soumelis V., Kadowaki N. et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science. 1999; 283 (5405): 1183–86.
41. Rosenzweig J. A., Chopra A. K. The future of plague vaccines: hopes raised by a surrogate, live-attenuated recombinant vaccine candidate. Expert. Rev. Vaccines. 2012; 11 (6): 659–61. doi: 10.1586/erv.12.34.
42. Senda T. Structure and function of cytokines and their receptors. Protein Nucl. Acid and Enzyme. 1999; 44 (4): 318–24.
43. Sha J., Agar S. L., Baze W. B. et al. Braun lipoprotein (Lpp) contributes to virulence of yersiniae: potential role of Lpp in inducing bubonic and pneumonic plague. Infect. Immun. 2008; 76 (4): 1390–1409. doi: 10.1128/IAI.01529–07.
44. Smiley S. T. Immune defense against pneumonic plague. Immunol. Rev. 2008; 225 (1): 256–71. doi: 10.1111/j.1600–065X.2008.00674.x.
45. Sun W., Roland K. L., Curtiss R. 3rd. Developing live vaccines against plague. J. Infect. Dev. Countries. 2011; 5 (9): 614–27.
46. Suzuki H., Suzuki Y., Narita I. et al. Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy. Am. Soc. Nephrol. 2008; 19 (12): 2384–95. doi: 10.1681/ASN.2007121311.
47. Tangteerawatana P., Perlmann H., Hayano M. et al. IL4 gene polymorphism and previous malaria experiences manipulate anti-Plasmodium falciparum antibody isotype profiles in complicated and uncomplicated malaria. Malar. J. 2009; 8 (286): 10 pages. doi: 10.1186/1475–2875–8-286.
48. Tao K., Fujii M., Tsukumo S. et al. Genetic variations of Toll-like receptor 9 predispose to systemic lupus erythematosus in Japanese population. Ann. Rheum. Dis. 2007; 66 (7): 905–09.
49. Une T., Brubaker R. R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in yersiniae. J. Immunol. 1984; 133 (4): 2226–30.
50. Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. Trends Immunol. 2004; 25 (7): 381–86.
51. Wang S., Goguen J. D., Li F., Lu S. Involvement of CD8+ T cell-mediated immune responses in LcrV DNA vaccine induced protection against lethal Yersinia pestis challenge. Vaccine. 2011; 29 (39): 6802–09. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.062.
52. Welkos S., Friedlander A., McDowell D. et al. V antigen of Yersinia pestis inhibits neutrophil chemotaxis. Microb. Pathol. 1998; 24 (3): 185–96.
53. Welkos S., Pitt M. L. M., Martinez M. et al. Determination of the virulence of the pigmentation-deficient and pigmentation-/plasminogen activator-deficient strains of Yersinia pestis in non-human primate and mouse models of pneumonic plague. Vaccine. 2002; 20 (17–18): 2206–14.
54. Williamson E. D. The role of immune correlates and surrogate markers in the development of vaccines and immunotherapies for plague. Adv. Prev. Med. 2012; Article ID 365980: 7 pages (Accessed 17.02.2016). doi: 10.1155/2012/365980.
55. Zhang X., Qi Z., Du Z. et al. A live attenuated strain of Yersinia pestis ΔyscB provides protection against bubonic and pneumonic plagues in mouse model. Vaccine. 2013; 31 (22): 2539–42. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.03.054.

УДК 612.017.2+616-053.2+796

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АДАПТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ОРГАНИЗМА ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ ДЛЯ ЗАНЯТИЙ ФИЗИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРОЙ

© Николай Валентинович Хайцев, Лев Дмитриевич Балашов, Алефтина Алексеевна Кравцова, Мария Александровна Пахомова

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2

Контактная информация: Николай Валентинович Хайцев — профессор, кафедра патологической физиологии с курсом иммунопатологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета. E-mail: nvh195725@gmail.com

РЕЗЮМЕ: Предложен экспериментально апробированный метод оценки функционального состояния гипофиз-адреналовой системы у детей разного пола до начала полового созревания (7 лет), в начале пубертатного периода (9 лет) и при завершении пубертата (15 лет) по величине показателя «индекс резистентности». Для лабораторных животных такой показатель определяется как частное от деления среднего уровня потребления кислорода при охлаждении животных на среднее значение его при комнатной температуре. У детей и подростков определяли частоту сердечных сокращений в норме и при стрессе (завязывание глаз). Разрабатываемый показатель (“индекс резистентности”) находится в средней и сильной взаимосвязи (корреляции) с физической работоспособностью и максимальным уровнем потребления кислорода. Метод определения “индекса резистентности” зависит от возраста и пола детей и подростков. Разработана методика индивидуального прогноза потенциальных возможностей организма детей и подростков для освоения школьной программы по физической культуре.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: индекс резистентности; гипофиз-адреналовая система; физическая работоспособность; методические рекомендации.

ASSESSMENT OF POTENTIAL ADAPTIVE CAPABILITY IN CHILDREN’S AND TEENAGERS’ ORGANISM FOR GOING IN FOR SPORT AND PHYSICAL TRAINING

© Nikolay V. Khaitsev, Lev D. Balashov, Aleftina A. Kravtsova, Maria A. Pakhomova

Saint Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya st., Saint Petersburg, 194100, Russia

Contact information: Nikolay V. Khaitsev — professor, Pathophysiology dept. of the Saint Petersburg State Pediatric Medical University. E-mail: nvh195725@gmail.com

ABSTRACT: An experimentally-tested method is suggested for the assessment of pituitary-adrenal system functional state in immature children of both sexes under 7 years, in children entering puberity (9 years) and in adolescents (15 years) based on the “resistance index” value. Experiments involving laboratory animals help to ascertain this index as a result of mean oxygen consumption in cooled animals divided by the same parameter measured at room temperature. In children and adolescents we measured the heart rate at rest and during stress (blindfold). The resultant parameter (“resistance index”) is medium to strong associated (correlates) with physical efficiency and maximum oxygen consumption level. The method for the assessment of “resistance index” is age- and sex-dependant. A method has been elaborated for individual prognosis of potential capabilities of children and adolescent organisms for coping with school program in physical training.

KEYWORDS: resistance index; pituitary-adrenal system; physical efficiency; methodical recommendations.

Данная публикация — попытка предложить критерий, на основе которого можно было бы оценить уровень потенциальных возможностей организма детей и подростков. Под этими возможностями подразумевается способность детей и подростков без ущерба для своего здоровья осваивать школьную программу по физической культуре. Наличие такого критерия в руках учителя физкультуры позволит дифференцировать детский контингент на подгруппы, для которых будет полезной разработка индивидуального подхода к степени физической нагрузки или, в крайнем случае, профилактика в виде временного полного или частичного освобождения детей от различных видов физических упражнений. Это позволит предотвратить снижение уровня здоровья школьников и вооружит учителя быстрым и информативным методом тестирования состояния организма.

Способность организма к определенному уровню физической работоспособности взаимосвязана с общим адаптивным потенциалом организма. Специфическая адаптация к физической нагрузке в своей основе имеет много общих черт с адаптацией к гипоксии. В условиях интенсивной работы мышц, также как и при кислородной недостаточности, организм ведет активную борьбу за энергетическое обеспечение тканей. При этом включаются механизмы как системного (дыхательная, сердечно-сосудистая, кровь), так и тканевого (гликогенолиз, окислительное фосфорилирование) уровней [1, 5, 8].

Известно, что адаптация к гипоксии приводит к повышению сопротивляемости организма к инфекциям, и в то же время тренированные спортсмены на соревнованиях, т. е. в условиях стресса, подвержены простудным заболеваниям Физические нагрузки умеренной мощности приводят к повышению функциональной активности иммунной системы [5, 11].

Следовательно, критерий, оценивающий потенциальные возможности организма школьников к физической нагрузке, должен затрагивать наиболее общие механизмы, характерные для любого вида адаптации. Таким критерием может быть уровень общей неспецифической резистентности организма [9, 10].

Обследованию подвергались 60 человек разного возраста: школьники мальчики и девочки в возрасте 7-ми, 9-ти и 15-ти лет. Определялись масса тела, частота сердечных сокращений (ЧСС), “индекс резистентности” (ИНД) [2], вегетативный индекс (ВИ) [8], физическая работоспособность и максимальное потребление кислорода (МПК) [5,8].

Материал, полученный в процессе исследования, подвергался статистической обработке по методу Стьюдента. Вычислялись средние и ошибки средних, определялись вероятность ошибки “p” и доверительные границы средних при уровне значимости 0,05. Кроме того, проводился корреляционный анализ. Основной объем вычислений выполнен на IBM с использованием программы статистической обработки материала “Statgraf”.

Известно, что уровень неспецифической резистентности находится в тесной взаимосвязи с функциональным состоянием гипофиз-адреналовой системы (ГАС) [2, 3]. Количественным показателем функционального состояния ГАС является ИНД. В настоящее время в экспериментах для определения ИНД используется разработанная методика, позволяющая оценить функциональное состояние ГАС по степени повышения потребления кислорода при охлаждении [2]. В опытах на белых крысах, мышах и морских свинках авторами метода было установлено, что этот показатель коррелирует с устойчивостью животных к рентгеновскому облучению, гипоксии, а также к острому и хроническому действию разнообразных химических соединений (эпихлоргидрин, стирол, толуол, бензол и др.) [2, 9, 10]. У адреналэктомированных животных повышения потребления кислорода при действии вредных факторов, в том числе и при охлаждении, не происходит [2].

ИНД успешно использован многими исследователями как показатель для определения активности ГАС и для оценки уровня общей неспецифической резистентности организма [2, 7, 9, 10, 12].

Методически величина ИНД определяется как отношение уровня потребления кислорода животными при температуре 0 °С к таковому при температуре +20 °С. Регистрирование показателей при охлаждении начинается через 2 минуты после помещения животного в холодильник [2].

Естественно, что перенесение такого метода обследования на людей не представляется возможным по ряду причин. Во-первых, охлаждение не может быть выбрано в качестве тестирующей стрессорной нагрузки, для детей в частности. При действии стрессора любой природы в первый момент наблюдается повышение уровня потребления кислорода. Поэтому в качестве стрессирующей процедуры был использован следующий прием — сидящим детям завязывали глаза и через 2 минуты после этого заставляли стоять в течение 5 минут. Во-вторых, в арсенале учителя вряд ли найдется газоанализатор для измерения уровня потребления кислорода. Однако известно, что потребление кислорода находится в тесной взаимосвязи с частотой сердечных сокращений (ЧСС) [1, 13], поэтому при вычислении ИНД мы решили получать частное от деления ЧСС при стрессорной нагрузке на ЧСС в покое (до стресса, вызываемого завязыванием глаз). Величина ИНД определялась каждые 30 секунд в течение 5 минут.

Похожий методический прием используется при проведении ортостатической пробы, когда вычисляется вегетативный индекс (частное от деления ЧСС при вставании на ЧСС в положении сидя или лежа). Для того чтобы развести ВИ и ИНД как показатели, оценивающие несколько разные явления (вегетативный индекс — для оценки активности симпатико-адреналовой системы, ИНД — для оценки ГАС), мы сравнили у обследуемого контингента детей и подростков ВИ с ИНД, определяемыми сразу после вставания. То есть в первом случае дети и сидели 2 минуты и затем вставали с открытыми глазами, а во втором — с закрытыми.

Так, среди мальчиков 7, 9 и 15 лет обнаружилась явная тенденция в большей величине ИНД, по сравнению с величиной ВИ: 1,1±10,02 и 1,07±0,02; 1,06±0,03 и 1,01±0,04; 1,10±0,03 и 1,09±0,02, соответственно. Среди девочек 7-, 9- и 15-летнего возраста отмечалась аналогичная закономерность, усиленная достоверностью различий ($p < 0,05$) в 7- и 15-летнем возрасте: 1,11±0,04 и 1,02±0,01; 1,12±0,04 и 1,07±0,05; 1,16±0,05 и 1,04±0,02.

На следующем этапе исследования было необходимо уточнить методику определения ИНД. Речь идет о выборе временного интервала — от момента завязывания глаз ребенку до точки определения ЧСС. Именно поэтому величины ЧСС определялись каждые 30 секунд в течение 5 минут после вставания и соотносились с исходной величиной ЧСС в покое. Соответственно для каждой точки вычислялся свой ИНД (например, ИНД-0 — это «индекс резистентности», определенный сразу после вставания, а ИНД-2,5 — это «индекс резистентности», определенный через 2,5 минуты после вставания). Было интересно проследить динамику изменения величины ИНД во времени для выбора наиболее информативной точки.

Анализ полученных результатов не позволил выделить одно, общее для всех возрастов и полов, время фиксации ЧСС и, как следствие, «индекса резистентности». Динамика величин ИНД в течение 5 минут была разнонаправленна: среди мальчиков 7 лет и девочек 9 лет наблюдалось незначительное колебание величин относительно исходного значения; у девочек 7 и 15 лет отмечалась тенденция к снижению, а у мальчиков 9 и 15 лет — к повышению ИНД. Причем волнообразность процесса отмечена во всех обследованных группах детей.

В связи с этим возникла необходимость «привязать» величину «индекса резистентности» к какому-либо свойству организма. Для достижения цели нашей работы таким свойством, как нам представляется, является физическая работоспособность. Это, по нашему мнению, повысит информативность показателя, получаемого при тестировании детей.

Для определения работоспособности существуют различные подходы. Мы, руководствуясь принципами доступности и щадящим уровнем нагрузок, использовали приседания (20 приседаний за 30 секунд) [6]. К сожалению, в доступной нам литературе мы не нашли способа вычисления работоспособности при данном виде нагрузки. Поэтому нам пришлось разработать свой, условный способ обсчета работоспособности, принцип которого состоит в следующем. Работоспособность находится в прямой взаимосвязи с массой тела (через мощность) и в определенной взаимосвязи с изменением ЧСС в результате нагрузки. В каком-то смысле наша формула обсчета работоспособности перекликается с методом определения PWC_{170} по Корниенко [5]. Однако в нашем случае в качестве эталонной ЧСС для нагрузки была использована величина, равная средней арифметической для каждого возраста и пола отдельно:

$$\text{Работоспособность} = m \times (ЧСС_{эт.} - ЧСС_{п.})/(ЧСС_{н.} - ЧСС_{п.}),$$

где m — масса тела; $ЧСС_{эт.}$ — частота сердечных сокращений эталонная (табл. 1); $ЧСС_{п.}$ — частота сердечных сокращений в покое; $ЧСС_{н.}$ — частота сердечных сокращений после нагрузки (индивидуальные данные для каждого ребенка).

Кроме того, используя номограмму Астранда-Риминга, для каждого ребенка по массе тела и ЧСС после нагрузки определяли уровень МПК, который является показателем аэробных возможностей организма при физических нагрузках [5, 6].

Результаты этого исследования представлены в таблице 1. Данные таблицы свидетельствуют о том, что с возрастом величины работоспособности и МПК возрастают. Причем отмечаются тенденции общепринятых различий в связи с половыми особенностями: девочки отставали по этим показателям от мальчиков. Хочется отметить, что эти закономерности выявлены несмотря на небольшое число наблюдений (в каждой группе по 10 человек), и, следовательно, использованный нами способ расчета работоспособности оказался достаточно корректным.

Однако главной целью исследования являлась разработка методики определения ИНД и наполнения этого по-

Таблица 1

Функциональные возможности организма детей разного возраста для физической нагрузки

Пол	Возраст, годы	Масса тела, кг	ЧСС после нагрузки, эталонная	Работоспособность, усл.ед.	МПК, л/мин
Мальчики	7	26.0±0.9	134.4±3.0	27.2±2.3	2.03±0.09
Девочки	7	23.9±1.1	133.8±2.4	24.4±1.1	1.33±0.07
Мальчики	9	31.9±1.4	141.6±3.5	32.7±2.3	2.11±0.10
Девочки	9	32.3±1.8	145.8±3.1	32.4±1.9	1.62±0.10
Мальчики	15	61.3±1.4	162.0±3.7	62.8±3.0	2.75±0.09
Девочки	15	58.4±2.8	150.0±3.9	60.3±4.3	2.73±0.17

казателя адекватным смыслом. Поэтому необходимо было сопоставить значимость динамики изменения ИНД в течение 5 минутного его определения с индивидуальными уровнями работоспособности и МПК. Для этого был проведен корреляционный анализ: учитывались индивидуальные корреляции между величинами ИНД, определяемыми сразу после вставания, а также через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 и 5 минут после вставания, с исходными значениями работоспособности и МПК.

Так, среди мальчиков 7 лет наиболее тесная взаимосвязь между ИНД и работоспособностью, а также уровнем МПК, отмечена для точки «3.5 минуты»: r = –0,40 и –0,40, соответственно (средняя отрицательная взаимосвязь, $p < 0,05$).

Среди девочек 7-летнего возраста наиболее тесная взаимосвязь между ИНД и работоспособностью, а также уровнем МПК, отмечена для точки «4 минуты»: r = –0,81 и –0,58, соответственно (сильная и средняя отрицательные взаимосвязи, $p < 0,05$).

У мальчиков 9 лет наиболее тесная взаимосвязь между ИНД и работоспособностью, а также уровнем МПК, отмечена для точки «3,5 минуты»: r = –0,56 и –0,57, соответственно (средняя отрицательная взаимосвязь, $p < 0,05$).

Девочки 9-летнего возраста характеризовались наиболее тесной взаимосвязью между ИНД и работоспособностью, а также уровнем МПК, в точке «4 минуты»: r = –0,30 и –0,38, соответственно (средняя отрицательная взаимосвязь, $p<0,05$).

Среди мальчиков 15 лет наиболее тесная взаимосвязь между ИНД и работоспособностью, а также уровнем МПК, отмечена для точки «0,5 минуты»: r = –0,64 и –0,61, соответственно (сильная отрицательная взаимосвязь, $p < 0,05$).

Для девочек 15 лет наиболее тесная взаимосвязь между ИНД и работоспособностью, а также уровнем МПК, отмечена для точки «4,5 минуты»: r = –0,61 и –0,62, соответственно (сильная отрицательная взаимосвязь, $p < 0,05$).

Обращает на себя внимание тот факт, что взаимосвязь между ИНД и работоспособностью, а также МПК, носит отрицательный характер. Другими словами можно сказать, что повышенная функциональная активность ГАС сопровождается меньшим уровнем аэробных возможностей и низкой работоспособностью. Это мнимое противоречие может быть разрешено следующим образом. Можно предположить, что в условиях кислородной недостаточности, вызванной мышечными усилиями, дополнительное стимулирование организма к кислородным тратам (ГАС активизирует обменные процессы, стимулирует деятельность сердечно-сосудистой и дыхательной систем) может оказаться менее эффективной стратегией. Таким образом, чем ближе величина ИНД к единице (т. е. к оптимуму), тем выше работоспособность. При этом следует особо подчеркнуть, что данное заключение можно сделать только в связи с прогнозом по отношению к физической нагрузке определенной интенсивности, а именно — соответствующей уровню школьной нагрузки на уроках физкультуры. В отношении нагрузок максимальной и субмаксимальной мощности необходимо проводить специальные исследования.

Однако это заключение не является абсолютно однозначным. В исследованной нами выборке значения ИНД меньше единицы встречались крайне редко, поэтому мы не имеем возможности достоверно сделать прогноз в отношении таких детей. Весьма вероятно, что организм с недостаточно активной или угнетенной гипофиз-адреналовой системой не сможет проявить высокую работоспособность так же как и организм с высокоактивированной гипофиз-адреналовой системой, хотя и по другим причинам (недостаточно активная регуляция процессов получения АТФ). Поэтому представляется, что наиболее оптимальные прогностические значения ИНД для работы умеренной мощности лежат в районе единицы или, если быть особенно точным, в пределах, близких к единице. На аналогичную оптимальность в своих работах указывают и некоторые авторы [3, 4].

Таблица 2

Методические рекомендации как практический результат проведенной работы

Пол	Возраст, годы	Методическое «время», определения «индекса резистентности»	Диапазон ориентировочных значений «индекса резистентности», средняя±сигма (диапазон: ± две сигмы от средней)*
Мальчики	7	3,5 минуты	1,09±0,06 (0,97–1,21)
Девочки	7	4 минуты	1,07±0,13 (0,81–1,33)
Мальчики	9	3,5 минуты	1,14±0,10 (0,84–1,34)
Девочки	9	4 минуты	1,12±0,10 (0,82–1,32)
Мальчики	15	0,5 минуты	1,09±0,08 (0,93–1,25)
Девочки	15	4,5 минуты	1,05±0,10 (0,85–1,25)

Примечание: * — значения ИНД, выходящие за указанные пределы, предполагают применение индивидуального подхода к учащимся на уроках физической культуры.

Таким образом, методические рекомендации, вытекающие из результатов работы, сводятся к следующему. Для определения величины ИНД требуется дифференцированный подход в зависимости от возраста и пола (табл. 2). Диапазоны ориентировочных значений ИНД получены путем вычитания-прибавления двойной величины стандартного отклонения (две сигмы) к средней арифметической величине, установленной для указанного времени обследования. Такой математический подход использует большинство гигиенических рекомендаций [8].

REFERENCES

1. Vasil'ev A. G., Khaitsev N. V., eds, Trashkov A. P. Praktikum po patofiziologii: uchebnoe posobie. SPb: FOLIANT; 2014. (in Russian).
2. Vasil'ev G.A., Beljaev V.A., Tiunov L.A. K vopposu ob ocenke padiochuvstvitel'nosti belyh kpys. Radiobiologija. 1966; 4 (5): 687–689. (in Russian).
3. Vasil'ev G.A., Medvedev Ju.A., Hmel'nickij O.K. Jendokpinnaja sistema pri kislopodnom golodanii. L.: Nauka; 1974. (in Russian).
4. Grigor'ev A. Ju. Individual'naja radiochuvstvitel'nost'. M.: Jenepgoatomizdat; 1991. (in Russian).
5. Egorov V. Ja., Mel'nikova I. E. Metodicheskie rekomendacii k provedeniju prakticheskih rabot po fiziologii sporta. SPb.: LGOU; 1997. (in Russian).
6. Egorov V. Ja., Mel'nikova I. E. Anatomija i fiziologija detej i podrostkov: Metodicheskie rekomendacii k laboratornym rabotam. SPb.: LGOU; 1999. (in Russian).
7. Kustov V. V., Litau V. G., Kukushkin Ju. A., Razinkin S. M. Ocenka adaptacii zhivotnyh k gipoksicheskoj gipoksii s pomoshh'ju metoda mnozhestvennoj pegpessii. Kosmich. biol. aviakosmich. med. 1984; 18 (6): 67–69. (in Russian).
8. Popov S. V., Egorov V. Ja., Gunn G. E. Kul'tura zdorov'ja: uchebno-metodicheskoe posobie. SPb.: LOIRO; 2003. (in Russian).
9. Khaitsev N. V. Rol' vozrastnyh, polovyh i individual'nyh osobennostej organizma v ustojchivosti k gipoksii. Zhurn. jevoljuc. biohim. i fiziol. 1998; 34 (6): 734–736. (in Russian).
10. Khaitsev N. V., Vasil'ev A. G., Trashkov A. P., Kravcova A. A., Balashov L. D. Vlijanie vozrasta i pola na harakter otvetnyh reakcij belyh krys pri dejstvii hronicheskoj gipoksicheskoj gipoksii. Pediatr. 2015; 6 (2): 71–77. (in Russian).
11. Churilov L. P., Vasil'ev A. G. Patofiziologija immunnoj sistemy: uchebnoe posobie. SPb: FOLIANT; 2014. (in Russian).
12. Astrand P. Degree of strain during building work as related to individual aerobic work capacity. Ergonomics. 1967; 10 (3): 295–300.
13. Astrand P., Rodahl K. Textebook of work physiology: Physiological bases of exercise. New York – St. Louis: McGraw-Hill; 1977.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев А. Г., Хайцев Н. В., Трашков А. П. Практикум по патофизиологии: учебное пособие. СПб: ФОЛИАНТ; 2014.
2. Васильев Г. А., Беляев В. А., Тиунов Л. А. К вопросу об оценке радиочувствительности белых крыс. Радиобиология. 1966; 4 (5): 687–689.
3. Васильев Г. А., Медведев Ю. А., Хмельницкий О. К. Эндокринная система при кислородном голодании. Л.: Наука; 1974.
4. Григорьев А. Ю. Индивидуальная радиочувствительность. М.: Энергоатомиздат; 1991.
5. Егоров В. Я., Мельникова И. Е. Методические рекомендации к проведению практических работ по физиологии спорта. СПб.: ЛГОУ; 1997.
6. Егоров В. Я., Мельникова И. Е. Анатомия и физиология детей и подростков: Методические рекомендации к лабораторным работам. СПб.: ЛГОУ; 1999.
7. Кустов В. В., Литау В. Г., Кукушкин Ю. А., Разинкин С. М. Оценка адаптации животных к гипоксической гипоксии с помощью метода множественной регрессии. Космич. биол. авиакосмич. мед. 1984; 18 (6): 67–69.
8. Попов С. В., Егоров В. Я., Гунн Г. Е. Культура здоровья: учебно-методическое пособие. СПб.: ЛОИРО; 2003.
9. Хайцев Н. В. Роль возрастных, половых и индивидуальных особенностей организма в устойчивости к гипоксии. Журн. эволюц. биохим. и физиол. 1998; 34 (6): 734–736.
10. Хайцев Н. В., Васильев А. Г., Трашков А. П., Кравцова А. А., Балашов Л. Д. Влияние возраста и пола на характер ответных реакций белых крыс при действии хронической гипоксической гипоксии. Педиатр. 2015; 6 (2): 71–77.
11. Чурилов Л.П., Васильев А.Г. Патофизиология иммунной системы. СПб.: Фолиант, 2014.
12. Astrand P. Degree of strain during building work as related to individual aerobic work capacity. Ergonomics. 1967; 10 (3): 295–300.
13. Astrand P., Rodahl K. Textebook of work physiology: Physiological bases of exercise. New York – St. Louis: McGraw-Hill; 1977.

УДК 612.3

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ВСАСЫВАНИЯ В КИШЕЧНОЙ ВОРСИНКЕ

© Наталья Рафаиловна Карелина[1], Иван Добромирович Димов[1], Кирилл Игоревич Пелих[1], Галина Владимировна Безнусенко[2], Ирина Сергеевна Сесорова[3], Александр Александрович Миронов[2]

[1] Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2
[2] Институт молекулярной онкологии, лаборатория электронной микроскопии, Италия, 20139, Милан, Виа Адамелло, д. 16
[3] Ивановская государственная медицинская академия, 153012, г. Иваново, Ивановская обл., Шереметевский пр., д. 8

Контактная информация: Карелина Наталья Рафаиловна — д.м.н., зав. кафедрой анатомии человека Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета. E-mail: karelina_nr@gpma.ru

РЕЗЮМЕ: Одной из главных проблем функциональной анатомии является разработка ряда вопросов, позволяющих прогнозировать возможные нарушения функциональных показателей ткани в условиях нагрузки. В особенности это значимо для понимания становления таких жизненно важных функций, как всасывание питательных веществ. Несмотря на огромное число опубликованных результатов изучения кишечной ворсинки, имеющиеся данные во многом носят отрывочных характер и лишены комплексного подхода. В данной работе впервые изучена гистофизиология всасывания в кишечной ворсинке, как модели взаимодействия кровеносных и лимфатических микрососудов, непосредственно связанных с трансэпителиальным и интерстициальным обменом. Показано, что в процессе постнатального онтогенеза лимфатические капилляры ворсинки перестают играть роль главной дренажной системы и начинает формироваться градиент онкотического давления, лежащий в основе механизма гемато-интерстициально-лимфатического транспорта кишечной ворсинки у взрослых животных. Таким образом, исследования структурно-функциональных основ всасывания в указанном аспекте приобретают общебиологический и фундаментальный характер.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кишечная ворсинка; интерстициональное пространство; гематолимфатический перенос; лимфатические и кровеносные микрососуды.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL BASIS OF ABSORPTION IN AN INTESTINAL VILLUS

© Natalia R. Karelina, Ivan D. Dimov, K.I. Pelih, G.V. Beznusenko, I.S. Sesorova, A.A. Mironov

[1] Saint Petersburg State Pediatric Medical University, 2 Litovskaya st., Saint Petersburg, 194100, Russia
[2] Institute of Molecular Oncology, Electron Microscopy Lab, 16 Via Adamello, Milano, 20139, Italy
[3] Ivanovo State Medical Academy, 8 Sheremetevskij prospekt, Ivanovo, Ivanovo Oblast, 153012, Russia

Contact information: Natalia R. Karelina — doctor of medicine, head of the Dept. of Human Anatomy of the Saint Petersburg State Pediatric Medical University. E-mail: karelina_nr@gpma.ru

ABSTRACT: Predicting possible disturbances of functional parameters of tissue under strain is one of the major goals of functional anatomy. It is of particular interest for comprehension of vital functions' development like absorption of nutrients in the intestine. In spite of multitudinous publications describing results of morphological studies of intestinal villus, these data are mostly fragmentary and lack complex approach. The present pioneer work is devoted to histophysiology of absorption in the intestinal villus as a model of interaction of blood microvessels with lymphatic ones, all of them intimately associated with transepitelial and interstitial metabolism. Lymphatic capillaries of the intestinal villus have been demonstrated during postnatal ontogenesis to stop olaying the part of main drainage system exchanging it for forming the oncotic pressure gradient which determines hemato-interstitial-lymphatic transport of intestinal villus in adult animals. Thus, studying structural and functional basis of intestinal absorption in the aforementioned aspect is of general biological and fundamental interest.

KEYWORDS: intestinal villus; interstitial space; hematolymphatic transfer; lymphatic and blood microvessels.



Рис. 1. Лимфатические микрососуды (↑↑) и их анастомозы (↑) кишечной ворсинки. Тощая кишка взрослой крысы. Инъекция массы Герота. Об.*20, Ок.*12,5

Традиционно считается, что в кишечной ворсинке человека и животных располагается одиночный лимфатический микрососуд — млечный синус [5, 32, 25, 16]. Применение в работе метода серийных полутонких срезов и прижизненной интерстициальной инъекции дало нам возможность убедительно показать, что в ворсинке тощей кишки взрослой белой крысы находится несколько лимфатических капилляров, нередко соединенных между собой анастомозами. Полученные нами данные согласуются с результатами А.В. Борисова (1956), А. Кахарова (1963) и Р.Н. Шахмурадяна (1973) (рис. 1).

Уровень расположения начальных замкнутых отделов лимфатических капилляров преимущественно соответствует верхней и средней части ворсинки, в основании же локализуются дистальные отделы всех ее лимфатических микрососудов. Проведенные нами измерения показывают, что, по мере увеличения ширины ворсинки от верхушки к основанию, в расширенных отделах стромы начинают появляться на более низких уровнях новые лимфатические капилляры. Их начальные отделы находятся на таком же расстоянии от эпителия, как и у начинающихся выше лимфатических капилляров. Таким образом, можно считать, что расстояние от боковой стороны ворсинки (так называемого «ребра») до стенки ближайшего лимфатического капилляра практически является постоянной величиной на всех ее уровнях и может рассматриваться как параметр, лимитирующий число этих микрососудов (рис. 2).

Принимая во внимание эти особенности топографии лимфатических капилляров, можно было бы предположить, что максимальная лимфатическая резорбция идет в нижних отделах ворсинки. Но оказалось, что события развиваются иначе. Существует достаточно обоснованное положение о том, что наиболее активное всасывание жидкости и липидов из просвета кишки происходит в верхней части ворсинки [30, 4]. Соответственно, эвакуация жидкости и всосавшихся нутриентов в первую очередь будет осуществляться из верхних отделов интерстициального пространства. Во время всасывания вода будет частично реабсорбироваться кровеносными микрососудами, а хиломикроны, представляющие собой крупные частицы, могут транспортироваться единственно возможным у взрослых животных путем — лимфатическими капиллярами [21]. Таким образом, именно начальные отделы лимфатических капилляров характеризуются наибольшими резорбционными возможностями при пищевой нагрузке. Это положение подтверждается проведенным нами ультраструктурным анализом строения лимфатических капилляров ворсинки при разной функциональной нагрузке.

J.R. Casley–Smith (1983) рассматривает кишечную ворсинку как структуру с такой высокой обменной активностью тканей, которая предполагает наличие открытых межэндотелиальных соединений в лимфатических капиллярах. На основании проведенных расчетов S.Elhay и J.R. Casley–Smith (1976) показали, что если открыты 1–2% всех межклеточных соединений, то этого совершенно достаточно для заполнения просвета лимфатических микрососудов в начальной фазе резорбции. W.O. Dobbins и E.L. Rollins (1970) считают открытыми около 2% всех контактов в лимфатических капиллярах кишечной ворсинки. По нашим данным, в состоянии относительного покоя тонкой кишки, такие контакты отсутствуют, а пищевая нагрузка стимулирует появление 7% открытых межклеточных щелей в эндотелии. Одновременно показано, что

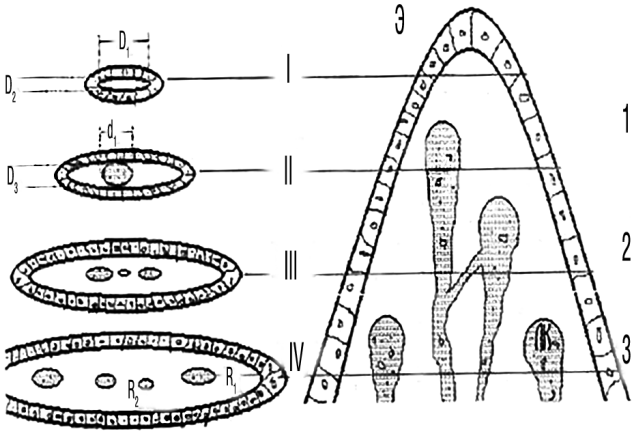


Рис. 2. Схема продольного и поперечного сечения ворсинки тощей взрослой крысы: 1 — верхний отдел ворсинки; 2 — средний отдел ворсинки; 3 — основание ворсинки (нижний отдел); $Д_1$ — продольный размер стромы на поперечном сечении ворсинки; $Д_2$ — передне-задний размер стромы; d_1— продольный размер лимфатического капилляра; d_2 — переднее-задний размер лимфатического капилляра; R_1 — расстояние между лимфатическим капилляром и базальной мембраной эпителия поверхности ("ребра") ворсинки; R_2 — расстояние между лимфатическим капилляром и базальной мембраной эпителия краниальной (каудальной) поверхности ворсинки; I, II, III, IV — соответственно уровни срезов ворсинки в области ее верхушки, верхнего, среднего и основания

открытые контакты неравномерно распределяются по высоте микрососуда: их число постепенно уменьшается по направлению к основанию ворсинки и в базальной части лимфатических капилляров открытые щели выявляются редко.

Показанные нами сложные контактные зоны в лимфатическом эндотелии представляют собой пространства, сформированные несколькими отростками смежных эндотелиоцитов (рис. 3) и ограниченные с обеих сторон плотными контактами. Наличие в этих пространствах хиломикронов и продукта реакции пероксидазы указывает на непосредственную связь с интерстициальными промежутками. Вероятно, такие контактные зоны являются попавшими в срез фрагментами «интраэндотелиальных» каналов, существование которых доказано J. Collan, T.V. Kalima (1974) и G. Azzali (1930–1982) при реконструкции серийных ультратонких срезов (рис. 4).

Перенос макромолекул в лимфатическое русло осуществляется не только через открытые межклеточные щели: в этом процессе участвуют также плотные контакты и соединения адгезионного типа. Наши данные указывают на то, что контактный комплекс плотных соединений в лимфатических капиллярах, как и в кровеносных, обладает пропускной способностью для белков средней молекулярной массы. Продукт пероксидазной реакции отчетливо выявляется по всей длине межклеточной щели, как до плотного контакта, так и после него, и, соответственно, в просвете лимфатического капилляра. Учитывая небольшую концентрацию пероксидазы в интерстициальном пространстве и лимфе, следует исключить возвратное проникновение продукта реакции из просвета микрососуда в контактную щель.

Эндотелиальные клетки лимфатических капилляров различных органов обладают развитой клеточной подвижностью [7]. Показанные нами элементы цитоскелета в эндотелиоцитах, и в частности, хорошо выраженные пучки микрофиламентов, образующие иногда волокна натяжения, свидетельствуют о динамическом характере организации лимфатического эндотелия кишечной ворсинки.

Данные иммуноэлектронномикроскопического анализа со всей очевидностью показывают, что в околоконтактных областях цитоплазмы эндотелиоцитов сконцентрированы актиновые филаменты, по–видимому, участвующие в регуляции проницаемости межклеточных стыков корней лимфатической системы в кишечной ворсинке. Актин обнаружен и в других участках цитоплазмы, однако в гораздо меньшем количестве. Все это позволяет ставить вопрос о том, что конвективный перенос между интерстицием и просветом лимфатического капилляра является активно регулируемым процессом, требующим затрат энергии.

Во время всасывания происходит активное сокращение эндотелиоцитов, что ведет к увеличению просвета лимфатических капилляров (рис. 5) и соответственно вызывает трансформацию каналов резорбции. Мы допускаем, что сокращение эндотелиоцитов определяет появление открытых межклеточных щелей, которые практически отсутствуют в состоянии относительного покоя (голода).

Представляет определенный интерес механизм регуляции трансэндотелиального переноса веществ в лимфатических микрососудах, связанный с «работой» стропных, или якорных, филаментов [10, 11, 9, 29, 16, 15]. Во время всасывания жидкости из просвета кишки значительно гидратируется интерстиций ворсинки. Наши эксперименты в определенной степени это доказывают. Объем стромы вследствие набухания интерстициального матрикса существенно увеличивается, что влечет за собой натяжение стропных филаментов, связывающих эндотелий лимфатических капилляров со структурами соединительнотканного окружения [28]. (Kalima T.V., 1971). Натяжение филаментов вызывает не только расширение лимфатического микрососуда, но и может изменять проходимость межклеточных соединений [29, 15]. Можно предположить, что «резервны-



Рис. 3. Межклеточное соединение в эндотелии лимфатического капилляра в виде интердигитации. Выросты одного эндотелиоцита заходят в соответствующие углубления другого. Виден плотный контакт (↑↑) между плазмолеммами клеток. ПЭМ. Ув.: 12000

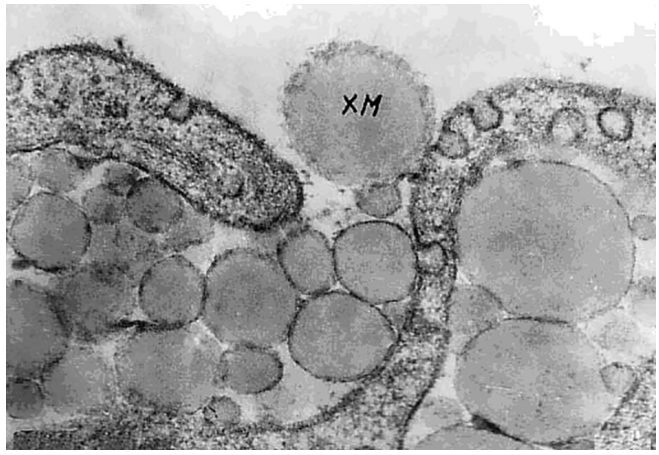


Рис. 4. Открытый межклеточный контакт между эндотелиоцитами лимфатического капилляра кишечной ворсинки, заполненный хиломикронами, транспортирующимися из окружающего интерстиция в просвет лимфатика. Тощая кишка взрослой крысы. ПЭМ. Ув.: 21000



Рис. 5. Поперечный срез нижнего отдела кишечной ворсинки. Видны два профиля (↑) лимфатических капилляров в ее строме. Тощая кишка взрослой крысы. Серийный полутонкий срез. Окраска толуидиновым голубым. Об.*20, Ок.*12,5

ми» соединениями для образования открытых контактов являются соединения адгезионного типа, постоянно выявляемые независимо от функциональной нагрузки органа.

С везикулярным аппаратом эндотелиоцитов (рис. 6) связан диссипативный перенос макромолекул в просвет лимфатических капилляров, в эндотелиоцитах которых определяется значительно больше плазмолеммальных везикул, чем в эндотелии фенестрированных капилляров ворсинки. Такие авторитетные исследователи как В.А. Шахламов и А.П. Цамерян (1982), G. Ottaviani и G. Azzali (1969), W.O. Dobbins и E.L. Rollins (1970) полагают, что везикулярный транспорт является основным при резорбции интерстициального содержимого в лимфатическое русло (рис. 7). Следует иметь в виду, что механизмы лимфообразования непосредственно связаны с колебаниями гидростатического [1, 37]. или коллоидно-осмотического [13,15] давлений. По данным C.C.O'Morchoe с соавторами (1982), везикулярный аппарат может переорганизовываться при изменении уровня гидратации тканей.

Таким образом, усиление процесса лимфообразования во время активного всасывания идет не только за счет ускорения конвективного переноса, но и за счет некоторой стимуляции везикулярного транспорта, однако трудно найти конкретные свидетельства этой стимуляции.

При обсуждении организации везикулярного аппарата лимфатического эндотелия можно провести аналогию с теми положениями, которые предполагают варианты существования одиночных и кластерных форм везикул в эндотелии кровеносных микрососудов [13, 22, 14].

Большая часть профилей везикул, кажущихся дискретными в цитоплазме эндотелиоцитов лимфатических капилляров, оказываются связанными с внеклеточным пространством и, таким образом, представляют собой фрагменты плазмолеммальных инвагинаций [27]. В нашем исследовании получены данные, указывающие не только на участие везикул в транспорте белков, но и пути прямого перехода липидов (в форме хиломикронов). Все стадии переноса хиломикронов, характерные для «квантовой» модели G.R. Palade (1963), прослежены нами при помощи ультраструктурного анализа. Проникновение макромолекул в плазмолеммальные инвагинации может осуществляться путем диффузии, но заполнение замкнутых кластеров хиломикронами — достаточно крупными частицами — маловероятно. Эти наблюдения позволяют нам считать, что определенная часть плазмолеммальных везикул «работает» в качестве одиночных переносчиков белка и липидов. Отсюда следует, что в настоящее время еще нет достаточных оснований для исключения роли одиночных плазмолеммальных везикул в осуществлении процессов транспорта через эндотелий лимфатических капилляров.



Рис. 6. Плазмолеммальные везикулы в эндотелии лимфатического капилляра кишечной ворсинки. Видны базальные везикулы, содержащие хиломикроны (↑↑), цитоплазматические (*) и люминальные (↑). Тощая кишка взрослой белой крысы. ПЭМ. Ув.: 21000

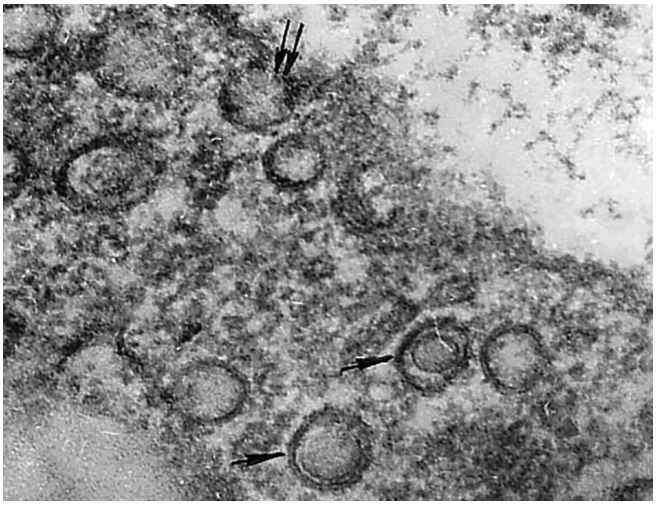


Рис. 7. Фрагмент эндотелиоцита лимфатического капилляра кишечной ворсинки. Видны дискретные цитоплазматические везикулы (↑), содержащие хиломикроны, люминальные везикулы (↑↑), выгружающие своё содержимое в просвет лимфатика. Тощая кишка взрослой крысы. ПЭМ. Ув.: 30000

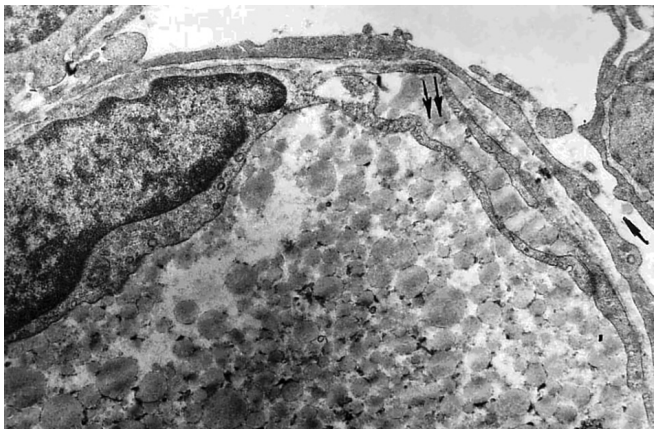


Рис. 8. Лимфатический капилляр, заполненный хиломикронами, в ворсинке тощей кишки взрослой крысы во время пищевой нагрузки. В сложной контактной зоне (↑↑) между отростками эндотелиоцитов видны хиломикроны. В окружающем лимфатик интерстициальном пространстве (↑) количество хиломикронов незначительно. ПЭМ. Ув.: 3000

Существование базальной мембраны в лимфатических капиллярах ворсинки обсуждается достаточно давно и взгляды авторов далеко не однозначны [5,10, 11, 35, 23, 14]. Наши данные свидетельствуют об отсутствии базальной мембраны практически на всем протяжении лимфатических капилляров ворсинки, что облегчает гематолимфатический перенос и резорбцию значительного количества хиломикронов во время активного всасывания из просвета кишки (рис. 8). Базальная мембрана может появляться в виде фрагментарных участков лишь в самых базальных отделах лимфатических микрососудов ворсинки перед впадением их в криптальное сплетение.

Анализируя полученные нами результаты, мы пришли к заключению, что существующие гистотопографические особенности лимфатических капилляров ворсинки определяют их интенсивную резорбтивную деятельность. Если в верхних и средних отделах ворсинки существенное значение для организации транспорта имеют пространственные взаимоотношения между эпителием и лимфатическими капиллярами, то в нижних — между ними и посткапиллярными венулами. Мы уверены, что в данном расположении этих микрососудов заложен определенный смысл, исключающий элемент случайности.

Наличие достаточно большого количества межклеточных контактов, доступных для белка, в венулярном эндотелии предполагает высокое содержание протеинов около венул в интерстициальном пространстве, несмотря на практически полное отсутствие фенестр. Расположенные в зоне выхода протеинов лимфатические капилляры резорбируют их и, таким образом, участвуют в регуляции интерстициальной концентрации плазменных белков [2]. Мы полагаем, что в нижней трети ворсинки венулы и лимфатических капилляров формируют своеобразный комплекс микрососудов, выносящих из ворсинки воду, белки и липиды. Таким образом, процессы всасывания нутриентов и жидкости в ворсинке приводят не только к активации транспорта белка через эндотелий кровеносных сосудов, но и стимулируют лимфообразование. Поступление больших объемов жидкости из полости кишки сопровождается заметным перераспределением содержания протеинов в интерстициальном пространстве и изменением его объемных параметров.

По мнению D.N. Granger с соавторами (1985), фильтрация из капилляров ворсинки происходит в состоянии голода или «покоя». Это связано также с тем, что расслабление прекапиллярных сфинктеров в микрососудах слизистой оболочки тонкой кишки ведет к увеличению гидростатического давления в капилляре, в результате чего усиливается фильтрация из капилляра.

D.N. Granger (1985) считает, что в состоянии покоя значения гидростатического и коллоидно-осмотического давлений в просвете капиллярных микрососудов и в ткани обеспечивает умеренную фильтрацию жидкости из плазмы в интерстициальное пространство. Результирующий поток из плазмы уравновешивается некоторым базовым уровнем лимфотока: при такой ситуации «чистый» объем жидкости, который транспортируется через кишечный эпителий, равен нулю. Иными словами, всасывание практически отсутствует и объем интерстициального пространства ворсинки остается постоянным.

Активная абсорбция — баланс сил приводит к более, чем двукратному увеличению потока лимфы, причем часть интерстициальной жидкости и макромолекулы резорбируются также и в просвет кровеносных капилляров (рис. 9, 10). Происходит увеличение массы белка в оттекающей лимфе, что свидетельствует об его усиленном поступлении в интерстиций. Однако коллоидно-осмотическое давление в интерстициальной жидкости уменьшается по сравнению с состоянием покоя на 2 мм рт.ст., а интерстициальное гидростатическое давление, наоборот, увеличивается на 2 мм рт. ст. Таким образом, эффективная разница значений интерстициальных давлений по абсолютной величине меньше, чем в состоянии покоя. Каким же образом уменьшение влекущего давления сочетается с интенсивным всасыванием жидкости через эпителиальную мембрану?

Показано, что содержание белка в узких прослойках соединительной ткани непосредственно под базальной мембраной эпителия больше, чем в центральных отделах стромы. Это объясняется тем, что, во–первых, густая капиллярная сеть ворсинки расположена непосредственно под эпителием (рис. 11) и, во–вторых, существует «поляризация» эндотелия капилляров — фенестры (рис. 12) и зоны межклеточных контактов обращены к базальной мембране эпителия. Однако, вклад фенестр в перенос протеинов оценить пока трудно; возможно, более важную роль играют короткие трансэндотелиальные каналы и доступные для белка «протекающие» межклеточные контакты, то есть конвективные пути транспорта. Эффективность конвективных путей особенно важна при пищевой нагрузке, когда заметно возрастает коэффициент фильтрации, а следовательно, и поток жидкости, переносящий белок в интерстиций.

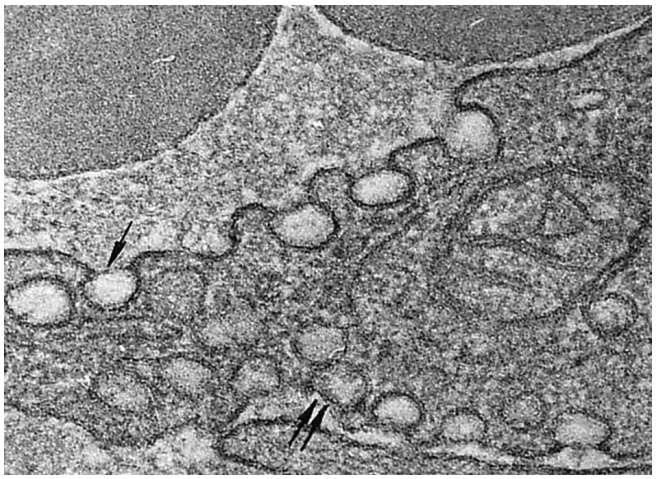


Рис. 9. Диафрагмированные плазмолеммальные везикулы на люминальной (↑) и базальной (↑↑) поверхностях эндотелиоцита кровеносного капилляра кишечной ворсинки. Тощая кишка взрослой крысы. ПЭМ. Ув.: 24000

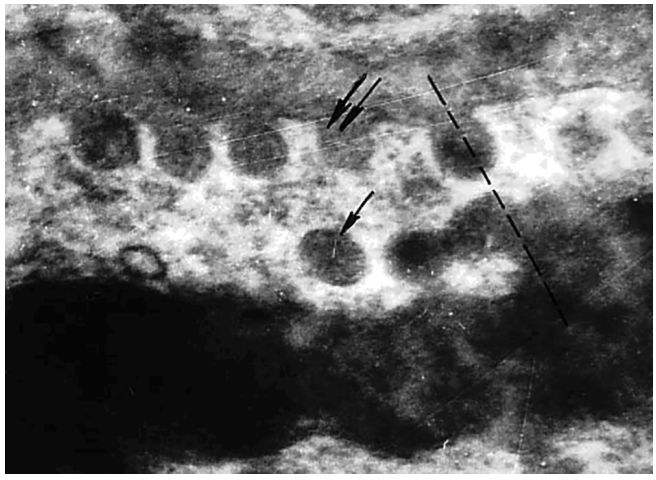


Рис. 10. Перенос растительной пероксидазы плазмолеммальными везикулами через эндотелий кровеносного капилляра кишечной ворсинки цитоплазматические (↑) и базальные (↑↑) везикулы интенсивно «помечены» продуктом пероксидазной реакции. Тощая кишка взрослой крысы. ПЭМ. Ув.: 18000

В состоянии покоя концентрации белка в нижней и верхней половинах интерстиция ворсинки примерно одинаковы: базально–апикальное отношение составляет 1,14. При кормлении — через 2 часа — уже 1,44, причем, в основном, за счет усиленного транспорта белка в базальные отделы.

Интенсификация процесса пищеварения приводит к усиленному транспорту белка в первую очередь в большей части капилляров, а лишь затем — в микрососудах основания ворсинки.

Этот усиленный транспорт протеинов сопровождается интенсивным всасыванием жидкости из полости кишки и, прежде всего, в апикальные отделы ворсинки [6].

Сочетанный эффект фильтрации жидкости из капилляров и ее поступление из полости кишки приводит к гидратации интерстициального пространства и к возрастанию гидростатического давления. Абсолютные размеры межклеточного матрикса у взрослых крыс при этом увеличиваются более, чем в два раза.

Способность к расширению интерстициального пространства при гидратации, то есть его податливость выражена в различных участках стромы неодинаково: наиболее резистентно узкое субэпителиальное пространство. Большие концентрации белка в субэпителиальной зоне являются одним из важнейших факторов, поддерживающих всасывание жидкости из полости кишки (рис.13). Одновременно такая малая податливость субэпителиальных зон позволяет более эффективно «передавать» фильтрующуюся и всасывающуюся жидкость в центральные участки, способствуя возрастанию в них гидростатического давления.

Именно здесь, в верхних и средних отделах ворсинки у взрослых крыс, гидростатическое давление стимулирует процесс лимфатической резорбции.

Перед обсуждением особенностей транспортных процессов у новорожденных крысят во время кормления необходимо суммировать выявленные нами структурные отличия ворсинок новорожденных и взрослых крыс.

У новорожденных ворсинки имеют пальцевидную, вытянутую форму. У взрослых крыс — уплощенные, листовидные. Соотношение фактора формы по высоте ворсинки у новорожденных — 1 : 1 : 1 : 1,3, а у взрослых — 1 : 2 : 3,2 : 4,5. Далее,

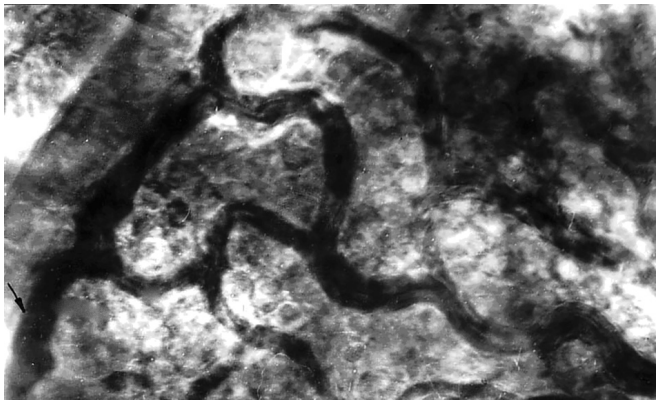


Рис. 11. Подэпителиальное расположение маргинального капилляра (↑) в микрососудистой сети кишечной ворсинки. Тощая кишка взрослой крысы. Биомикрофото. Об.*25, Ок.*12,5

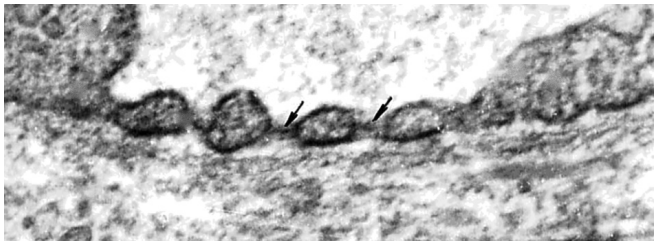


Рис. 12. Фенестры (↑) в стенке маргинального капилляра кишечной ворсинки. Тощая кишка взрослой крысы. ПЭМ. Ув.: 42000

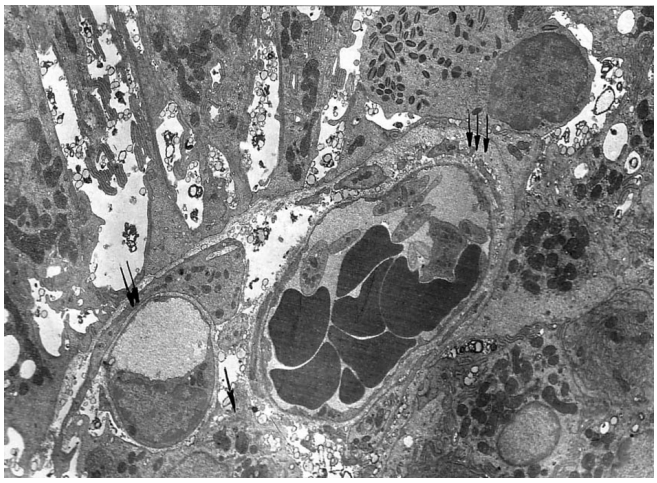


Рис. 13. Поперечный срез ворсинки тощей кишки взрослой крысы. Видно интерстициальное пространство ворсинки на периферии стромы около маргинальных (↑↑↑) и подэпителиальных капилляров (↑↑) и в её центральной части (↑). ПЭМ. Ув.: 1500

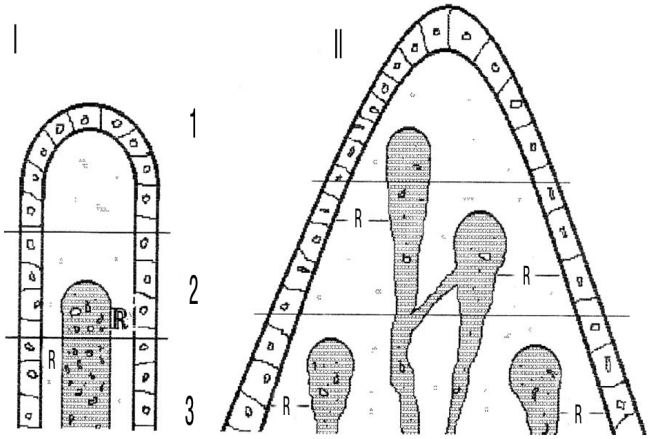


Рис. 14. Форма и топография лимфатических микрососудов в ворсинке тощей кишки у новорожденных (I) и взрослых (II) крыс

уровень расположения лимфатических капилляров у новорожденных существенно ниже, чем у взрослых, У новорожденных лимфатические капилляры едва заходят в среднюю треть ворсинки, у взрослых — определяются и в верхней трети (рис. 14).

У новорожденных в каждой ворсинке находится один лимфатический капилляр, у взрослых крыс определяется множественная лимфатическая конструкция. У новорожденных расстояние до боковой поверхности ворсинок (до «ребер»), так же постоянно по высоте лимфатического капилляра, но меньше, чем у взрослых крыс в 5 раз. У новорожденных во время кормления (при активном всасывании) площадь профиля лимфатического капилляра в основании ворсинки в 4 раза больше, чем у взрослых животных.

Напомним, что у взрослых крыс абсолютные размеры интерестициального пространства во время всасывания увеличиваются более, чем в 2 раза, У новорожденных крысят после первого кормления абсолютная площадь интерстициальных щелей достоверно увеличивается по сравнению с этим параметром у некормленных новорожденных следующим образом: в области верхушки ворсинки — в 5,7 раза, в верхнем отделе — в 3, в среднем — в 2,3, в нижнем — в 4 раза, при этом наибольшие абсолютные размеры интерстициального пространства (ИП) определяются в среднем и нижнем отделах кишечной ворсинки. Соотношение абсолютных величин площадей интерстициального пространства по высоте ворсинки новорожденного — (за 1 принята площадь ИП в области верхушки)– 1 : 2,4 : 2,9 : 1,6.

Таким образом, пытаясь проанализировать последовательность событий при всасывании у новорожденных крысят, нужно учитывать следующее: во–первых, отличия в микроанатомии ворсинки у новорожденной и взрослой крысы; во–вторых, характер поступающей пищи и временную организацию этого процесса. Молоко (а это не что иное, как жидкость, белки и липиды) поступает в кишку практически беспрерывно, и беспрепятственно проходит через эпителиальный барьер в строму ворсинки; в–третьих, значительная податливость ИП, равномерная по всей высоте ворсинки новорожденного, может определять состояние жидкостного баланса при всасывании в этом периоде постнатального онтогенеза.

У голодных новорожденных в кишечной ворсинке происходят преимущественно процессы фильтрации, что подтверждается экспериментами с введением растительной пероксидазы. Большая проницаемость капилляров (меньше контактных фибрилл в плотных контактах эндотелия, может быть, особенности строения диафрагм фенестр и т.д.) определяет и выход белка одинаковый по всей высоте ворсинки. У голодных новорожденных это может иметь принципиальное значение для всасывания жидкости.

При пищевой нагрузке кровеносные капилляры становятся резорбирующими, при этом абсолютная площадь, занимаемая кровеносными капиллярами в строме ворсинки, достоверно увеличивается в 2,6 раза («рабочая гиперемия»). Значительное поступление жидкости из просвета кишки приводит к гидратации ИП и соответственно к повышению гидростатического давления по всей высоте ворсинки. При таких условиях поступление плазменных белков в ИП не будет иметь существенного значения, так как они будут слишком «размешаны» и не создадут должной концентрации, тем более, что у новорожденных крысят коллоидно-осмотическое давление плазмы крови 5,3 мм рт.ст., что в 4 раза меньше, чем у взрослых животных.

Таким образом, отсутствие градиента распределения белка в ИП можно объяснить двояко: или кровеносные капилляры новорожденных вообще непроницаемы для макромолекул, что не соответствует нашим данным; либо все кровеносные капилляры еще проницаемы в этом периоде постнатальной жизни и тогда, хоть и небольшая, но имеющаяся в ИП концентрация белка будет равномерной. Последнее соответствует истинному положению вещей, и, таким обра-

зом, можно предположить, что в ворсинке новорожденного отсутствует «фактор онкотического насоса».

По нашим данным, процентное содержание всосавшихся липидов в интерстициальном пространстве распределяется следующим образом: на верхушке ворсинки — 63,7%, в верхнем отделе — 47,61%, в среднем отделе — 55% и в нижнем — 47%, то есть отмечается тенденция к максимальному содержанию липидов в области верхушки. По высоте ворсинки разница статистически недостоверна. Следует отметить, что только в этом периоде постнатального онтогенеза выявляется такое значительное содержание липидов; у крысят в возрасте 7 дней этот процент снижается на всех уровнях ворсинки.

Что же является основным в регуляции всасывания жидкости и нутриентов из ИП ворсинки у новорожденных? На этом этапе онтогенеза активно дренирующими структурами являются не только лимфатические капилляры, но и кровеносные капилляры ворсинки.

Высокое гидростатическое давление, увеличенный абсолютный размер интерстициального пространства, существенно значимое количество липидов в нем, низкое расположение лимфатических капилляров предопределяют транспорт липидов не только традиционным путем в лимфатические капилляры, но и в кровеносные капилляры верхнего и среднего отделов ворсинки.

Колоссальная нагрузка в этом периоде онтогенеза на сосудистую систему кишечной ворсинки, интенсивный конвективный перенос макромолекул через фенестры и межклеточные контакты капилляров, требуют определенной физиологической «страховки». Защитным механизмом может быть так называемый противоточный обмен. Гипотеза O. Lundgreen (1967–1982) была подтверждена им в экспериментах на пальцевидных ворсинках тонкой кишки кошек. Часть исследователей отвергла идею противоточного обмена на основании того, что ворсинки кошки — не типичные, в подавляющем большинстве случаев у разных видов животных и человека ворсинки языковидные, листовидные и гребневидные (рис. 15). Но никто не обратил внимания на то, что в раннем постнатальном онтогенезе пальцевидные ворсинки являются типичными для всех млекопитающих и эта вытянутая форма определяет пространственную ориентацию микрососудов в строме (рис. 16).

У крыс выявлена гиперосмотичность in vivo в верхней части ворсинок, которая поддерживается за счет активного механизма «противоточного умножителя–обменника», действующего аналогично таковому в почечных канальцах [26]; pH увеличивается от верхушки ворсинки к основанию, то есть по ее продольной оси, что связано с секрецией H+ зрелыми энтероцитами [17].

Верхушка пальцевидной ворсинки новорожденного — место, где может происходить быстрый противоточный обмен жирорастворимых веществ при условии близкого расположения капилляров и артериолы. На верхушке ворсинки возникает гиперосмолярность (отношение концентраций жирорастворимых веществ на верхушке и в основании ворсинки 5:1), что может явиться пусковым механизмом проникновения в кровеносные капилляры жиров именно у новорожденных. У взрослых — другая форма ворсинки, другие гистотопографические отношения между артериолой, капиллярами подэпителиальной сети и лимфатическими микрососудами.

O. Lundgreen (1982) показал, что интерстициальная жидкость гипертонична на всем протяжении ворсиночной соединительной ткани. Если у новорожденных ведущим во всасывании воды является не градиент коллоидно-осмотического давления в подэпителиальном пространстве и в основании ворсинки, то именно противоточный механизм, действуя как умножитель, создает гиперосмолярное пространство в ворсинке и обеспечивает этим быструю и эффективную абсорбцию жидкости из просвета кишки.

Можно полагать, что постепенно, в процессе постнатального онтогенеза, лимфатические капилляры ворсинки перестают играть роль главной дренажной системы, так как с появлением сегментарных различий в проницаемости кро-

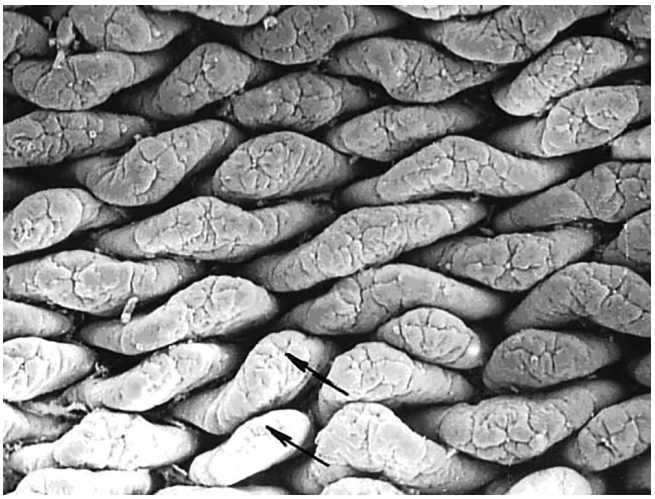


Рис. 15. Кишечные ворсинки (↑) трапециевидной формы 30-дневной крысы. Видно, что ворсинки уплощены и расположены в шахматном порядке. Тощая кишка. СЭМНП. Ув.: 80

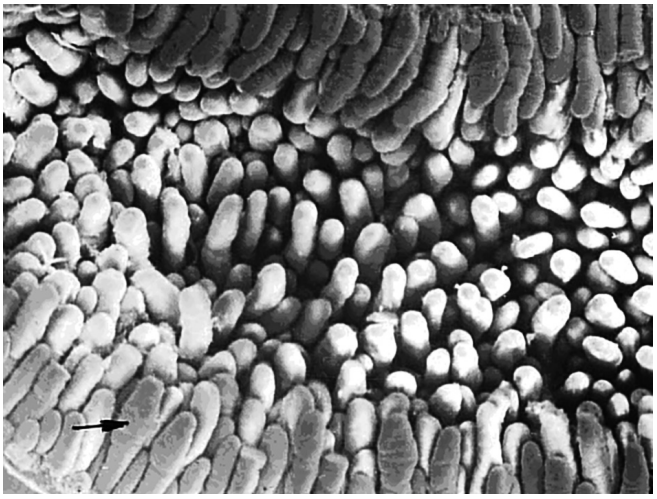


Рис. 16. Кишечные ворсинки двухсуточной новорождённой крысы. Ворсинки расширены в средней части (↑). СЭМНП. Ув.: 40

веносных микрососудов начинает формироваться градиент онкотического давления, лежащий в основе механизма гемато–интерстициально–лимфатического транспорта в кишечной ворсинке у взрослых животных.

Таким образом, кишечная ворсинка представляет собой идеальную модель для расшифровки организации потоков в ткани как результат пространственной организации всего комплекса лимфатических и кровеносных сосудов, обладающих различными транспортными потенциями.

REFERENCES

1. Aynson Kh.Kh., Limfoobrazovanie. [Lymphopoiesis]. V kn.: Fiziologiya krovoobrashcheniya. Fiziologiya sosudistoy sistemy. L.: Nauka; 1984: 307–317. (in Russian).
2. Banin V.V. Mekhanizmy obmena vnutrenney sredy. [Mechanisms of exchange of the internal environment]. M.: RGMU; 2000. (in Russian).
3. Borisov A.V. Limfaticheskaya sistema stenki toshchey i podvzdoshnoy kishki cheloveka. [Lymphatic system of a wall of a lean and podvzdoshny gut of the person]. V kn.: Sb. trudov kafedry normal'noy anatomii LSGMI. T. 17. L.; 1956: 116–134. (in Russian).
4. Grebenshchikova V.I., Chentsov Yu.S., Omran M. Izmeneniya znterotsitov tonkoy kishki na raznykh etapakh differentsiatsii i pri snyatii funktsional'noy nagruzki. [Changes of znterotsit of a small intestine at different stages of differentiation and at removal of functional loading]. Nauch. dokl. vyssh.shkoly. Biol. nauki. 1978; N 12: 66–80. (in Russian).
5. Zhdanov D.A., Shakhlamov V.A. Sravnitel'noe elektronno–mikroskopicheskoe stroenie stenok krovenosnykh i limfaticheskikh kapillyarov. [Comparative electronic and microscopic structure of walls of blood and lymphatic capillaries]. Arkh. anat. 1964; 47 (10): 13–18. (in Russian).
6. Kamyshova V.V., Banin V.V., Karelina N.R. Topograficheskie osobennosti organizatsii limfaticheskikh kapillyarov i rezorbtsiya lipidov v vorsinke toshchey kishki beloy krysy. [Topographical features of the organization of lymphatic capillaries and resorption of lipids in a fiber of a lean gut of a white rat]. Morfologiya. 1984; 87 (11): 53–61. (in Russian).
7. Karaganov Ya.L., Mironov A.A., Mironov V.A. Strukturno-funktsional'nye aspekty sokratimosti sosudistogo endoteliya. [Structurally functional aspects of a sokratimost vascular endoteliya]. Uspekhi sovr. biol. 1983; 95 (3): 421–436. (in Russian).
8. Kakharov A. Lokal'nye osobennosti limfaticheskikh i krovenosnykh sosudov toshchey i podvzdoshnoy kishki cheloveka. [Local features of lymphatic and blood vessels of a lean and ileal intestine of the person]. Arkh. anat. 1963; 64 (Vyp. 3): 28–47. (in Russian).
9. Kupriyanov V.V., Borodin Yu.I., Karaganov Ya.L., Vyrenkov Yu.E. Mikrolimfologiya. [Mikrolimfologiya]. M.: Meditsina; 1983. (in Russian).
10. Shakhlamov V.A. Kapillyary. [Capillaries]. M.: Meditsina; 1971. (in Russian).
11. Shakhlamov V.A., Tsameryan A.P. Ocherki po ul'trastrukturnoy organizatsii sosudov limfaticheskoy sistemy. [Sketches on the ultrastructural organization of vessels of lymphatic system]. Novosibirsk: Nauka; 1982. (in Russian).
12. Shakhmuradyan R.N. Lokal'nye osobennosti krovenosnogo i limfaticheskogo rusla tonkoy kishki beloy krysy v norme i pri ostrom eksperimental'nom peritonite. [Local features of the blood and lymphatic course of a small intestine of a white rat are normal also at sharp experimental peritonitis]. Arkh. anat. 1973; 64 (Vyp. 6): 35–39. (in Russian).
13. Bundgaard M. The paracellular patway in capillary endotelia. In: Vasc. Endothelium Health: Proc. Satell. Symp. 4th World Cong. Microcirc., 1987. New York – London; 1988: 3–8.
14. Casley-Smith J.R. The identification of chylomicra and lipoproteins in tissue sections and their passage into jejunal lacteals. J. Cell Biol. 1962; 15 (2): 259–277.
15. Casley-Smith J.R. Lymph and lymphatics. In: Kaley G., Altura B.M., eds. Microcirculation. Vol. I. Baltimore — London — Tokyo: University ParkPress; 1977: 421–502.
16. Collan Y., Kalima T.V. The lymphatic pump of the intestinal villus of the rat. Scand. J. Gastroent. 1970; 5 (5): 187–196.
17. Daniel H., Fett C., Kratz A. Demonstration and modification of intervillons pH profiles in rat small intestine in vitro. Amer. J. Physiol. 1989; 257(4, pt I): G489–G495.
18. Dobbins W.O. The intestinal mucosal lymphatics in man. Gastroenterology. 1966; 51 (6): 994–1003.
19. Dobbins W.O., Rollins E.L. Intestinal mucosal lymphatic permeability; an elecrtron microscopic study of endothelial vesicles and cell junctions. J. Ultrast. Res. 1970; 33(1–2): 29–59.
20. Elhay S., Casley-Stoith J.R. Mathematical model of the intial lymphatics. Microvasc. Res. 1970; 12: 121–140.
21. Foldi M., Casley-Smith J.R. Lymphangiology. Stuttgart – New York: F.K. Schattner Verlag; 1983.
22. Frolqaer-Jensen J. Three-dimensional organization of plasmalernmal vesicles in endothelial cells. An analysis by serial sectioning of frog mesenteric csppillaries. J. Ultrastr. Res. 1980; 73(1): 9–20.
23. Granger D.N., Perry M.A., Kvietys P.R., Taylor A.E. Capillary and Intestinal forces during fluid absorption in the cat small intestine. Gastroenterology. 1984; 86 (2): 267–273.
24. Guldner F.-H., Wolff J.R., Keyserlingk D.G. Fibroblasts as a part of the contractile system in duodenal villi of rat. Z. Zellforsch. 1972; 135, MS: 349–360.
25. Hallback D.-A., Yodal M., Mannischeff M., Lundgren O. Tissue osmolaty in interstinal villi of four mammals in vivo and in vitro. Acta physiol. Scand. 1991; 143 (3): 271–277.
26. Jones W.R., O'Morchoe P.J., O'Morchoe C.C.C. The organization of endocytotic vesicles in lymphatic endothelium. Mierovase. Res. 1983; 25 (3): 286–299.
27. Kalima T.V. The structure and function of intestinal lymphatics and the influence of impairedlymph flow on the ileum of rats. Scand. J. Sastroenterology. 1971; 6 (suppl.10): 1–87.
28. Leak L.V., Burke J.F. Ultrastructural studies on thelymphatic anchoring filaments. J. Cell. Biol. 1968; 36: 129–149.
29. Lee J.S. A micropuncture study of water transport by dog jejunal villi in vitro. Am. J. Physiol. 1969; 217(5): 1528–1533.
30. Lundgren O. Pishchevaritel'nyy kanal. V kn: Perifericheskoe krovoobrashchenie. M.: Mir; 1982.
31. Mohiuddin A. Blodd and lymph vessels in the jejunal villi of the white rat. Anat. Rec. 1966; 156 (1): 83–89.
32. O'Morchoe C.C.C., Albertine K.H., O'Morchoe P.J. The rate of trans lymphatic endothelial fluid movement in the canine kidney. Microvasc. Res. 1982; 23: 180–187.

33. Palade G.E. Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries [abstr.]. Anat. Rec. I960; 136: 254.
34. Papp M., Rohlich P., Rusznyak J., Toro J. An electron microscopic study of the central lacteal in the intestinal villus of the cat. Z Zellforsch. 1962; 57: 475-486 .
35. Qttaviani G., Azzali G. Ultrestructure of lymphatic vessels in some functional conditions. Acta anat. 1969; Suppl. 56: 325–336.
36. Zweifach B.W., Silberberg A. The interstitial lymphatic flow system. In: Guyton A.C., Jung D.B., eds. Int. Rev. Physiol. cardiac, Phsiol. III. Vol. 18. Baltimore: Univ. Park Press; 1979. P. 216–260.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айнсон Х.Х., Лимфообразование. В кн.: Физиология кровообращения. Физиология сосудистой системы. Л.: Наука; 1984: 307–317.
2. Банин В.В. Механизмы обмена внутренней среды. М.: РГМУ; 2000.
3. Борисов А.В. Лимфатическая система стенки тощей и подвздошной кишки человека. В кн.: Сб. трудов кафедры нормальной анатомии ЛСГМИ. Т. 17. Л.; 1956: 116–134.
4. Гребенщикова В.И., Ченцов Ю.С., Омран М. Изменения энтероцитов тонкой кишки на разных этапах дифференциации и при снятии функциональной нагрузки. Науч. докл. высш.школы. Биол. науки. 1978; N 12: 66–80.
5. Жданов Д.А., Шахламов В.А. Сравнительное электронно–микроскопическое строение стенок кровеносных и лимфатических капилляров. Арх. анат. 1964; 47 (10): 13–18.
6. Камышова В.В., Банин В.В., Карелина Н.Р. Топографические особенности организации лимфатических капилляров и резорбция липидов в ворсинке тощей кишки белой крысы. Морфология. 1984; 87 (11): 53–61.
7. Караганов Я.Л., Миронов А.А., Миронов В.А. Структурно-функциональные аспекты сократимости сосудистого эндотелия. Успехи совр. биол. 1983; 95 (3): 421–436.
8. Кахаров А. Локальные особенности лимфатических и кровеносных сосудов тощей и подвздошной кишки человека. Арх. анат. 1963; 64 (Вып. 3): 28–47.
9. Куприянов В.В., Бородин Ю.И., Караганов Я.Л., Выренков Ю.Е. Микролимфология. М.: Медицина; 1983.
10. Шахламов В.А. Капилляры. М.: Медицина; 1971.
11. Шахламов В.А., Цамерян А.П. Очерки по ультраструктурной организации сосудов лимфатической системы. Новосибирск; 1982.
12. Шахмурадян Р.Н. Локальные особенности кровеносного и лимфатического русла тонкой кишки белой крысы в норме и при остром экспериментальном перитоните. Арх. анат. 1973; 64 (Вып. 6): 35–39.
13. Bundgaard M. The paracellular patway in capillary endotelia. In: Vasc. Endothelium Health: Proc. Satell. Symp. 4th World Cong. Microcirc., 1987. New York – London; 1988: 3–8.
14. Casley-Smith J.R. The identification of chylomicra and lipoproteins in tissue sections and their passage into jejunal lacteals. J. Cell Biol. 1962; 15 (2): 259–277.
15. Casley-Smith J.R. Lymph and lymphatics. In: Kaley G., Altura B.M., eds. Microcirculation. Vol. I. Baltimore — London — Tokyo: University ParkPress; 1977: 421–502.
16. Collan Y., Kalima T.V. The lymphatic pump of the intestinal villus of the rat. Scand. J. Gastroent. 1970; 5 (5): 187–196.
17. Daniel H., Fett C., Kratz A. Demonstration and modification of intervillons pH profiles in rat small intestine in vitro. Amer. J. Physiol. 1989; 257(4, pt I): G489–G495.
18. Dobbins W.O. The intestinal mucosal lymphatics in man. Gastroenterology. 1966; 51 (6): 994–1003.
19. Dobbins W.O., Rollins E.L. Intestinal mucosal lymphatic permeability; an elecrtron microscopic study of endothelial vesicles and cell junctions. J. Ultrast. Res. 1970; 33(1–2): 29–59.
20. Elhay S., Casley-Stoith J.R. Mathematical model of the intial lymphatics. Microvasc. Res. 1970; 12: 121–140.
21. Foldi M., Casley-Smith J.R. Lymphangiology. Stuttgart – New York: F.K. Schattner Verlag; 1983.
22. Frolqaer-Jensen J. Three-dimensional organization of plasmalernmal vesicles in endothelial cells. An analysis by serial sectioning of frog mesenteric csppillaries. J. Ultrastr. Res. 1980; 73(1): 9–20.
23. Granger D.N., Perry M.A., Kvietys P.R., Taylor A.E. Capillary and Intestinal forces during fluid absorption in the cat small intestine. Gastroenterology. 1984; 86 (2): 267–273.
24. Guldner F.-H., Wolff J.R., Keyserlingk D.G. Fibroblasts as a part of the contractile system in duodenal villi of rat. Z. Zellforsch. 1972; 135, MS: 349–360.
25. Hallback D.-A., Yodal M., Mannischeff M., Lundgren O. Tissue osmolaty in interstinal villi of four mammals in vivo and in vitro. Acta physiol. Scand. 1991; 143 (3): 271–277.
26. Jones W.R., O'Morchoe P.J., O'Morchoe C.C.C. The organization of endocytotic vesicles in lymphatic endothelium. Mierovase. Res. 1983; 25 (3): 286–299.
27. Kalima T.V. The structure and function of intestinal lymphatics and the influence of impairedlymph flow on the ileum of rats. Scand. J. Sastroenterology. 1971; 6 (suppl.10): 1–87.
28. Leak L.V., Burke J.F. Ultrastructural studies on thelymphatic anchoring filaments. J. Cell. Biol. 1968; 36: 129–149.
29. Lee J.S. A micropuncture study of water transport by dog jejunal villi in vitro. Am. J. Physiol. 1969; 217(5): 1528–1533.
30. Lundgren O. Пищеварительный канал. В кн: Периферическое кровообращение. М.: Мир; 1982.
31. Mohiuddin A. Blodd and lymph vessels in the jejunal villi of the white rat. Anat. Rec. 1966; 156 (1): 83–89.
32. O'Morchoe C.C.C., Albertine K.H., O'Morchoe P.J. The rate of trans lymphatic endothelial fluid movement in the canine kidney. Microvasc. Res. 1982; 23: 180–187.
33. Palade G.E. Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries [abstr.]. Anat. Rec. I960; 136: 254.
34. Papp M., Rohlich P., Rusznyak J., Toro J. (Папп М., Рэлих П.., Русньяк И., Тэрэ И.) Ультраструктура центрального млечного синуса кишечной ворсинки. Арх. анат. 1962; 6: 24–29.
35. Qttaviani G., Azzali G. Ultrestructure of lymphatic vessels in some functional conditions. Acta anat. 1969; Suppl. 56: 325–336.
36. Zweifach B.W., Silberberg A. The interstitial lymphatic flow system. In: Guyton A.C., Jung D.B., eds. Int. Rev. Physiol. cardiac, Phsiol. III. Vol. 18. Baltimore: Univ. Park Press; 1979. P. 216–260.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Утв. приказом и.о. ректора
ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России от 23.06.16

НАСТОЯЩИЕ ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ ЯВЛЯЮТСЯ ИЗДАТЕЛЬСКИМ ДОГОВОРОМ

Условия настоящего Договора (далее «Договор») являются публичной офертой в соответствии с п. 2 ст. 437 Гражданского кодекса Российской Федерации. Данный Договор определяет взаимоотношения между редакцией журнала «**Russian Biomedical Research»** (далее по тексту «Журнал»), зарегистрированного Управлением Федеральной службы по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций по Северо-Западному федеральному округу, свидетельство: ПИ № ТУ78-01871 от 17 мая 2016 г., именуемой в дальнейшем «Редакция» и являющейся структурным подразделением ФГБОУ ВО СПбГПМУ Минздрава России, и автором и/или авторским коллективом (или иным правообладателем), именуемым в дальнейшем «Автор», принявшим публичное предложение (оферту) о заключении Договора.

Автор передает Редакции для издания авторский оригинал или рукопись. Указанный авторский оригинал должен соответствовать требованиям, указанным в разделах «Представление рукописи в журнал», «Оформление рукописи». При рассмотрении полученных авторских материалов Журнал руководствуется «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» (Intern. committee of medical journal editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals // Ann. Intern. Med. 1997; 126: 36–47).

В Журнале печатаются ранее не опубликованные работы по профилю Журнала.

Журнал не рассматривает работы, результаты которых по большей части уже были опубликованы или описаны в статьях, представленных или принятых для публикации в другие печатные или электронные средства массовой информации. Представляя статью, автор всегда должен ставить редакцию в известность обо всех направлениях этой статьи в печать и о предыдущих публикациях, которые могут рассматриваться как множественные или дублирующие публикации той же самой или очень близкой работы. Автор должен уведомить редакцию о том, содержит ли статья уже опубликованные материалы, и предоставить ссылки на предыдущую, чтобы дать редакции возможность принять решение, как поступить в данной ситуации. Не принимаются к печати статьи, представляющие собой отдельные этапы незавершенных исследований, а также статьи с нарушением «Правил и норм гуманного обращения с биообъектами исследований».

Размещение публикаций возможно только после получения положительной рецензии.

Все статьи, в том числе статьи аспирантов и докторантов, публикуются бесплатно.

Подача статей в журнал «Педиатр» осуществляется только через он-лайн форму с сайта СПбГПМУ: http://gpma.ru/science/pediatr/ с пометкой «для Russian Biomedical Research».

Требования к отправке статей

Перед заполнением анкеты авторам рекомендуется подготовить все необходимые для ввода данные, а также выбрать автора (в случае коллектива авторов статьи), ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ПЕРЕПИСКУ. Для успешного заполнения анкеты необходимо иметь всю указанную информацию и на русском и на английском языках!!!

Все названия на английском языке, включая названия статьи, названия учреждений, их подразделений должны приводиться с заглавных букв (например: Sex Differences In Aging, Life Span And Spontaneous Tumorigenesis; Bulletin of Experimental Biology and Medicine; Saint Petersburg State Pediatric Medical University) и непременно в соответствии с официальными наименованиями без самодеятельности.

Анкетные данные всех авторов — ФИО (полностью), ученая степень, звание, должность, место работы (кафедра, отделение), название учреждения, адрес учреждения, E-mail, телефон, ФИО автора, ответственного за переписку, и т.д. — заполняются в соответствующих полях формы заявки.

Резюме, ключевые слова и название статьи — также заполняются он-лайн.

Статья предоставляется в электронной форме (файл MS Word версии не старше 2003, т.е. с расширением doc, заархивированный в формат .zip, .rar).

Файл статьи называется Фамилией первого автора, например, Иванов.doc или Petrov.doc

Статья должна соответствовать правилам оформления статей к публикации (см. ниже)

К каждой статье прилагается файл Экспертного Заключения (ЭЗ). Для авторов СПбГПМУ ЭЗ может только подписываться авторами статьи, печать необязательна. Для авторов других учреждений — ЭЗ оформляется обязательно полностью, с печатями (круглая печать учреждения) и подписями руководителей и комиссий данного учреждения. Заполненный, подписанный и «опечатанный» ЭЗ для отправки он-лайн предварительно сканируется или фотографируется. Образец ЭЗ можно запросить по адресу: scrcenter@mail.ru

Отправленные анкетные данные авторов, статья, ЭЗ

поступают на E-mail автору-отправителю (для подтверждения и проверки отправки) и на E-mail редакции scrcenter@mail.ru техническому редактору журнала «Russian Biomedical Research», с которым осуществляется вся дальнейшая работа по подготовке статьи в печать.

Все вопросы по отправке статей можно адресовать на электронный адрес scrcenter@mail.ru техническому редактору журнала «Russian Biomedical Research» Марии Александровне Пахомовой.

Рукопись считается поступившей в Редакцию, если она представлена комплектно и оформлена в соответствии с описанными требованиями. Предварительное рассмотрение рукописи, не заказанной Редакцией, не является фактом заключения между сторонами издательского Договора.

При представлении рукописи в Журнал Авторы несут ответственность за раскрытие своих финансовых и других конфликтных интересов, способных оказать влияние на их работу. В рукописи должны быть упомянуты все лица и организации, оказавшие финансовую поддержку (в виде грантов, оборудования, лекарств или всего этого вместе), а также другое финансовое или личное участие.

Правила оформления статей к публикации

1. Статья предоставляется в электронной форме (файл MS Word версии не старше 2003, т.е. с расширением doc, заархивированный в формат .zip, .rar), шрифт — 14, интервал — полуторный.

Файл статьи называется по Фамилии первого автора, например, Иванов.doc или Petrov.doc. Никаких других слов в названии не должно быть!

Ориентировочны размер статьи, включая указатель литературы, таблицы и резюме, — 10–12 стр. текста через полтора интервала или 20–25 тысяч знаков с пробелами. Рекомендуемый размер обзора — 18–20 страниц «машинописного» текста или 35–40 тысяч знаков с пробелами. Примерное число литературных ссылок для экспериментальной статьи — 20, для обзоров и проблемных статей — 50.

Файл статьи должен содержать

- название статьи (русское и английское);
- ФИО авторов на русском и английском языке;
- текст статьи, включая таблицы и рисунки непосредственно в теле статьи, каждый из которых имеет номер и название с обязательными ссылками на них в тексте статьи — в контексте предложения (например: «…как показано на рисунке 1…») или в конце предложения в круглых скобках (например: «...выявлена положительная корреляционная связь умеренной степени (r=0,41) между уровнем ТТГ матери и новорожденного (рис. 2)2); просьба учитывать, что в печатной версии журнала рисунки будут воспроизводиться в черно-белом варианте.
- список литературы обязательно в алфавитном порядке (сперва все отечественные потом иностранные авторы (см. пункт 5) с дополнительным транслитерированным списком (методика транслитерации описана подробно ниже).

2. Текст статьи должен быть подготовлен в строгом соответствии с настоящими правилами и тщательно выверен автором. В случае обнаружения значительного количества опечаток, небрежностей, пунктуационных и орфографических ошибок, нерасшифрованных сокращений, отсутствия основных компонентов и других технических дефектов оформления статей редакция возвращает статью автору для доработки. Небольшие погрешности редакция может исправить сама без согласования с автором. Кроме того, редакция оставляет за собой право осуществления литературного редактирования статей.

Сокращений, кроме общеупотребляемых, следует избегать. Сокращения в названии статьи, названиях таблиц и рисунков, в выводах недопустимы. Если аббревиатуры используются, то все они должны быть непременно расшифрованы полностью при первом их упоминании в тексте (например: «Наряду с данными о РОН (резидуально-органической недостаточности), обусловливающей развитие ГКС (гиперкинетического синдрома), расширен диапазон исследований по эндогенной природе данного синдрома».

3. Все цитирования производятся следующим образом:

ФИО автора, год издания и прочая информация не упоминаются в тексте. Вместо этого указывается ссылка на источник литературы в виде номера в квадратных скобках (пример: «Ряд исследователей отмечает различные нарушения речевых функций при эпилепсии в детском возрасте [17, 21, 22].»), который включен в расставленный в алфавитном порядке список источников в конце статьи.

Все ссылки должны иметь соответствующий источник в списке, а каждый источник в списке — ссылку в тексте.

4. В виде исключения в тексте могут приводиться ФИО конкретных авторов в формате И. О. Фамилия, год и даже название источника, но при этом все равно обязательна ссылка (в квадратных скобках в конце предложения) на источник, включенный в список литературы.

(Например: «В 1892 году великий Эраст Гамильтонский описал в своем бессмертном труде «Об открытии третьего уха у человека» третье (непарное) ухо [34].»)

5. Литература (References)

Учитывая требования международных систем цитирования, список литературы приводится не только в обычном виде, но также и дополнительно в транслитерированном (см. п. 5.9. Транслитерация).

В статье приводятся ссылки на все упоминаемые в тексте источники.

Фамилии и инициалы авторов в пристатейном списке приводятся в алфавитном порядке, сначала русского, затем латинского алфавита.

В описании указываются все авторы публикации.

Библиографические ссылки в тексте статьи даются в квадратных скобках.

Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Список литературы комплектуется в следующем порядке:

5.1. Нормативные акты

Приказы, нормативные акты, методические письма и прочие законные акты, патенты, полезные модели не вносятся в список литературы, оформляются в виде сносок. Сноска — примечание, помещаемое внизу страницы (постраничная сноска). Знак сноски ставят цифрой после фрагмента основного текста, где есть упоминание об этих источниках. Рекомендуется сквозная нумерация сносок по тексту.

5.2. Интернет-ресурс

1. Интернет-ресурс, где есть название источника, автор — вносится в список литературы (в порядке алфавита) с указанием даты обращения (см. ниже пример оформления).

2. Если есть только ссылка на сайт — вносится в список литературы в конце, с указанием даты обращения.

Щеглов И. Насколько велика роль микрофлоры в биологии вида-хозяина? Живые системы: научный электронный журнал. Доступен по: http://www.biorf.ru/catalog.aspx?cat_id=396&d_no=3576 (дата обращения 02.07.2012).

Kealy M. A., Small R. E., Liamputtong P. Recovery after caesarean birth: a qualitative study of women's accounts in Victoria, Australia. BMC Pregnancy and Childbirth. 2010. Available at: http://www.biomedcentral. com/1471–2393/10/47/ (Accessed 11.09.2013).

5.3. Книга:

Автор(ы) название книги (знак точка) место издания (двоеточие) название издательства (знак точка с запятой) год издания. Если в качестве автора книги выступает редактор, то после фамилии следует ред.

Айламазян Э. К., Новиков Б. Н., Зайнулина М,.С., Палинка Г. К., Рябцева И. Т., Тарасова М. А. Акушерство: учебник. 6 изд. СПб.; 2007.

Преображенский Б. С., Темкин Я.С., Лихачев А.Г. Болезни уха, горла и носа. М.: Медицина; 1968.

Радзинский В. Е., ред. Перинеология: учебное пособие. М.: РУДН; 2008.

Brandenburg J.H., Ponti G.S., Worring A.F. eds. Vocal cord injection with autogenous fat. 3 rd ed. N Y:Mosby; 1998

Domeika M. Diagnosis of genital chlamydial infection in humans as well as in cattle. Uppsala; 1994.

5.4. Глава из книги:

Автор(ы) название главы (знак точка) В кн.: или In: далее описание книги [Автор(ы) название книги (знак точка) место издания (двоеточие) название издательства (знак точка с запятой) год издания] (двоеточие) стр. от и до.

Коробков Г.А. Темп речи. В кн.: Современные проблемы физиологии и патологии речи: сб. тр. Т. 23. М.; 1989: 107–11.

5.5. Статья из журнала:

Автор(ы) название статьи (знак точка) название журнала (знак точка) год издания (знак точка с запятой) том (если есть в круглых скобках номер журнала) затем знак (двоеточие) страницы от и до.

Кирющенков А.П., Совчи М.Г., Иванова П.С. Поликистозные яичники. Акушерство и гинекология. 1994; N 1: 11–4.

Brandenburg J.H., Ponti G.S., Worring A.F. Vocal cord injection with autogenous fat: a long-term magnetic resona. Laryngoscope. 1996; I06(2,pt I): 174–80.

Simpson J. et al. Association between adverse perinatal outcomes and serially obtained second and third trimester MS AFP measurements. Am. J. Obstet. Gynecol. 1995; 173: 1742.

Deb S., Campbell B. K., Pincott-Allen C. et al. Quantifying effect of combined oral contraceptive pill on functional ovarian reserve as measured by serum anti-Müllerian hormone and small antral follicle count using three-dimensional ultrasound. Ultrasound. Obstet. Gynecol. 2012; 39 (5): 574–80.

5.6. Тезисы докладов, материалы научных конференций

Бабий А.И., Левашов М.М. Новый алгоритм нахождения кульминации экспериментального нистагма (миниметрия). III съезд оториноларингологов Респ. Беларусь: тез. докл. Минск; 1992: 68–70.

Салов И.А., Маринушкин Д.Н. Акушерская тактика при внутриутробной гибели плода. В кн.: Материалы IV Российского форума «Мать и дитя». М.; 2000; ч. 1: 516–9.

5.7. Авторефераты:

Петров С.М. Время реакции и слуховая адаптация в норме и при периферических поражениях слуха. Автореф. дис… канд. мед. наук. СПб.; 1993.

5.8. Прочее

World Health Organization. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, 2005 global estimates. Geneva: World Health Organization; 2011.

5.9. Транслитерация

Список литературы подается в двух вариантах: первый на языке оригинала (русскоязычные источники кириллицей, англоязычные латиницей), второй — (References) в романском алфавите (для Scopus и других международных баз данных, повторяя в нем все источники литературы, независимо от того, имеются ли среди них иностранные. Если в списке есть ссылки на иностранные публикации, они полностью повторяются в списке, готовящемся в романском алфавите.

В романском алфавите для русскоязычных источников требуется следующая структура библиографической ссылки: автор(ы) (транслитерация), [перевод названия книги или статьи на английский язык], название источника (транслитерация), выходные данные в цифровом формате, указание на язык статьи в скобках (in Russian).

Пример:

Preobrazhenskiy B. S., Temkin Ya. S., Likhachev A. G. Bolezni ukha, gorla i nosa [Diseases of the ear, nose and throat]. M.: Meditsina; 1968. (in Russian).

Технология подготовки ссылок с использованием системы автоматической транслитерации и переводчика:

На сайте http://www.translit.ru можно бесплатно воспользоваться программой транслитерации русского текста в латиницу. Программа очень простая.

Входим в программу Translit.ru. В окошке «варианты» выбираем систему транслитерации BGN (Board of Geographic Names). Вставляем в специальное поле весь текст библиографии на русском языке и нажимаем кнопку «в транслит».

Копируем транслитерированный текст в готовящийся список References. Переводим на английский язык название книги, статьи, постановления и т.д., переносим его в готовящийся список. **Внимание!** Необходим авторский корректный перевод названия. Автоматический перевод, предполагающий возможное искажение сути названия статьи, недопустим.

Объединяем описания в соответствии с принятыми правилами и редактируем список. В конце ссылки в круглых скобках указывается (in Russian). Ссылка готова.

Примеры транслитерации русскоязычных источников литературы для англоязычного блока статьи.

Книга: Avtor (y) Nazvanie knigi (znak tochka) [The title of the book in english]. mesto izdaniya (dvoetochie) nazvanie izdatel'stva (znak tochka s zapyatoy) god izdaniya.

Preobrazhenskiy B. S., Temkin Ya. S., Likhachev A. G. Bolezni ukha, gorla i nosa [Diseases of the ear, nose and throat]. M.: Meditsina; 1968. (in Russian).

Radzinskiy V. E., ed. Perioneologiya: uchebnoe posobie [Perineology tutorial]. M.: RUDN; 2008. (in Russian).

Глава из книги: Avtor (y) nazvanie glavy (znak tochka) [The title of the article in english]. In: Avtor (y) nazvanie knigi (znak tochka) mesto izdaniya (dvoetochie) nazvanie izdatel'stva (znak tochka s zapyatoy) god izdaniya]. (dvoetochie) str. ot i do.

Korobkov G. A. Temp rechi [Rate of speech]. V kn.: Sovremennye problemy fiziologii i patologii rechi: sb. tr. T. 23. M.;1989:107–11. (in Russian).

Статья из журнала: Avtor (y) nazvanie stat'i [The title of the article in english] (znak tochka) nazvanie zhurnala (znak tochka) god izdaniya (znak tochka s zapyatoy) tom (esli est' v kruglykh skobkakh nomer zhurnala) zatem znak (dvoetochie) stranitsy ot i do.

Kiryushchenkov A. P., Sovchi M. G., Ivanova P. S. Polikistoznye yaichniki [Polycystic ovary]. Akusherstvo i ginekologiya. 1994; N 1: 11–4. (in Russian).

Тезисы докладов, материалы научных конференций

Babiy A. I., Levashov M. M. Novyy algoritm nakhozhdeniya kul'minatsii eksperimental'nogo nistagma (minimetriya) [New algorithm of finding of the culmination experimental nystagmus (minimetriya)]. III s»ezd otorinolaringologov Resp. Belarus': tez. dokl. Minsk; 1992: 68–70. (in Russian).

Salov I. A., Marinushkin D. N. Akusherskaya taktika pri vnutriutrobnoy gibeli ploda [Obstetric tactics in intrauterine fetal death]. V kn.: Materialy IV Rossiyskogo foruma «Mat' i ditya». M.; 2000; ch.1:516–9. (in Russian).

Авторефераты

Petrov S. M. Vremya reaktsii i slukhovaya adaptatsiya v norme i pri perifericheskikh porazheniyakh slukha [Time of reaction and acoustical adaptation in norm and at peripheral defeats of hearing]. PhD thesis. SPb.; 1993. (in Russian).

Описание Интернет-ресурса

Shcheglov I. Naskol'ko velika rol' mikroflory v biologii vida-khozyaina? [How great is the microflora role in type-owner biology?]. Zhivye sistemy: nauchnyy elektronnyy zhurnal. Available at: http://www.biorf.ru/catalog.aspx?cat_id=396&d_no=3576 (accessed 02.07.2012). (in Russian).

6. Пример списка литературы, включающего транслитерированный вариант:

ЛИТЕРАТУРА

1. Кофиади И.А. Генетическая устойчивость к заражению ВИЧ и развитию СПИД в популяциях России и сопредельных государств. Автореф. дис... канд. биол. наук. М.; 2008. Доступен по: http://www.dnatechnology.ru/ files/images/d/0b136b567d25d4be1dfa26a8b39ec2b9.pdf (дата обращения 18.09.2014).
2. Николаева И.А., Максимова Н.Р., Николаева Т.Я., Пузырев В.П. Делеционный полиморфизм гена рецептора хемокина 5 и риск развития рассеянного склероза в Якутии. Якутский медицинский журнал. 2007; 2 (18): 10–12.
3. Ghorban K., Dadmanesh M., Hassanshahi G., Momeni M., Zare-Bidaki M., Arababadi M.K., Kennedy D. Is the CCR5 Δ 32 mutation associated with immunesystem-related diseases? Inflammation. 2013; 36 (3): 633–42.
4. Hinks A., Martin P., Flynn E., Eyre S., Packham J. Childhood Arthritis Prospective Study (CAPS), UKRAG Consortium, BSPAR Study Group, Barton A., Worthington J., Thomson W. Association of the CCR5 gene with juvenile idiopathic arthritis. Genes Immun. 2010; 11 (7): 584–89.
5. …
6. …

И т.д.

REFERENCES

1. Kofiadi I.A. Geneticheskaya stoychivost' k zarazheniyu VICh i razvitiyu SPID v populyatsiyakh Rossii i sopredel'nykh gosudarstv [Genetic resistance to HIV infection and development of AIDS in populations of Russia and neighboring countries]. PhD-thesis. M.; 2008. Available from: http://www.dna-technology.ru/files/images/d/0b136b567d25d4be1dfa26a8b39ec2b9.pdf (accessed 18.09.2014) (in Russian).
2. Nikolaeva I.A., Maksimova N.R., Nikolaeva T.Ya., Puzyrev V.P. Deletsionnyy polimorfizm gena retseptora khemokina 5 i risk razvitiya rasseyannogo skleroza v Yakutii [Deletion polymorphism in the gene for the receptor of the chemokine 5 and the risk of developing multiple sclerosis in Yakutia]. Yakutskiy meditsinskiy zhurnal. 2007; 2 (18): 10–12. (in Russian).
3. Ghorban K., Dadmanesh M., Hassanshahi G., Momeni M., Zare-Bidaki M., Arababadi M. K., Kennedy D. Is the CCR5 Δ 32 mutation associated with immunesystem-related diseases? Inflammation. 2013; 36 (3): 633–42.

4. Hinks A., Martin P., 4. Flynn E., Eyre S., Packham J. Childhood Arthritis Prospective Study (CAPS), UKRAG Consortium, BSPAR Study Group, Barton A., Worthington J., Thomson W. Association of the CCR5 gene with juvenile idiopathic arthritis. Genes Immun. 2010; 11 (7): 584–89.
5. …
6. …

Etc.

7. Еще раз напоминаем, что рисунки, схемы, фотографии и прочий иллюстративный материал в печатной версии журнала будет выполнен в черно-белом варианте.

Для всех статей, имеющих DOI, индекс необходимо указывать в конце библиографического описания.

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ПРАВИЛЬНОСТЬ БИБЛИОГРАФИЧЕСКИХ ДАННЫХ НЕСЕТ АВТОР.

АВТОРСКОЕ ПРАВО

Редакция отбирает, готовит к публикации и публикует переданные Авторами материалы. Авторское право на конкретную статью принадлежит авторам статьи. Авторский гонорар за публикации статей в Журнале не выплачивается. Автор передает, а Редакция принимает авторские материалы на следующих условиях:

1) Редакции передается право на оформление, издание, передачу Журнала с опубликованным материалом Автора для целей реферирования статей из него в Реферативном журнале ВИНИТИ, РНИЦ и базах данных, распространение Журнала/авторских материалов в печатных и электронных изданиях, включая размещение на выбранных либо созданных Редакцией сайтах в сети Интернет в целях доступа к публикации в интерактивном режиме любого заинтересованного лица из любого места и в любое время, а также на распространение Журнала с опубликованным материалом Автора по подписке;
2) территория, на которой разрешается использовать авторский материал, — Российская Федерация и сеть Интернет;
3) срок действия Договора — 5 лет. По истечении указанного срока Редакция оставляет за собой, а Автор подтверждает бессрочное право Редакции на продолжение размещения авторского материала в сети Интернет;
4) Редакция вправе по своему усмотрению без каких-либо согласований с Автором заключать договоры и соглашения с третьими лицами, направленные на дополнительные меры по защите авторских и издательских прав;
5) Автор гарантирует, что использование Редакцией предоставленного им по настоящему Договору авторского материала не нарушит прав третьих лиц;
6) Автор оставляет за собой право использовать предоставленный по настоящему Договору авторский материал самостоятельно, передавать права на него по договору третьим лицам, если это не противоречит настоящему Договору;
7) Редакция предоставляет Автору возможность безвозмездного получения справки с электронными адресами его официальной публикации в сети Интернет;
8) при перепечатке статьи или ее части ссылка на первую публикацию в Журнале обязательна.

ПОРЯДОК ЗАКЛЮЧЕНИЯ ДОГОВОРА И ИЗМЕНЕНИЯ ЕГО УСЛОВИЙ

Заключением Договора со стороны Редакции является опубликование рукописи данного Автора в журнале «Russian Medical Visualization» и размещение его текста в сети Интернет. Заключением Договора со стороны Автора, т. е. полным и безоговорочным принятием Автором условий Договора, является передача Автором рукописи и экспертного заключения.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ

Статьи, поступившие в редакцию, обязательно рецензируются. Если у рецензента возникают вопросы, то статья с комментариями рецензента возвращается Автору. Датой поступления статьи считается дата получения Редакцией окончательного варианта статьи. Редакция оставляет за собой право внесения редакторских изменений в текст, не искажающих смысла статьи (литературная и технологическая правка).

АВТОРСКИЕ ЭКЗЕМПЛЯРЫ ЖУРНАЛА

Редакция обязуется выдать Автору 1 экземпляр Журнала с опубликованной рукописью. Авторы, проживающие в Санкт-Петербурге, получают авторский экземпляр Журнала непосредственно в Редакции. Иногородним Авторам авторский экземпляр Журнала высылается на адрес автора по запросу.

АДРЕС РЕДАКЦИИ

194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2
e-mail: lt2007@inbox.ru. Сайт журнала: http://RBMR.gpma.ru/

Научно-практические журналы
Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета



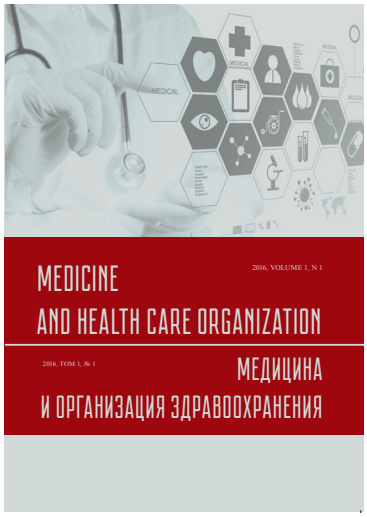
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ В МЕДИЦИНЕ
VISUALIZATION IN MEDICINE

Главный редактор: д. м. н., профессор **Геннадий Евгеньевич Труфанов**

В новом ежеквартальном научно-практическом журнале публикуются оригинальные клинические и экспериментальные исследования по лучевой диагностике различных заболеваний, статьи по эффективности рентгеноконтрастных и магнитно-резонансных контрастных средств, а также клинические наблюдения на основе сопоставлений морфологических и лучевых исследований, лекции по специфике применения лучевых исследований в клинической практике, обзоры литературы по новейшим достижениям в области диагностики заболеваний и особенностей диагностических методик и др. Журнал зарегистрирован в РИНЦ. Издание предназначено для врачей лучевой диагностики: рентгенологов, специалистов по компьютерной томографии и магнитно-резонансной томографии, врачей ультразвуковой диагностики, радиологов, а также врачей практически всех медицинских и медико-биологических специальностей, применяющих методы комплексной лучевой диагностики в своей ежедневной практике.

Электронная версия — http://elibrary.ru
Статьи просьба направлять по адресу: lt2007@inbox.ru



РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

МЕДИЦИНА И ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
MEDICINE AND HEALTH CARE ORGANIZATION

Главный редактор: д. м. н., профессор **Василий Иванович Орел**

Новое ежеквартальное научно-практическое издание на своей дискуссионной площадке публикует оригинальные, методические, обзорные, исторические и другие статьи, посвященные современным проблемам медицины и организации здравоохранения. Журнал зарегистрирован в РИНЦ.

Журнал предназначен для практикующих врачей, организаторов здравоохранения, аспирантов, ординаторов и студентов, проявляющих интерес к проблемам и реформам в современной медицинской науке и практике, в организации здравоохранения.

Электронная версия — http://elibrary.ru
Статьи просьба направлять по адресу: medorgspb@yandex.ru